



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Εφαρμογή Next Generation Sequencing σε γαλακτοκομικά προϊόντα

**Εισηγητές: Παύλου Άγγελος (16086), Κομνηνός Ιωάννης
(16154)**

Επιβλέποντες: Μπατρίνου Ανθιμία

ΑΘΗΝΑ 2023

Εγκρίθηκε από τριμελή Εξεταστική Επιτροπή

Αθήνα 2023

Επιτροπή αξιολόγησης:

1. Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Ανθμία Μπατρίνου

Βιολόγος MSc, PhD, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

2. Μέλος Επιτροπής: Σπυρίδων Κοντελής

Γεωπόνος, PhD, Ακαδημαϊκός Επίκουρος Καθηγητής Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

3. Μέλος Επιτροπής: Δήμητρα Χούχουλα

Χημικός, PhD, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

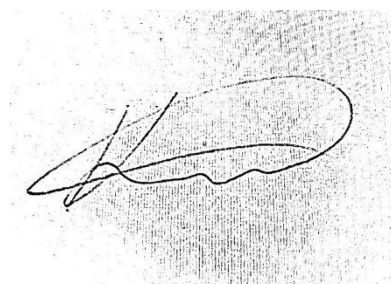
ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ ΜΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ

Δηλώνουμε υπεύθυνα και γνωρίζοντας τις κυρώσεις του νόμου περί Πνευματικής Ιδιοκτησίας, ότι είμαστε οι αποκλειστικοί συγγραφείς της παρούσας πτυχιακής εργασίας, η οποία δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής, ούτε προέρχεται από ανάθεση σε τρίτους. Όλες οι πηγές (κάθε είδους, μορφής και προέλευσης) που χρησιμοποιήθηκαν για την συγγραφή της περιλαμβάνονται στην βιβλιογραφία. Δηλώνουμε, επίσης, ότι αναλαμβάνουμε τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, σε περίπτωση που αποδειχθεί διαχρονικά ότι η εργασία αυτή αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Οι δηλώντες



Παύλου Άγγελος



Κομνηνός Ιωάννης

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	9
Γενικές πληροφορίες για το μικροβίωμα που απαντάται σε τυριά.....	9
1.1: Ιστορικά στοιχεία.....	9
1.2: Σημασία του μικροβιώματος στην παραγωγή τυριών.....	10
1.3: Κατανόηση της διαδικασίας ωρίμανσης μέσω της μελέτης των μικροβιακών αλληλεπιδράσεων.....	11
1.4: Προστατευτικές καλλιέργειες.....	11
1.5: Οξυγαλακτικά βακτήρια.....	11
1.6.1: <i>Lactobacillus curvatus</i>	12
1.6.2: <i>Lacticaseibacillus casei</i>	13
1.6.3: <i>Lactobacillus helveticus</i>	14
1.6.4: <i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	15
1.6.5: <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	15
1.6.6: <i>Lactobacillus sakei</i>	16
1.6.7: <i>Lactobacillus salivarius</i>	16
1.7.1: Προβιοτικά LAB βακτήρια.....	16
1.7.2: Ευεργετικές ιδιότητες των βακτηρίων LAB για την ανθρώπινη υγεία.....	19
1.7.3: Βελτιστοποίηση της σταθερότητας των προβιοτικών LAB.....	21
1.7.4: Τάσεις και καινοτομίες για το μέλλον.....	22
1.8.1: Μικροβιακές αντιδράσεις και χρώμα τυριού.....	24
1.8.2: Χρήση των μικροβιακών αντιδράσεων ως βελτιωτικό γεύσης.....	25
1.9: Εκκινητές.....	26
1.10: Σημασία της θερμοκρασίας.....	26

1.11: Μικροβιακό δυναμικό.....	26
1.12: Χρήση 16S rRNA sequencing.....	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	28
Γενικές πληροφορίες για το NGS.....	28
2.1: Ιστορικά στοιχεία.....	28
2.1.1: Γενικές πληροφορίες για τις μεθόδους NGS.....	30
2.2: Βασικές πηγές της γενετικής πληροφορίας.....	32
2.3: 16S rRNA sequencing.....	35
2.4: Illumina NGS.....	38
2.4.1: Προετοιμασία Βιβλιοθήκης.....	38
2.4.2: Αρχή λειτουργίας του Flow cell.....	39
2.4.3: Sequencing.....	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	41
Εφαρμογή NGS για τη μελέτη του μικροβιώματος τυριών Ελληνικής παραγωγής...	41
3.1: Γενικευμένο υπόβαθρο για τον ανθότυπο.....	41
3.2: Μέθοδοι και υλικά.....	42
3.2.1: Πρωτόκολλο ανάλυσης.....	43
3.2.2: Καθαρισμός δειγμάτων με τη χρήση PCR.....	44
3.3: Πίνακες αποτελεσμάτων.....	45
C4 A Συσκευασμένο.....	46
C14 Συσκευασμένο.....	50
C7 Μη Συσκευασμένο.....	55
C8 Μη Συσκευασμένο.....	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	68
Αποτελέσματα.....	68
4.1: Ανάλυση αποτελεσμάτων NGS.....	68

4.2.1: Βακτηριακή ποικιλότητα για τον ανθότυρο.....	68
4.2.2: Απεικόνιση των Ειδών και Γενών για τον ανθότυρο.....	71
4.3: Συζήτηση.....	74
4.4: Συμπεράσματα.....	77
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	78
Ξένη βιβλιογραφία.....	78
Ελληνική βιβλιογραφία.....	84
Ιστοσελίδες.....	84

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εφαρμογή των τεχνολογιών αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) έχει αναδειχθεί ως ένα ισχυρό εργαλείο για την ανάλυση δειγμάτων τυριού, φέρνοντας επανάσταση στον τομέα της μικροβιολογίας και της γονιδιωματικής του τυριού. Το τυρί, ένα σύνθετο και ποικιλόμορφο γαλακτοκομικό προϊόν, επηρεάζεται από μυριάδες μικροοργανισμούς που διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην παραγωγή, την ανάπτυξη της γεύσης και την ποιότητά του. Οι παραδοσιακές μέθοδοι που βασίζονται σε καλλιέργειες έχουν προσφέρει πολύτιμες γνώσεις, αλλά είναι περιορισμένες ως προς την ικανότητά τους να καταγράφουν την πλήρη μικροβιακή ποικιλομορφία που υπάρχει στο τυρί.

Η NGS επιτρέπει την ολοκληρωμένη και υψηλής απόδοσης ανάλυση των μικροβιακών κοινοτήτων του τυριού με την αλληλουχία του γενετικού υλικού που εξάγεται από τα δείγματα. Οι μεταγονιδιωματικές προσεγγίσεις παρέχουν μια ολιστική εικόνα της μικροβιακής ποικιλότητας, επιτρέποντας την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό βακτηρίων, ζυμών, μούχλας και των λειτουργικών γονιδίων τους, καθώς και την ανίχνευση LAB (Lactic Acid Bacteria) βακτηρίων και προβιοτικών πολύτιμων για την ανθρώπινη υγεία. Μέσω της NGS, οι ερευνητές μπορούν να διερευνήσουν τη σύνθεση, τη δυναμική και τις αλληλεπιδράσεις αυτών των μικροβιακών πληθυσμών, ρίχνοντας φως στο ρόλο τους στην παραγωγή τυριού, την ωρίμανση και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Στην παρούσα μελέτη θα χρησιμοποιήσουμε την τεχνολογία NGS προκειμένου να καταγράψουμε την εικόνα του μικροβιώματος διαφορετικών δειγμάτων ανθότυρου Ελληνικής παραγωγής. Στόχος μας είναι να κατανοήσουμε το βακτηριακό αποτύπωμα ενός προϊόντος το οποίο θεωρείται χαρακτηριστικά ευαλλοίωτο και να μελετήσουμε τη συμπεριφορά των μικροοργανισμών που συνυπάρχουν στο περιβάλλον του ανθότυρου και το πώς οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις επηρεάζουν την τελική μορφή του προϊόντος, αλλά και τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά.

Λέξεις κλειδιά: NGS, Ανθότυρος, Γενετικό αποτύπωμα

ABSTRACT

The application of next-generation sequencing (NGS) technologies has emerged as a powerful tool for the analysis of cheese samples, revolutionising the field of cheese microbiology and genomics. Cheese, a complex and diverse dairy product, is influenced by myriad microorganisms that play a critical role in its production, flavour development and quality. Traditional culture-based methods have provided valuable insights, but are limited in their ability to capture the full microbial diversity present in cheese.

NGS allows for a comprehensive and high-throughput analysis of the microbial communities in cheese by sequencing the genetic material extracted from the samples. Metagenomic approaches provide a holistic view of microbial diversity, allowing the identification and characterisation of bacteria, yeasts, moulds and their functional genes, as well as the detection of LAB (Lactic Acid Bacteria) bacteria and probiotics valuable for human health. Through NGS, researchers can investigate the composition, dynamics and interactions of these microbial populations, shedding light on their role in cheese production, ripening and sensory characteristics.

In the present study, we will use NGS technology in order to observe the microbiome of different Greek-produced anthotyros cheese samples. Our aim is to collect and process the data of the bacterial genetic fingerprint of a product that is considered to be especially sensitive to microbial spoilage. We will also study the behaviour of microorganisms that coexist in the anthotyros' environment and how their interactions affect the final form of the product and its organoleptic characteristics.

Key words: NGS, Anthotyros, Genetic fingerprint

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS) έχει φέρει επανάσταση σε διάφορους τομείς της επιστήμης και έχει βρει εκτεταμένες εφαρμογές στον τομέα της γονιδιωματικής, συμπεριλαμβανομένης της ανάλυσης των γαλακτοκομικών προϊόντων. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν εδώ και πολύ καιρό βασικό συστατικό της ανθρώπινης διατροφής, παρέχοντας βασικά θρεπτικά συστατικά όπως πρωτεΐνες, βιταμίνες και μέταλλα. Η ποιότητα και η ασφάλεια των γαλακτοκομικών προϊόντων είναι υψίστης σημασίας για τη διασφάλιση της ικανοποίησης των καταναλωτών και την πρόληψη πιθανών κινδύνων για την υγεία. Οι τεχνολογίες NGS έχουν συμβάλει σημαντικά στην πρόοδο της κατανόησης των μικροβιακών κοινοτήτων που υπάρχουν στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Επιτρέποντας την ταχεία και ολοκληρωμένη ανάλυση του γενετικού υλικού εντός αυτών των προϊόντων, η NGS έχει ανοίξει νέους δρόμους για τον έλεγχο της ποιότητας, την αξιολόγηση της ασφάλειας και τη διερεύνηση της μικροβιακής ποικιλότητας. Μέσω της NGS, οι ερευνητές μπορούν να εμβαθύνουν στη γενετική σύνθεση των μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των ζυμών και της μούχλας, που υπάρχουν στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Αυτή η ισχυρή τεχνική επιτρέπει την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό συγκεκριμένων μικροοργανισμών, των λειτουργικών τους γονιδίων και των μεταβολικών τους οδών. Αναλύοντας το DNA ή το RNA που εξάγεται από τα δείγματα, η NGS μπορεί να παρέχει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τη σύνθεση και τη δυναμική των μικροβιακών κοινοτήτων, βοηθώντας στον εντοπισμό οργανισμών αλλοίωσης, παθογόνων και ωφέλιμων μικροβίων. Η εφαρμογή της NGS στην ανάλυση γαλακτοκομικών προϊόντων υπερβαίνει την απλή ταυτοποίηση. Επιτρέπει την ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, η οποία είναι ζωτικής σημασίας για την παρακολούθηση και τον έλεγχο της εξάπλωσης της μικροβιακής αντοχής στην τροφική αλυσίδα. Επιπλέον, η NGS μπορεί να βοηθήσει στην αξιολόγηση της επίδρασης των τεχνικών επεξεργασίας, όπως η παστερίωση, στη μικροβιακή σύνθεση των γαλακτοκομικών προϊόντων, επιτρέποντας τη βελτιστοποίηση αυτών των διαδικασιών για τη διασφάλιση της ασφάλειας και της ποιότητας των προϊόντων. Η NGS διευκολύνει επίσης τη μελέτη της γονιδιωματικής και της μεταγραφωμιατικής των μικροοργανισμών που σχετίζονται με τα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως οι καλλιέργειες εκκίνησης και τα προβιοτικά. Με την αποκάλυψη της γενετικής βάσης των επιθυμητών χαρακτηριστικών, οι επιστήμονες μπορούν να αναπτύξουν στοχευμένες προσεγγίσεις για τη βελτίωση των διεργασιών ζύμωσης, την ενίσχυση της συνοχής των προϊόντων και τη δημιουργία νέων λειτουργικών γαλακτοκομικών προϊόντων. Επιπλέον, οι μεταγονιδιωματικές προσεγγίσεις με βάση το NGS παρέχουν μια ολιστική εικόνα των πολύπλοκων μικροβιακών οικοσυστημάτων εντός των γαλακτοκομικών προϊόντων. Αναλύοντας το συλλογικό γενετικό υλικό όλων των παρόντων μικροοργανισμών, οι επιστήμονες μπορούν να διερευνήσουν τις περίπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων ειδών, να εντοπίσουν πιθανές συνέργειες ή ανταγωνισμούς και να αποκτήσουν γνώσεις σχετικά με τις λειτουργικές δυνατότητες αυτών των οικοσυστημάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Γενικές πληροφορίες για το μικροβίωμα που απαντάται σε τυριά

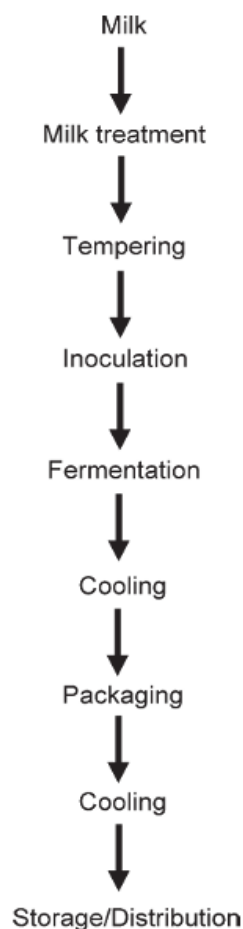
1.1 Ιστορικά στοιχεία

Το τυρί αποτελεί ένα προϊόν διαδικασίας ζύμωσης. Παραδοσιακά η παρασκευή του γίνεται από νωπό γάλα με προσθήκη ενός μικτού στελέχους μικροβιακών καλλιιεργειών, με αποτέλεσμα ο μικροβιακός έλεγχος της διαδικασίας να καθίσταται αδύνατος. Η χρήση συστημάτων καθορισμένης τάσης, με προέλευση που χρονολογείται πάνω από 50 χρόνια στη Νέα Ζηλανδία σε συνδυασμό με την παστερίωση του τυρογάλακτος, η οποία υιοθετήθηκε πλήρως από εμπορικούς κατασκευαστές παγκοσμίως κατά τις δεκαετίες 1950-1960, έθεσαν γερά θεμέλια στα πλαίσια της μελέτης και του ελέγχου της διαδικασίας της ζύμωσης του τυριού. Από τότε επικράτησε η αντίληψη μεταξύ πολλών καταναλωτών πως το τυρί που κατασκευάζεται από παστεριωμένο γάλα δεν αναπτύσσει την ίδια ώριμη γεύση όπως το τυρί το οποίο παρασκευάζεται από νωπό γάλα. Αυτή η άποψη συνεχίζει να προωθείται ακόμα και στις μέρες μας και δεν περιλαμβάνει στα πλαίσια της μόνο τυριά όπως το Cheddar και το Emmental αλλά επεκτείνεται στα προϊόντα προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης σε ολόκληρο τον κόσμο. Προωθείται ιδιαίτερα η χρήση ασηπτικών δεξαμενών τυριού και γνωστών στελεχών βακτηρίων εκκίνησης. Δοκιμές που έλαβαν χώρα σε πρώτη φάση στην Αγγλία και αργότερα στη Νέα Ζηλανδία έδειξαν πως τα βακτήρια εκκίνησης δεν θα μπορούσαν από μόνα τους να είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη ιδιαίτερης γεύσης τυριού. Παρόλα αυτά θεωρήθηκε ότι τα τυριά αυτά δεν είχαν διαμορφώσει ακόμα την πλήρη γεύση ενός ώριμου τυριού. Κατά συνέπεια όλη η προσοχή επικεντρώθηκε στην πιθανή συμβολή στην ανάπτυξη γεύσης μέσω μη εκκινητών βακτηρίων γαλακτικού οξέος (NSLAB) τα οποία απαντώνται σε υψηλούς αριθμούς σε ώριμα τυριά και προέρχονται είτε από το ίδιο το γάλα ή από το εργοστασιακό περιβάλλον. Παρά το γεγονός ότι ανά τα χρόνια έχουν διεξαχθεί πολλές πειραματικές δοκιμές με σκοπό να προστεθούν διαφορετικά στελέχη μικροοργανισμών με στόχο την προσπάθεια ενίσχυσης της γεύσης του τυριού, τα αποτελέσματα τους ήταν εντελώς αντιφατικά και δύσκολα να ερμηνευτούν.

Martley, F. G., & Crow, V. L. (1993). Interactions between Non-starter Microorganisms during Cheese Manufacture and Ripening. In *Int. Dairy Journal* (Vol. 3).

1.2: Σημασία του μικροβιώματος στην παραγωγή τυριών

Το μικροβίωμα του τυριού, του οποίου η κοινοτική δομή εξελίσσεται μέσω μιας σειράς πολλών και διαφορετικών μικροβιακών ομάδων παίζει κεντρικό ρόλο στην τυροκομία. Οι λεπτές λεπτομέρειες που διαμορφώνουν τον χαρακτήρα ενός τυριού καθώς και την διάρκεια ζωής του και το κατά πόσο αυτό αποτελεί προϊόν ασφαλές για κατανάλωση, καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από τη σύνθεση και την εξέλιξη του μικροβιώματος αυτού. Οι συμπληρωματικές καλλιέργειες και οι καλλιέργειες επιφανειακής ωρίμανσης που διατίθενται σήμερα στην αγορά για τυριά επιχρίσματος είναι ανεπαρκείς για να μιμηθούν επαρκώς την πραγματική ποικιλομορφία που συναντάται στο μικροβίωμα του τυριού. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ βακτηρίων και μυκήτων μέσα σε αυτές τις κοινότητες καθορίζουν τη δομή και τη λειτουργία τους. Οι ζυμομύκητες παίζουν βασικό ρόλο στην εγκατάσταση βακτηρίων που ωριμάζουν. Η κατανόηση των αλληλεπιδράσεων αυτών συνεισφέρει στο σχηματισμό χαρακτηριστικής γεύσης του εκάστοτε τυριού και στον έλεγχο και την πρόληψη της ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών ή μικροοργανισμών που πρόκειται να αλλοιώσουν το τυρί.



Διάγραμμα ροής 1.1 Βασικά στάδια παραγωγής γάλακτος μακράς ωρίμανσης

1.3: Κατανόηση της διαδικασίας ωρίμανσης μέσω της μελέτης των μικροβιακών αλληλεπιδράσεων

Το περιβάλλον του τυριού αποτελεί μεγάλο ενδιαφέρον καθώς προσφέρει τη δυνατότητα για ταυτόχρονη κάλυψη πολλαπλών κόγχων από εξειδικευμένα στελέχη, δηλαδή μέσω της χρήσης πολλών και διαφορετικών πηγών άνθρακα. Αυτό οφείλεται στο εξαιρετικά ετερογενές περιβάλλον του τυριού. Οι συνυπάρχουσες ζύμες και βακτήρια φτάνουν πολλές φορές σε υψηλές πληθυσμιακές κλίμακες, ενδεικτικά μεταξύ 8 και 10 logCFU ανά γραμμάριο τυριού τη χρονική στιγμή που το προϊόν είναι έτοιμο να καταναλωθεί, ενώ οι ανάλογη πληθυσμιακή κλίμακα ζυμομυκήτων και μούχλας είναι αρκετά χαμηλότερη.

Smit, Gerrit. (2003). *Dairy processing : improving quality*. CRC Press.

1.4: Προστατευτικές καλλιέργειες

Τα τελευταία χρόνια έχουν καταβληθεί μεγάλες προσπάθειες για την αξιοποίηση των ανταγωνιστικών δραστηριοτήτων των μικροοργανισμών στο περιβάλλον του τυριού. Για παράδειγμα καλλιέργειες LAB χρησιμοποιήθηκαν για την πρόληψη και τον έλεγχο του *L. monocytogenes* καθώς και των αλλοιογόνων μικροοργανισμών όπως είναι το *Clostridium tyrobutyricum* με τη βοήθεια της τεχνολογίας εμποδίων, για παράδειγμα παστερίωσης και χρήσης καθορισμένων καλλιεργειών εκκίνησης και ωρίμανσης.

Smit, Gerrit. (2003). *Dairy processing : improving quality*. CRC Press.

1.5: Βακτήρια LAB

Τα LAB βακτήρια που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή σύγχρονων γαλακτοκομικών προϊόντων τα οποία έχουν υποστεί ζύμωση είναι κυρίως ίδια με αυτά που χρησιμοποιούνταν παραδοσιακά. Τα παραδοσιακά LAB που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο στο γιαούρτι είναι ο *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* και ο *Streptococcus thermophilus*. Μειώνοντας τους αριθμούς των γαλακτοβάκιλλων και μέσω της επιλογής νέων στελεχών, η μεταοξίνιση που εμφανίζεται στα παραδοσιακά γιαούρτια έχει μειωθεί. Έτσι καθιερώθηκαν και αναπτύχθηκαν νέα, λιγότερο όξινα προϊόντα. Ειδικότερα, στις Σκανδιναβικές χώρες το γάλα συχνά ζυμώνεται με μικτούς μεσόφιλους εκκινητές *Lactococcus* spp. και *Leuconostoc* spp. αντί για ορεκτικά γιαουρτιού. Η παραγωγή που έχει υποστεί ζύμωση ξεκινά με κανονικό γάλα ή γάλα εμπλουτισμένο με μέταλλα, βιταμίνες και στερεά γάλακτος τυποποιημένα στα απαιτούμενα λιπαρά και πρωτεΐνες το γάλα

ομογενοποιείται και υποβάλλεται σε θερμική επεξεργασία συνήθως στους 90°C για 5 λεπτά και ψύχεται στη θερμοκρασία ζύμωσης, η οποία κυμαίνεται μεταξύ 32-43°C για το γιαούρτι και περίπου στους 20°C για μοντέρνα προϊόντα όπως είναι το Σουηδικό filmjölk. Το γάλα τότε ενοφθαλμίζεται με καλλιέργεια εκκίνησης έτσι ώστε οι αριθμοί LAB να φτάνουν περίπου τα 10⁷ cfu/g. Οι πιο συνηθισμένοι εκκινητές της σημερινής εποχής προστίθενται απευθείας σε συμπυκνωμένη και κατεψυγμένη μορφή σφαιριδίων στα προϊόντα γάλακτος σε περιεκτικότητες μόλις 0,01%. Εναλλακτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν καλλιέργειες γνωστές και ως bulk starters, για την προσθήκη εκκινητών κατά την παραγωγή τυριών. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, τα βακτήρια LAB ζυμώνουν τη λακτόζη και μειώνουν το pH. Κατά τη ζύμωση του γάλακτος το pH αφήνεται να πέσει στο 4,3 με 4,5 και ο χρόνος της ζύμωσης κυμαίνεται μεταξύ 4 και 20 ωρών ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη θερμοκρασία. Στην παραγωγή τυριού χρησιμοποιούνται πολλά διαφορετικά LAB. Το περιβάλλον του τυριού χαρακτηρίζεται από χαμηλή ενεργότητα ύδατος και τάση οξυγόνου και από μόνο του περιορίζει την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηρίων. Παρά το γεγονός αυτό υπάρχουν μικροοργανισμοί που διατηρούν την ικανότητα τους να αναπτυχθούν στο τυρί και επηρεάζουν την ωρίμανσή του. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ο συνδυασμός βακτηρίων LAB με λευκή και μπλε μούχλα ή βακτήρια προπιονικού οξέος και *Micrococcus* spp. . Λόγω των σημαντικά υψηλών θερμοκρασιών επεξεργασίας, τα LAB βακτήρια που χρησιμοποιούνται για τη ζύμωση της λακτόζης κατά τη ζύμωση της λακτόζης για την παρασκευή του τυριού είναι είτε μεσόφιλα είτε θερμόφιλα όπως αυτά που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή filmjölk ή γιαουρτιού. Πέρα από τους εκκινητές LAB υπάρχουν περαιτέρω LAB τα οποία σχετίζονται με την ωρίμανση του τυριού.

Smit, Gerrit. (2003). *Dairy processing : improving quality*. CRC Press.

1.6.1: *Lactobacillus curvatus*

Ο *Lactobacillus curvatus* είναι ένα προαιρετικά ετεροζυμωτικό βακτήριο που περιλαμβάνεται στην ομάδα *Lb. Sakei*. Το όνομα αντικατοπτρίζει το σχήμα του καθώς διαμορφώνεται σε μονές ράβδους με ελαφριά καμπύλη σε σχήμα φεγγαριού. Ο *Lactobacillus curvatus* είναι μέλος του πληθυσμού NSLAB σε πολλές ποικιλίες τυριού όπως είναι οι Canestrato Pugliese, Cheddar, Fiore, Sardo, Fossa, Idiazabal, Montasio, Mozzarella, Pecorino Romano, Pecorino Sardo και Roncal. Περιέχει δύο υποείδη: *curvatus* και *melibiosus*. Αυτά τα υποείδη μπορούν να διακριθούν μόνο με μεθόδους μοριακής τυποποίησης. Οι *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* και subsp. *melibiosus* έχουν περιεκτικότητες 42-44% σε G+C (mol%) και πεπτιδογλυκάνη τύπου λυσίνης-d-ασπαρτύλ. Ο τύπος στελέχους είναι ATCC 25601. Ο *Lactobacillus curvatus* αναπτύσσεται στους 15°C αλλά όχι στους 45°C. Ορισμένα στελέχη μπορούν να αναπτυχθούν και στους 2-4°C. Παράγει και τα δύο ισομερή d-

και I- γαλακτικού οξέος και η ζύμωση περιορίζεται κυρίως σε σελλοβιόζη, εσκουλίνη, γλυκονικό, μελιβιόζη, ριβόζη και σακχαρόζη.

(M. Calasso, M. Gobetti, in Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), 2011)

1.6.2: *Lacticaseibacillus casei*

Ο *Lacticaseibacillus casei* είναι ένα Gram-θετικό, μη κινητικό, μη σπορογόνο και αρνητικό στην καταλάση βακτήριο. Τα κύτταρα είναι ράβδοι $0,7-1,1 \times 2,0-4,0$ μm , συχνά με τετράγωνα άκρα τα οποία έχουν την τάση να σχηματίζουν αλυσίδες. Το κυτταρικό τοίχωμα περιέχει I-Lys-d-Asp πεπτιδογλυκάνη και πολυσακχαρίτες οι οποίοι καθορίζουν την ορολογική εξειδίκευση (B ή C) με βάση την περιεκτικότητα σε ραμνόζη ή γλυκόζη-γαλακτόζη. Η περιεκτικότητα σε G+C του DNA είναι 45-47%. Η φυλογενετική συσχέτιση των βακτηρίων γαλακτικού οξέος με βάση την ανάλυση αλληλουχίας του 16S rRNA περιλαμβάνει το *L. casei* στην ομάδα *L. casei-Pediococcus*. Το *L. casei* είναι ένα τυπικό βακτήριο τυριού που απομονώνεται κυρίως από γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα αλλά και από προζύμι, κοπριά αγελάδας, ανθρώπινο εντερικό σωλήνα, στόμα και κόλπο. Το *L. casei* διακρίνεται από την ικανότητά του να αναπτύσσεται σε υποστρώματα (γλυκονικά, μηλικά και πεντιτόλες) που σπάνια χρησιμοποιούνται από βακτήρια γαλακτικού οξέος. Ένα τροποποιημένο μέσο Rogosa SL, με τη μελεξιτόζη ως μοναδικό σάκχαρο, είναι κατάλληλο για απομόνωση από το ανθρώπινο σάλιο. Για την ανάπτυξη απαιτούνται ριβοφλαβίνη, φολικό οξύ, παντοθενικό ασβέστιο και νιασίνη. Η πυριδοξάλη ή η πυριδοξαμίνη είναι απαραίτητη ή διεγερτική. Η ανάπτυξη που εμφανίζεται στους 15°C αλλά όχι στους 45°C, είναι βέλτιστη στους 30°C. Το Εγχειρίδιο Συστηματικής Βακτηριολογίας του Bergey αναγνωρίζει τέσσερα υποείδη: *L. casei* subsp. *casei*, *pseudoplantarum* (μη ζυμωτική ραφινόζη και μελιβιόζη), *rhamnosus* (ραμνόζη-ζύμωση) και *tolerans* (αντέχει τη θέρμανση στους 72°C για 40 λεπτά). Ωστόσο, η ταξινόμηση του *L. casei* αλλάζει συνεχώς. Οι υβριδισμοί DNA-DNA έχουν δείξει υψηλά επίπεδα συγγένειας μεταξύ των στελεχών του *L. casei* subspp. *casei*, *pseudoplantarum* και *tolerans*, που όλα διέφεραν από τον τύπο στελέχους *L. casei* subsp. *casei* ATCC 393. Ως εκ τούτου, μέλη του *L. casei* subsp. *pseudoplantarum*, *tolerans* και η πλειοψηφία του *L. casei* subsp. συμπεριλήφθηκαν στο *L. paracasei* subspp. . Στελέχη *L. casei* subsp. *rhamnosus* που σχηματίζουν μια γονιδιωματικά ομοιογενή ομάδα, ανυψώθηκαν στην κατάσταση του είδους ως *L. rhamnosus*. Στη συνέχεια, φάνηκε ότι το *L. casei* subsp. Το *casei* ATCC 393 έχει το υψηλότερο επίπεδο ομοιότητας με το *L. rhamnosus* ATCC 15820, το αρχικό στέλεχος τύπου *Lactobacterium zeae*, ενώ το *L. casei* ATCC 334 σχετίζεται γενετικά με το *L. casei* subsp. στελέχη *casei* και *L. paracasei*. Η επόμενη πρόταση ήταν ότι η *L. casei* subsp. *casei* ATCC 393 και *L. rhamnosus* ATCC 15820 θα πρέπει να συμπεριληφθούν ως μέλη του *Lactobacillus zeae* nom. rev., με το στέλεχος ATCC 334 που ορίζεται ως το νεοτυπικό στέλεχος του *L. casei* subsp. *casei* και το είδος *L. paracasei* θα πρέπει να απορριφθούν. Πρόσφατα, οι δομές των γονιδίων 16S rRNA έδειξαν ότι το *L. casei* και τα σχετικά ταξινομημένα είδη πρέπει να ταξινομηθούν σε τρία είδη: *L. zeae* που

περιλαμβάνει *L. zeae* και *L. casei*, ένα είδος που περιλαμβάνει τα στελέχη *L. paracasei* και *L. casei* ATCC 334 και *L. rhamnosus*.

(Marco Gobbetti, in Encyclopedia of Food Microbiology, 1999)

	Growth at 10°C	Growth at 45°C	Resistance to 72°C for 40 seconds	Lactose	Maltose	Rhamnose	Sucrose
<i>Lactobacillus casei</i>	+	-	-	-	D	-	-
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	+	-	-	D	+	-	+
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	+	-	+	+	-	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	D	+	-	+	+	+	+

D, 50–90% of strains.

Πίνακας 1.1. Κυριότερα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά διάκρισης μεταξύ των ειδών της ομάδας *Lactobacillus casei* (Marco Gobbetti, in Encyclopedia of Food Microbiology, 1999)

1.6.3: *Lactobacillus helveticus*

Ο *Lactobacillus helveticus* είναι ένας από τους πιο βασικούς θερμοφίλους οργανισμούς που χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης στην τυροκομία και πιο συγκεκριμένα για την παραγωγή ιταλικών και ελβετικών ποικιλιών τυριών μεγάλης σκληρότητας. Κατά τη διάρκεια των παραγωγών αυτών, ο *Lactobacillus helveticus* έχει μεγάλη ευθύνη για τον σχηματισμό γεύσης, καθώς βοηθά στην οξίνιση, εφόσον πρόκειται για ένα από τα πιο πρωτεολυτικά βακτήρια γαλακτικού οξέος. Εξετάζεται επίσης η χρήση του στην παρασκευή ζυμώμενων γαλάτων ως προβιοτική καλλιέργεια. Ο *Lactobacillus helveticus* χρησιμοποιείται ως εκκινητής, συνήθως σε συνδυασμό με το *Staphylococcus thermophilus*, σε μεγάλη ποικιλία γαλακτοκομικών προϊόντων ζύμωσης αλλά όχι τόσο μεγάλη όσο η ποικιλία προϊόντων στην οποία χρησιμοποιείται ο παραδοσιακός θερμοφίλος εκκινητής *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Τα στελέχη *Lactobacillus helveticus* παράγουν κατά μέσο όρο χαμηλότερο τελικό pH στο γάλα από το *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

(M. Calasso, M. Gobbetti, in Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), 2011)

1.6.4: *Lacticaseibacillus paracasei*

Λόγω του υψηλού βαθμού ομοιότητας που παρατηρείται για τις αλληλουχίες γονιδίου 16S rRNA μεταξύ των στελεχών που ανήκουν στους *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* και *Lactobacillus rhamnosus*, αυτά τα τρία είδη αναφέρονται συνήθως ως ομάδα *L. casei*. Τα είδη που ανήκουν στην ομάδα *L. casei* μπορούν να απομονωθούν κυρίως από γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, αλλά και από ζυμωμένα λουκάνικα, λαχανικά, κρασί και, περιστασιακά, από προζύμι. Εκτός από τα τρόφιμα, στελέχη της ομάδας *L. casei* μπορούν να απομονωθούν από τον ανθρώπινο αναπαραγωγικό και γαστρεντερικό σωλήνα και τα κόπρανα, γεγονός που ευθύνεται για τη μεγάλη χρήση τους ως προβιοτικά.

(M. Gobbetti, F. Minervini, in *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, 2014)

1.6.5: *Lacticaseibacillus rhamnosus*

Ο *Lacticaseibacillus rhamnosus* ήταν παλαιότερα γνωστός ως *Lb. casei* subsp. *Rhamnosus* και ετυμολογικά αναφέρεται στη ραμνόζη. Ο *Lactobacillus rhamnosus* είναι ένα προαιρετικό ετεροζυμωτικό βακτήριο και περιλαμβάνεται με άλλα πολύ συγγενικά του είδη στην ομάδα *Lb. casei*. Τα κύτταρα έχουν τη μορφή ράβδων, μεμονωμένα ή σε κοντές αλυσίδες. Το στέλεχος τύπου είναι ATCC 7469. Η αλληλουχία του γονιδιώματος έγινε για LGG και *Lb. rhamnosus* 53103. Τα μεγέθη ήταν 3.010 και 3.005 Mb, αντίστοιχα. Το γονιδίωμα του *Lb. rhamnosus* ATCC 53103 είναι 5 kb μικρότερο από αυτό της LGG. Επιπλέον, μια ανάλυση ευθυγράμμισης της αλληλουχίας γονιδιώματος και των δύο στελεχών δείχνει ότι η περιοχή των 8,9 kb (συντεταγμένες γονιδιώματος 618415 έως 627294) του *Lb. rhamnosus* ATCC 53103 είναι ανεστραμμένο. Ο *Lactobacillus rhamnosus* έχει 45-47% περιεκτικότητα σε G+C (mol%) και την πεπτιδογλυκάνη τύπου λυσίνης-d-ασπαρτύλ. Ο *Lactobacillus rhamnosus* αναπτύσσεται τόσο στους 15 όσο και στους 45 °C και παράγει το ισομερές 1-γαλακτικού οξέος. Ζυμώνει υδατάνθρακες όπως αραβινόζη, κελλοβιόζη, εσκουλίνη, ριβόζη, σορβιτόλη και σακχαρόζη. Το LGG είναι μια από τις πιο εκτενώς μελετημένες και ευρέως χρησιμοποιούμενες καλλιέργειες προβιοτικών. Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι το πρωτέωμα του LGG που αναπτύχθηκε σε υδρολυμένο μέσο με βάση ορό γάλακτος διέφερε σημαντικά από αυτό του ίδιου στελέχους που αναπτύχθηκε σε πλούσιο εργαστηριακό μέσο MRS. Αυτό κατέδειξε ξεκάθαρα τη θεμελιώδη επίδραση των συνθηκών καλλιέργειας στα πρωτεομικά χαρακτηριστικά και ιδιότητες του στελέχους GG. Πράγματι, οι ιδιότητες πρόσφυσης του GG, που είναι σημαντικά προβιοτικά χαρακτηριστικά, εξαρτώνται από το μέσο καλλιέργειας.

(M. Calasso, M. Gobbetti, in *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, 2011)

1.6.6: *Lactobacillus sakei*

Το *Lactobacillus sakei* είναι ένα είδος βακτηρίου του γένους *Lactobacillus*. Είναι ένα προαιρετικά ετεροζυμωτικό ικανό να παράγει είτε αλκοόλη είτε γαλακτικό οξύ από σάκχαρα. Το *L. sakei* χρησιμοποιείται στην Ευρώπη για την παραγωγή παραδοσιακού ξηρού λουκάνικου ως ορεκτικό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη συντήρηση φρέσκου κρέατος (Bredholt, Nesbakken, & Holck, 2001). Είχε λοιπόν ενδιαφέρον η εφαρμογή του σε μαγειρεμένο ζαμπόν και λουκάνικα κατά την επεξεργασία στο εργοστάσιο. Όσον αφορά την επίδραση αλλοίωσης, έχουν αμελητέα επίδραση στις αισθητηριακές ιδιότητες των προϊόντων. Ωστόσο, μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό υψής λάσπης σε ωριμασμένα και επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος (Marshall & Bal'a, 2001).

1.6.7: *Lactobacillus salivarius*

Το *Lactobacillus salivarius* είναι ένα πολλά υποσχόμενο υποψήφιο προβιοτικό που συχνά απομονώνεται από τον γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου, των χοίρων και των πτηνών (GIT), πολλοί από τους οποίους είναι παραγωγοί μη τροποποιημένων βακτηριοσινών των υποκατηγοριών IIa, IIb και IId (O'Shea et al., 2011). Είναι ένας καλά χαρακτηρισμένος παραγωγός βακτηριοσίνης και προβιοτικός οργανισμός (Dobson et al., 2012).

1.7.1: Προβιοτικά LAB βακτήρια

Τα περισσότερα γαλακτοκομικά προϊόντα με προβιοτικά LAB βακτήρια είναι ζυμώμενα γάλατα. Το γάλα ζυμώνεται είτε με προβιοτικά LAB ή με την προσθήκη μιας βοηθητικής καλλιέργειας (Saxelin et al., 1999, Svensson, 1999). Τα βήματα της διαδικασίας είναι τα ίδια με αυτά της παραγωγής τυποποιημένων ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων (Lourens-Hatting and Viljoen, 2001). Στην παραγωγή ζυμωμένου γάλακτος το οποίο περιέχει προβιοτικά η επιλογή των προβιοτικών στελεχών καθώς και της βοηθητικής καλλιέργειας, εφόσον χρησιμοποιείται, είναι πολύ σημαντικός παράγοντας. Για επίδραση των LAB στην ανθρώπινη υγεία, πρέπει να ληφθούν υπόψη και άλλα ζητήματα, κυρίως τεχνολογικά όπως η καταλληλότητα για ανάπτυξη και επεξεργασία σε συμυκνωμένη καλλιέργεια, ανάπτυξη και επιβίωση στο γάλα που έχει υποστεί ζύμωση και ο αντίκτυπος στις αισθητηριακές ιδιότητες (Saxelin et al., 1999, Mattila-Sandholm et al., 2002). Στην παραγωγή

συνηθισμένων γαλακτών που έχουν υποστεί ζύμωση, οι εκκινητές παράγουν οξύ αμέσως μετά τον εμβολιασμό και με τον τρόπο αυτό αναστέλλεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών που μολύνουν τα βλαστικά κύτταρα και σπόρια που καταφέρνουν να επιβιώσουν από τη θερμική επεξεργασία στους 90°C. Η χρήση μιας βοηθητικής καλλιέργειας σε συνδυασμό με μια προβιοτική καλλιέργεια έχουν ως αποτέλεσμα ομοιόμορφη μείωση των ρύπων και των σπορίων. Αντίθετα όταν χρησιμοποιούνται αποκλειστικά προβιοτικά βακτήρια ως εκκινητές, η οξίνιση μπορεί να είναι πιο αργή και η ανάπτυξη μολυσματικών βακτηρίων θα πρέπει να ελέγχεται με διαφορετικά μέσα. Πιθανές λύσεις ή συνδυασμός αυτών θα μπορούσαν να αποτελούν η αύξηση του ρυθμού οξίνισης με τη χρήση ουσιών που προάγουν την ανάπτυξη έτσι ώστε να επιτραπεί η προσθήκη μεγάλων αριθμών βακτηρίων εκκινητών, ή η επιλογή προβιοτικών βακτηρίων που διεγείρουν την μεταξύ τους ανάπτυξη (Fondén et al., 2000; Lourens-Hatting and Viljoen, 2001). Η μείωση των των μολυσματικών βακτηρίων μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση γάλακτος UHT και εκτεταμένη απολύμανση του εξοπλισμού επεξεργασίας. Αυτή η διαδικασία έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην παραγωγή οξέοφιλου γάλακτος το οποίο έχει υποστεί ζύμωση. Το εκχύλισμα μαγιάς προστίθεται αρχικά στο γάλα ως διεγερτικό ανάπτυξης και στη συνέχεια το γάλα υποβάλλεται σε επεξεργασία UHT και προστίθενται περίπου 108 cfu/g *L. acidophilus*, με αποτέλεσμα ένα προϊόν με υψηλά επίπεδα προβιοτικών βακτηρίων και διάρκεια ζωής δυο εβδομάδων (Fondén, 1989). Όταν το πρόβλημα της μόλυνσης επιλύεται με τη χρήση μιας βοηθητικής καλλιέργειας στην παραγωγή προβιοτικών προϊόντων, πρέπει η βιωσιμότητα διαφόρων καλλιεργειών LAB να λαμβάνεται υπόψη. Το πιο σημαντικό ζήτημα είναι ότι όλα τα LAB που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι σε θέση να αναπτύσσονται μαζί χωρίς να αναστέλλουν το ένα το άλλο (Fondén et al., 2000). Όπως αξιολογήθηκε από Lourens-Hatting και Viljoen (2001), η επιβίωση ορισμένων προβιοτικών βακτηρίων επηρεάζεται από την ικανότητα της βοηθητικής καλλιέργειας να αποβάλλει το οξυγόνο και να προκαλεί χαμηλή μετα-οξίνιση. Ο ρυθμός εμβολιασμού των προστιθέμενων LAB θα πρέπει σε συνδυασμό με τις βέλτιστες συνθήκες επώασης, να έχει ως αποτέλεσμα ένα κατάλληλο επίπεδο προβιοτικών LAB 249 σε γαλακτοκομικά προϊόντα στο τελικό προϊόν, το οποίο θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 106 cfu/g (Hawley et al., 1959, Gilliland, 1989). Τα προβιοτικά LAB θα πρέπει κατά προτίμηση να προστίθενται στο γάλα πριν τη ζύμωση αφού η προσθήκη στη συνέχεια οδηγεί σε περιορισμένη επιβίωση. Ένα κατάλληλο τελικό pH εξασφαλίζεται τόσο με τη χρήση στελεχών με χαμηλή μετα-οξίνιση, όσο και με τη χρήση κατάλληλων συνθηκών ψύξης. Λαμβάνοντας υπόψη τους παραπάνω παράγοντες, έχει αποδειχτεί ότι τα γάλατα τα οποία έχουν υποστεί ζύμωση με επιλεγμένα προβιοτικά LAB μπορούν να αποθηκευτούν για αρκετές εβδομάδες με ελάχιστη απώλεια βιωσιμότητας (Saxelin et al., 1999). Σήμερα τα περισσότερα διαθέσιμα γαλακτοκομικά προϊόντα με προβιοτικά βακτήρια αποτελούνται ή αποτελούν γάλατα όπως το γιαούρτι. Ωστόσο άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα όπως τα συνηθισμένα «γλυκά» γάλατα, τυριά, παγωτά και γάλατα σε σκόνη μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως φορείς προβιοτικών LAB. Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα της χρήσης γαλακτοκομικών προϊόντων που δεν έχουν υποστεί ζύμωση ως φορείς

προβιοτικών είναι απουσία τελικών προϊόντων ζύμωσης. Τα οργανικά οξέα και οι γευστικές ενώσεις έχουν αρνητικό αντίκτυπο στην επιβίωση του προβιοτικού LAB. Στην παραγωγή γλυκού γάλακτος, προστίθενται προβιοτικά βακτήρια μετά τη θερμική επεξεργασία του γάλακτος. Οι αριθμοί των προστιθέμενων προβιοτικών LAB καθώς και η διάρκεια ζωής του προϊόντος περιορίζονται από την όξινη ζύμωση που συμβαίνει κατά την αποθήκευση σε ψύξη. Ο μέγιστος αριθμός προβιοτικών LAB που μπορεί να προστεθεί στο γλυκό γάλα εξαρτάται από τη θερμοκρασία και το χρόνο αποθήκευσης καθώς και του εκάστοτε στελέχους που χρησιμοποιείται. Το γλυκό γάλα οξεόφιλου είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα γλυκού γαλακτοκομικού προϊόντος με προσθήκη προβιοτικών *L. Acidophilus* (Speck, 1975, Young and Nelson, 1978). Το παγωτό αποτελεί έναν άλλο εξίσου κατάλληλο φορέα για τα προβιοτικά βακτήρια καθώς λόγω της αποθήκευσής του σε χαμηλές θερμοκρασίες επιτυγχάνεται μεγαλύτερη επιβίωση. Η επιβίωση δείχνει να εξαρτάται σημαντικά από το pH, αφού η επιβίωση είναι καλύτερη σε μείγματα παγωτού με ουδέτερου pH παρά σε παγωτά παρόμοια με τα παγωμένο γιαούρτι. Προϊόντα με τουλάχιστον 10⁷ cfu/g και με διάρκεια ζωής έως και οκτώ μήνες έχουν καταφέρει να παραχθούν (Hekmat and McMahon, 1992· Hagen and Narvhus, 1999; Davidson et al., 2000; Alampreese et al., 2002). Οι σκόνες γάλακτος με προβιοτικά βακτήρια έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής σε σύγκριση με προϊόντα που χαρακτηρίζονται από υψηλή υδάτινη δραστηριότητα. Έχει αποδειχτεί ότι τα περισσότερα προβιοτικά βακτήρια μπορούν να παραχθούν ως λυοφιλοποιημένες καλλιέργειες με 10¹² cfu/g με καλή αποθήκευση και έχει επιτευχθεί σταθερότητα ακόμα και στους 25°C (Saxelin et al., 1999). Αυτοί οι πληθυσμοί μπορούν να αναμειχθούν με γάλα σε σκόνη ή παρόμοια συστατικά προς την Παρασκευή αποξηραμένων προϊόντων διατροφής με κατάλληλες συγκεντρώσεις προβιοτικών βακτηρίων. Εναλλακτικά, μια συμπυκνωμένη προβιοτική καλλιέργεια μπορεί να προστεθεί σε συμπυκνωμένο γάλα και να ξηραθεί με ψεκασμό. Ωστόσο, οι αριθμοί των βιώσιμων προβιοτικών βακτηρίων είναι χαμηλότεροι και η σταθερότητα της αποθήκευσης των προϊόντων που παράγονται με ξήρανση με ψεκασμό είναι φτωχότερη από αυτή στα λυοφιλοποιημένα προϊόντα. (Gardiner et al., 2000). Το τυρί παρέχει συνθήκες LAB οι οποίες βοηθούν τόσο στην ανάπτυξη όσο και στην επιβίωση των βακτηρίων. Πολλά από τα LAB που βρίσκονται στο τυρί ανήκουν στο ίδιο είδος με τα προβιοτικά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* και *Lactobacillus plantarum* (Lindberg et al., 1996; Gardiner et al., 1998). Ένα στέλεχος *L. paracasei*, το *Lactobacillus* F19, το οποίο προέρχεται από το ανθρώπινο μικροβιακό GI και χρησιμοποιείται ως προβιοτικό βακτήριο, έχει απομονωθεί ακόμη και από τυρί που παράγεται από γάλα που δεν έχει εμβολιαστεί με αυτό το στέλεχος (Björneholm and Fondén, 2002). Η καταλληλότητα του τυριού ως φορέα προβιοτικών LAB βακτηρίων έχει αποδειχθεί τόσο για ώριμα τυριά όσο και για φρέσκα. (Gomes et al., 1995, Gardiner et al., 1998, Vinderola et al., 2000)

1.7.2: Ευεργετικές ιδιότητες των βακτηρίων LAB για την ανθρώπινη υγεία

Λόγω των πλεονεκτημάτων τους για την υγεία, οι γαλακτοβάκιλλοι και τα *bifidobacteria* έχουν αρχίσει να αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι των γιαουρτιών και των γαλατών που έχουν υποστεί ζύμωση, ιδιαίτερα μετά το πέρας των τελευταίων δύο δεκαετιών (Daly και Davis, 1998). Σημαντική ήταν η εξέλιξη που προέκυψε στον τομέα των λειτουργικών τροφίμων από τη χρήση προβιοτικών βακτηρίων και προβιοτικών υδατανθράκων, τα οποία βοηθούν στην ενίσχυση του μικροβιώματος που προάγει την υγεία στο έντερο. Όλο ένα και περισσότερο αυξάνονται τα στοιχεία τα οποία υποστηρίζουν την ιδέα πως η διατήρηση του υγιούς μικροβιώματος του εντέρου μπορεί να παρέχει προστασία από διάφορες γαστρεντερικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένων και γαστρεντερικών λοιμώξεων (GI), φλεγμονώδεις ασθένειες του εντέρου και ακόμη και ενάντια του καρκίνου. (Haenel και Bendig, 1975; Mitsuoka, 1982; Salminen et al., 1998). Το ανθρώπινο παχύ έντερο χαρακτηρίζεται από ένα πλούσιο δυναμικό μικροβίωμα το οποίο αποτελείται από τουλάχιστον 400-500 βακτηριακά είδη (Berg, 1996). Η διατήρηση ενός ισορροπημένου μικροβιακού οικοσυστήματος αποτελεί μια συνθήκη απαραίτητη για τις φυσιολογικές λειτουργίες του γαστρεντερικού σωλήνα καθώς και για την πρόληψη λοιμώξεων και τόνωση της ανοσολογικής απόκρισης ενός ξενιστή. Αρκετοί παράγοντες συμπεριλαμβανομένου του στρες, των θεραπειών με αντιβιοτικά και άλλων φαρμάκων μπορούν να επιφέρουν μεγάλες αλλαγές στο μικροβίωμα του γαστρεντερικού σωλήνα του ξενιστή, προδιαθέτοντάς τον έτσι σε διάφορες ασθένειες. Salminen et al., 1995, Schaafsma, 1995). Η υπερβολική συνταγογράφηση και η αλόγιστη ή λαθεμένη χρήση των αντιβιοτικών έχει οδηγήσει σε μια κατάσταση όπου όλο και περισσότεροι παθογόνοι μικροοργανισμοί έχουν γίνει ανθεκτικοί στα αντιβιοτικά. (Austin et al., 1999; Robredo et al., 2000). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) έχει υποδείξει εναλλακτικές στρατηγικές ελέγχου ασθενειών, όπως είναι η χρήση προβιοτικών (ζωντανά μικροβιακά σκευάσματα) με τεκμηριωμένα οφέλη ως προς την υγεία των καταναλωτών για διατήρηση ή βελτίωση της ισορροπίας του εντερικού μικροβιώματός τους. (Fuller, 1989) Μια άλλη οπτική θεωρεί πως μπορεί στο μέλλον να κριθούν απαραίτητα για την πρόληψη και τη θεραπεία ορισμένων λοιμώξεων. (Bengmark, 1998). Προκειμένου να ωφεληθεί η υγεία ενός καταναλωτή, ένα προβιοτικό βακτήριο πρέπει να φτάσει ζωντανό στο παχύ έντερό του. Θα πρέπει επίσης να έχει καλές τεχνολογικές ιδιότητες ώστε να μπορεί να παρασκευαστεί και να προστεθεί σε τρόφιμα χωρίς να χάσει τη βιωσιμότητα και τη λειτουργικότητά του, ή να δημιουργήσει δυσάρεστες γεύσεις ή υφές. Θα πρέπει να μπορεί να επιβιώσει κατά τη διέλευση του ανώτερου γαστρεντερικού σωλήνα και να βρίσκεται σε θέση να λειτουργεί στο περιβάλλον του εντέρου. Διάφορες δοκιμές σίτισης με διαφορετικά προβιοτικά στελέχη έχουν δείξει ότι το προβιοτικό στέλεχος συνήθως εξαφανίζεται από το γαστρεντερικό σωλήνα εντός δυο εβδομάδων μετά την λήψη της τελευταίας ποσότητας σκευάσματος. (Fukushima et al., 1998; Johansson et al., 1998; Donnet-Hughes et al., 1999; Alander et al., 1999, 2001). Μια ενδεικτική ημερήσια δοσολογία προβιοτικών υπολογίζεται μεταξύ 10^9 - 10^{11} cfu με τακτική λήψη. Η πλειοψηφία των

βακτηρίων που διαθέτουν προβιοτικές ιδιότητες ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*, τα οποία συναντώνται αρκετά αλλά θεωρούνται μη κυρίαρχα μέλη του ιθαγενούς μικροβιώματος του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα (Sghir et al., 2000; Walter et al., 2001). Το προβιοτικό δυναμικό διαφόρων στελεχών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* είναι πολυσυζητημένο θέμα σε πολλές έρευνες και μέσω αυτών υπάρχουν πολύ καλά τεκμηριωμένες τοποθετήσεις ως προς τη διαχείριση εντερικών διαταραχών όπως η δυσανεξία στη λακτόζη, η βρεφική γαστρεντερίτιδα και διάρροια που μπορεί να σχετίζεται με το ροταϊό και εντερικά συμπτώματα τα οποία μπορεί να σχετίζονται με αντιβιοτικά (κυρίως διάρροια) και τροφική αλλεργία σε μωρά (Salminen et al., 1998; Isolauri et al., 1999, 2001; Marteau et al., 2001; Kaur et al., 2002). Οι διαταραχές και ασθένειες αυτές έχουν συνδεθεί στενά με την ανισορροπία του ανθρώπινου εντερικού μικροβιώματος καθώς και με την αυξημένη διαπερατότητα του εντέρου (Salminen et al., 1996a,b). Εκτός από τις αναφερθέντες ευεργετικές επιδράσεις σε διαταραγμένο εντερικό μικροβίωμα, τα προβιοτικά έχουν τη δυνατότητα να ρυθμίζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις. Έχουν τη δυνατότητα να χαμηλώνουν τα επίπεδα ορισμένων βιοδεικτών όπως για παράδειγμα επιβλαβείς ενζυμικές δραστηριότητες κοπράνων και να προσδίδουν θετικά αποτελέσματα έναντι των επιφανειακών συμπτωμάτων του καρκίνου της ουροδόχου κύστης και του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (McFarland, 2000). Άλλοι τομείς που μπορεί να υπάρξει συνεισφορά προβιοτικής διατροφικής διαχείρισης περιλαμβάνουν την ανακούφιση του φλεγμονώδους εντέρου καθώς και συμπτώματα της νόσου IBD (Inflammatory Bowel Disease) και συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου IBS (Irritable Bowel Syndrome), εμβόλια βλεννογόνου και ανοσολογική τροποποίηση, έλεγχος λοιμώξεων και αδρανοποίηση πολυανθεκτικών μικροβίων, θεραπεία της κολπίτιδας, πρόληψη μετάδοσης του AIDS και άλλων σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων, μείωση της χοληστερόλης στο αίμα καθώς και αντιμεταλλαξιογόνος και αντικαρκινογόνος δράση. (Alvarez-Olmos and Oberhelman, 2001, Kopp-Hoolihan, 2001, Marteau et al., 2001, Kaur et al., 2002). Κάποια από τα προβιοτικά που μελετήθηκαν σε κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους περιλαμβάνουν το *L. rhamnosus* GG, το οποίο θεωρείται ένα από τα πιο μελετημένα στελέχη, τα *Bifidobacterium lactis* Bb-12, *L. casei* Shirota, *L. plantarum* DSM9843 (299V), *Lactobacillus reuteri* και *Lactobacillus johnsonii* LJ-1 (Saarela et al., 2000). Κατά την αξιολόγηση των επιδράσεων των προβιοτικών ως προς την προαγωγή της υγείας, είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη ότι όλα τα προβιοτικά στελέχη είναι διαφορετικά. Ακόμη και στελέχη που αντιπροσωπεύουν τα ίδια τα είδη χαρακτηρίζονται συνήθως από διαφορετικές ιδιότητες. Αρκετές από τις δράσεις και τις ιδιότητες των προβιοτικών βακτηρίων είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη πριν από τη διεξαγωγή κλινικών δοκιμών. Μερικές από αυτές συνοψίζονται παρακάτω:

- ❖ Προέλευση (κατά προτίμηση ανθρώπινη).
- ❖ Ασφάλεια.
- ❖ Βιωσιμότητα.
- ❖ Δραστηριότητα κατά τη μεταφορά μέσω χρήσης οχημάτων.
- ❖ Αντοχή στο όξινο περιβάλλον και αντοχή στη χολή.
- ❖ Προσκόλληση στον επιθήλιο ιστό του εντέρου.
- ❖ Ικανότητα παραμονής στον γαστρεντερικό σωλήνα.
- ❖ Παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών.
- ❖ Ικανότητα διέγερσης της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή.
- ❖ Ικανότητα μεταβολής των μεταβολικών δραστηριοτήτων.

(Salminen et al., 1996)

Αρκετές κλινικές μελέτες που διεξάχθηκαν τα προηγούμενα χρόνια με θέμα την αποτελεσματικότητα των πριβιοτικών, αντιμετώπισαν το πρόβλημα της ανακριβούς ταυτοποίησης προβιοτικού προϊόντος καθώς και άλλα προβλήματα που αφορούσαν τον καθορισμό της σταθερότητας και της βέλτιστης δοσολογίας, όλα αυτά σε μελέτες που έγιναν σε μικρές πληθυσμιακές ομάδες και με πιο περιορισμένη τεχνογνωσία. Μελλοντικά ακολούθησαν σημαντικές προσπάθειες προκειμένου να διορθωθούν αυτές οι ασάφειες και η ανεπάρκεια στοιχείων σχετικών με τις επιδράσεις των προβιοτικών στην προαγωγή της υγείας έχει μειωθεί μέσω ερευνών που περιλαμβάνουν τυχαίες δοκιμές με placebo. Στην τωρινή εποχή υπάρχει πληθώρα στοιχείων σχετικά με τις ευεργετικές επιδράσεις των προβιοτικών στην ανθρώπινη υγεία. Ωστόσο τα αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί μελετώντας πληθυσμιακές μονάδες που διαθέτουν κάποια πάθηση (Salminen et al., 1998).

1.7.3: Βελτιστοποίηση της σταθερότητας των προβιοτικών LAB

Κάποιες από τις πιο σημαντικές δυνατότητες που πρέπει να διαθέτουν οι καλλιέργειες εκκίνησης είναι η βιωσιμότητα και η δυνατότητα να είναι μεταβολικά ενεργές κατά τη διάρκεια της ζύμωσης αλλά και να είναι σε θέση να αναπτυχθούν και να παράγουν τις επιθυμητές αισθητήριες ενώσεις κατά την επεξεργασία. Παρόλα αυτά η βιωσιμότητά τους μετά τη ζύμωση δεν είναι απαραίτητη. Αντίθετα τα προβιοτικά

είναι εξ ορισμού ζωντανά βακτήρια και το εκάστοτε προϊόν πρέπει να περιέχει ένα βέλτιστο επίπεδο των καθορισμένων προβιοτικών στελεχών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Παρά το γεγονός ότι αρκετές μελέτες απέδειξαν ότι τα μη βιώσιμα προβιοτικά μπορούν κι αυτά να έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην ανθρώπινη υγεία όπως π.χ. καλύτερη ανοσοποιητική διαμόρφωση και δέσμευση καρκινογόνων ουσιών (Ouwehand and Salminen, 1998), η καλή βιωσιμότητα θεωρείται σε γενικότερη βάση μια σημαντική προϋπόθεση ως προς τη βέλτιστη λειτουργικότητα (Saarela et al., 2000). Η διασφάλιση ποιότητας των προβιοτικών προϊόντων βασίζεται αρκετά σε τεχνικές ανίχνευσης βιώσιμων κυττάρων. Σε μελέτες σε πολλά υπάρχοντα προϊόντα που εξετάστηκαν, φανερώθηκαν ελλείψεις στον ολικό αριθμό κυττάρων αλλά και στην επισήμανση ορισμένων προβιοτικών προϊόντων στην αγορά (Hamilton-Miller and Shah, 2001, Temmerman et al., 2002), γεγονός το οποίο υποδεικνύει την αναγκαιότητα για βελτιστοποίηση των παραμέτρων που μπορούν να επηρεάσουν τη βιωσιμότητα των προβιοτικών. Η βιωσιμότητα των προβιοτικών μπορεί να βελτιωθεί με τη βελτιστοποίηση των μέσων ανάπτυξης. Τεχνικές ενθυλάκωσης με χρήση ανθεκτικών στελεχών αμύλου ή αλγινικών ως προστατευτικά υλικά είναι κάποιες από τις μεθόδους προσθήκης που έχουν αναπτυχθεί με σκοπό την ενίσχυση της σταθερότητας των προβιοτικών (Hamilton-Miller and Shah, 2001; Temmerman et al., 2002). Η μέθοδος της ενθυλάκωσης έχει αυξήσει την βιωσιμότητα των προβιοτικών σε μοντέρνους τύπους προϊόντων όπως είναι το frozen yoghurt. Συνδυασμοί πρεβιοτικών (ζυμώσιμοι, μη εύπεπτοι υδατάνθρακες) μαζί με τα προβιοτικά ονομάζονται συνβιοτικά (synbiotics) (Roberfroid, 1998). Τα πρεβιοτικά μπορεί να επιφέρουν ευνοϊκή επίδραση στη σταθερότητα επιλεγμένων προβιοτικών. Ωστόσο η έννοια των synbiotics είναι μια έννοια σχετικά καινούργια και οι μελέτες οι οποίες αφορούν συγκεκριμένα την αλληλεπίδραση πρεβιοτικών και προβιοτικών είναι ελάχιστες.

1.7.4: Τάσεις και καινοτομίες για το μέλλον

Ζούμε πλέον σε μια εποχή όπου οι καταναλωτές τείνουν να στρέφουν το ενδιαφέρον τους προς την αθλητική ζωή και την ευεξία και προσπαθούν να αποκομίσουν το μέγιστο από τη διατροφή τους. Όχι μόνο έχουν επίγνωση σχετικά με τη διατροφική αξία και τις ευεργετικές επιδράσεις ορισμένων τροφίμων, αλλά έχουν επίσης στρέψει το ενδιαφέρον τους στον εντοπισμό και τη χρήση τοξικών συστατικών σε τρόφιμα καθώς και ασθένειες που μπορεί να προκύψουν από αυτά όπως γαστρεντερικές διαταραχές. Από αυτές τις τάσεις λοιπόν σαφέστατα έχουν αρχίσει να λαμβάνονται μέτρα για την κάλυψη της τρέχουσας ζήτησης για ασφαλή, θρεπτικά τρόφιμα υψηλής ποιότητας, κατά προτίμηση παραγόμενα με παραδοσιακές μεθόδους και με τη χρήση πρώτων υλών υψηλής ποιότητας και με όσο το δυνατόν λιγότερη επεξεργασία η οποία μπορεί να περιλαμβάνει αφύσικες τεχνικές και τεχνοτροπίες προκειμένου να διατηρηθεί ο αρχικός οργανοληπτικός χαρακτήρας των εκάστοτε τροφών. Οι

λειτουργικές καλλιέργειες εκκίνησης λειτουργούν προς όφελος της ανάδειξης των οργανοληπτικών, αισθητηριακών και θρεπτικών ιδιοτήτων των τροφίμων και ταυτόχρονα συμβάλλουν στην ελαχιστοποίηση και αναστολή των τροφιμογενών παθογόνων μικροβίων. Οι αναδύομενες τάσεις στις επιστημονικές εξελίξεις υπόσχονται να οδηγήσουν σε τρόφιμα που θα έχουν υποστεί ζύμωση τα οποία θα διαθέτουν ισχυρές ταυτότητες και βελτιωμένη ποιότητα και ασφάλεια, αλλά και μεγάλης διατροφικής αξίας και συνεπώς μεγάλης απήχησης στον καταναλωτή. Οι λειτουργικές καλλιέργειες εκκίνησης αποτελούν καλλιέργειες οι οποίες διαθέτουν τουλάχιστον μία εγγενή λειτουργική ιδιότητα. Αυτό μπορεί να είναι ένα συντηρητικό, μια οργανοληπτική ιδιότητα ή τεχνολογική, που να συνεισφέρουν στην προαγωγή της υγείας. Όσο για τα προβιοτικά, πρόκειται να κρατήσουν το ρόλο τους ως ένα πολύ σημαντικό θρεπτικό συστατικό και στην πορεία να εντοπιστούν νέα στελέχη, οδηγώντας έτσι στην ανάπτυξη νέων προϊόντων με τη δυνατότητα κάλυψης των αναγκών ορισμένων ομάδων καταναλωτών. Μπορούν να αναπτυχθούν νέοι, μη εύπεπτοι υδατάνθρακες με ελεγχόμενους ρυθμούς ζύμωσης και με τη συμβολή της χρήσης πρεβιοτικών θα επέλθει νέα διαμόρφωση στη σύνθεση του μικροβιώματος, καθώς και των ειδικών διαιτητικών ινών που πρόκειται να οδηγήσουν στην ενίσχυση της απόδοσης του μικροβιώματος και της λειτουργίας του εντέρου. Το πλέον σύνηθες και πιο εφαρμοσμένο μοτίβο περιλαμβάνει τη χρήση πολλαπλών, καθορισμένων καλλιεργειών εκκίνησης με σκοπό τη βελτίωση και την καλύτερη δυνατότητα ελέγχου των βιομηχανικών διεργασιών ζύμωσης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα υπάρχουν στη βιομηχανία γάλακτος και επιδοφόρα αποτελέσματα βρίσκονται στα σκαριά για την επεξεργασία των δημητριακών. Μελλοντικές δυνατότητες για την παραγωγή νέων συστατικών για εξιδανικευμένα και διατροφικά βελτιστοποιημένα τρόφιμα, τα οποία προάγουν την υγεία των καταναλωτών μέσω των μικροβιακών αντιδράσεων αναγράφονται παρακάτω:

- ❖ Μεγαλύτερη ποικιλία και βελτίωση λειτουργικών καλλιεργειών εκκίνησης.
- ❖ Επίδραση των συνθηκών ζύμωσης των τροφίμων στη λειτουργικότητα των μικροβίων.
- ❖ Προβλεπτική μοντελοποίηση και προσομοίωση της συμπεριφοράς και της λειτουργικότητας των μικροβίων.
- ❖ Στοχευμένη διαλογή και επιλογή λειτουργικών καλλιεργειών εκκίνησης, μικροβιολογική ανάλυση, φυλογενετική τοποθέτηση.
- ❖ Μελέτες οικολογίας και τεχνολογίας μικτών καλλιεργειών εκκίνησης LAB.
- ❖ Επίδραση των ιδιοτήτων των τροφίμων στη λειτουργικότητα των μικροβίων.
- ❖ Μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών στον γαστρεντερικό σωλήνα και βιοδείκτες για την αξιολόγηση.
- ❖ Ανάπτυξη προβιοτικών και βιοδραστικών ενώσεων για την πρόληψη των ασθενειών του γαστρεντερικού σωλήνα, γαστρεντερικών λοιμώξεων και αλλεργιών.
- ❖ Διασφάλιση της σταθερότητας των προβιοτικών και σε νέους τύπους εφαρμογών τροφίμων με ανάπτυξη εφικτών τεχνολογιών (π.χ. ανάπτυξη διεργασιών και υλικών για μικροενθυλάκωση).

- ❖ Ανάλυση της λειτουργικότητας των μικροβίων τροφίμων με βάση τη γονιδιωματική.
- ❖ Ανάλυση της λειτουργικότητας των τροφίμων με βάση τη μεταβολομική και τη φυσιολομική λειτουργικότητα των μικροβίων.
- ❖ Μεταβολική μηχανική και ανάλυση ροής για βελτιωμένη λειτουργικότητα καινοτόμων καλλιεργειών εκκίνησης.
- ❖ Αποδοχή των καινοτόμων λειτουργικών καλλιεργειών εκκίνησης από τους καταναλωτές.

(Smit G. 2003, Dairy Processing: Improving quality)

1.8.1: Μικροβιακές αντιδράσεις και χρώμα τυριού

Ένα από τα σημαντικότερα κριτήρια αποδοχής αλλά και επιλογής τυριού από τους καταναλωτές είναι το χρώμα. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για τα κόκκινα είδη τυριών τα οποία διακρίνονται για το χαρακτηριστικό κόκκινο πορτοκαλί μικροβιακό στρώμα στην επιφάνειά τους. Για αρκετά χρόνια πιστευόταν από την επιστημονική κοινότητα ότι το *Brevibacterium linens*, ένα gram θετικό ραβδοειδές βακτήριο χαρακτηριστικό της οικογένειας *Brevibacteriaceae*, λόγω της ικανότητάς του να παράγει καροτενοειδή, ήταν ο κύριος μικροοργανισμός υπεύθυνος για την ανάπτυξη του χρώματος. Η συμβολή των λευκών ειδών *B. linens* δεν μπορεί να μην ληφθεί υπόψη όταν ο μικροοργανισμός έχει αναπτυχθεί σε μεγάλο αριθμό. Ωστόσο λόγω της υποκυριαρχίας του σε πολλά παραδοσιακά τυριά είναι απίθανο να ευθύνεται για την ανάπτυξη του χρώματος του φλοιού. Τη δεδομένη στιγμή πιστεύεται ότι ο χρωματισμός του τυριού προκύπτει από πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών της μικροχλωρίδας της επιφάνειας του τυριού. Οι πορτοκαλί αποχρώσεις είναι πιθανό να προέκυψαν λόγω αλληλεπιδράσεων κίτρινων βακτηρίων όπως το *Anthrobacter arilatis*, το *Microbacterium spp.* και άλλων μικροοργανισμών όπως οι σταφυλόκοκκοι και οι μικρόκοκκοι πορτοκαλί χρώματος ή και η ζύμη. Ένα παράδειγμα αποτελεί η παραγωγή χρωστικής σε λευκά είδη *B. Linens* που βρέθηκε αν ποικίλει συναρτήσει της μαγιάς που χρησιμοποιήθηκε για τη διαδικασία της αποξίνισης. Επομένως δύο τυριά με παρόμοια βακτηριακή κατανομή και πληθυσμό βρέθηκαν να έχουν διαφορετικό χρώμα επιφάνειας, γεγονός που υποδηλώνει ότι η μελάγχρωση των βακτηρίων για κάθε είδος διαφέρει ανάλογα με τους ζυμομύκητες που υπάρχουν σε ένα περιβάλλον όπου λαμβάνει χώρα ένα πολύπλοκο σύνολο αντιδράσεων από ανακατεμένες πληθυσμιακές μονάδες.

(R. Di Cagno, M. Gobbetti, in Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), 2011,),(V. Crow, B. Curry, in Encyclopedia of Dairy Sciences, 2002)

1.8.2: Χρήση των μικροβιακών αντιδράσεων ως βελτιωτικό γεύσης

Τα χαρακτηριστικά της γεύσης του τυριού οφείλονται σε τέσσερις υποκαταστάτες οι οποίοι είναι η γλυκόλυση, η χρήση κιτρικών, η πρωτεόλυση και η λιπόλυση. Η παραγωγή γευστικών ενώσεων είναι προϊόν των ενζύμων αποικοδόμησης γάλακτος κάθε στελέχους, καθώς και της συμπλήρωσης μεταβολικών οδών μεταξύ στελεχών, γεγονός που είναι πιθανό να οδηγήσει σε αύξηση της ποσότητας και εμπλουτισμό της ποικιλίας των γεύσεων αλλά τη διαμόρφωση της χαρακτηριστικής γεύσης ορισμένων ειδών τυριού. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η λειτουργική ποικιλομορφία, η οποία σχετίζεται στενά με την πολυπλοκότητα του μικροβιώματος του τυριού, είναι η κύρια συνθήκη για την πολλαπλότητα και πολυπλοκότητα ενός γευστικού συνόλου το οποίο παράγεται κατά την ωρίμανση. Η ενίσχυση του σχηματισμού γεύσης έχει δυο βασικούς στόχους επωφελεί τη μείωση του χρόνου ωρίμανσης καθώς και τη βελτίωση της αισθητικής ποιότητας του τυριού. Προκειμένου να επιτευχθούν τα δύο παραπάνω μια απαραίτητη πρώτη δράση είναι η επιλογή νέων συμπληρωματικών καλλιεργειών που χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με την καλλιέργεια εκκίνησης ή την καλλιέργεια ωρίμανσης. Οι προστιθέμενες αυτές καλλιέργειες μπορούν να ενισχύσουν τον σχηματισμό γεύσης παράγοντας ένζυμα που συμπληρώνουν τις μεταβολικές οδούς που οδηγούν σε αρωματικές ενώσεις. Για παράδειγμα η παραγωγή θειοοξικού-S-μεθυλεστερά ενισχύθηκε όταν μια ζύμη *Kluyveromyces lactis*, η οποία είναι ικανή να παράγει εστέρες και να συσσωρεύει ακυλο CoA συγκαλλιεργήθηκε με *B. linens* παράγοντας μεθανοθειόλη. Υπήρξε επίσης ένα πρόσφατο ενδιαφέρον για τη μελέτη των γευστικών ικανοτήτων αρνητικών Gram βακτηρίων όπως το *Proteus vulgaris* ή το *Psychrobacter sp.* που έχουν απομονώθηκαν από διάφορα είδη παραδοσιακών τυριών. Ένας άλλος μηχανισμός τροποποίησης και σχηματισμού γεύσης είναι η χρήση αυτολυτικών καλλιεργειών LAB ή βακτηριογόνων καλλιεργειών ή συνδυασμός με βακτηριοσίνες για προώθηση λύσης του LAB οι παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση της πρωτεόλυσης και έχουν ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό γεύσης.

(R. Di Cagno, M. Gobbetti, in Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), 2011.),(V. Crow, B. Curry, in Encyclopedia of Dairy Sciences, 2002)

1.9: Εκκινητές

Οι εκκινητές για φυσικό ορό γάλακτος χρησιμοποιούνται για αρκετά είδη τυριών και κυρίως για πολλά είδη που αποτελούν προϊόντα Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ). Συνήθως κυριαρχούνται από θεرمόφιλα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB), αλλά δεν είναι καθόλου ασυνήθιστο να εμφανιστούν και άλλα είδη μεσόφιλων βακτηρίων LAB.

(R. Di Cagno, M. Gobbetti, in Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), 2011,),(V. Crow, B. Curry, in Encyclopedia of Dairy Sciences, 2002)

1.10 Σημασία της θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία είναι ο κυριότερος παράγοντας που σχετίζεται με τη μεταβλητότητα της σύνθεσης των μικροβίων. Μαγειρική θεραπεία σε συνδυασμό με την ψύξη του ορού γάλακτος οδηγούν στην επιλογή μιας χαρακτηριστικής μικροχλωρίδας, η οποία αποτελείται από θεرمόφιλο, όξινο και μέτρια ανθεκτικό στη θερμότητα LAB. Λόγω των αλλαγών των μεταβλητών παραμέτρων αυτών είναι πολύ πιθανό να επηρεαστεί η ανάπτυξη των τελικών πληθυσμών.

(R. Di Cagno, M. Gobbetti, in Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), 2011,),(V. Crow, B. Curry, in Encyclopedia of Dairy Sciences, 2002)

1.11 Μικροβιακό δυναμικό

Η παραγωγή τυριού χαρακτηρίζεται από δυναμικές μικροβιακές αλλαγές κατά το πέρασ της οποίας τα βακτήρια παίζουν πρωταρχικό ρόλο στον καθορισμό της ποιότητας. Πληθώρα διαφορετικών πληθυσμών μικροβίων συνυπάρχουν και αλληλεπιδρούν συμβάλλοντας μέσω του μεταβολισμού τους στην ανάπτυξη γεύσης, αρώματος, υφής, καθώς και διάρκειας ζωής και ασφάλειας. Πιο συγκεκριμένα, το μικροβιακό περιβάλλον των τυριών μακράς ωρίμανσης που παράγονται από νωπό γάλα και με χρήση ορού γάλακτος, στηρίζονται στην αλληλεπίδραση του ολικού συμπλέγματος των αρχικών βακτηρίων γαλακτικού οξέος (SLAB) και μη εκκινητών τύπου βακτηρίων γαλακτικού οξέος (NSLAB). Οι SLAB συνεισφέρουν στα πρωταρχικά στάδια της τυροκομίας, ενώ οι NSLAB, οι οποίοι είναι ικανοί να χρησιμοποιήσουν κι άλλες πηγές άνθρακα πέρα από τη λακτόζη, μετατρέπονται στην κυρίαρχη μικροχλωρίδα των τυριών ωρίμανσης και είναι υπεύθυνοι για τη γεύση και την υφή των εν λόγω τυριών λόγω των πρωτεολυτικών και λιπολυτικών δραστηριοτήτων τους. Τα NSLAB είναι κυρίως μεσόφιλοι μικροοργανισμοί οι οποίοι προέρχονται από το νωπό γάλα ή το περιβάλλον και η παρουσία τους μπορεί να προκαλέσει μεταβλητότητα στο σύμπλεγμα κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης.

Για το λόγο αυτό, επωφελούμαστε από την ανάπτυξη αποτελεσματικού NSLAB το οποίο προέρχεται από τον φυσικό ορό γάλακτος, από ακατέργαστο γάλα ή και από το περιβάλλον. Χαρακτηρίζεται ως ζωτικής σημασίας το να ελαχιστοποιηθεί η μικροβιακή μεταβλητότητα κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης έτσι ώστε να επιτευχθούν τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού. Δεν είναι απίθανη ωστόσο η εμφάνιση αρκετών επιμολύνσεων με δυνατότητα αλλοίωσης, στις περισσότερες φορές με αρνητικές επιπτώσεις στην ποιότητα του τελικού προϊόντος.

R. Di Cagno, M. Gobbetti, in *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, 2011,),(V. Crow, B. Curry, in *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2002)

1.12. Χρήση 16S rRNA sequencing

Η χρήση γονιδίων 16S rRNA μέσω προσδιορισμού αλληλουχίας υψηλής απόδοσης (HTS) έχει εμφανιστεί ως ένα καινούργιο εργαλείο ανεξάρτητο από το ολικό μικροβίωμα ενός δείγματος, το οποίο μπορεί να επιτρέψει την ποσοτική διερεύνηση της δομής διαφόρων μικροβιακών κοινοτήτων οι οποίες πέρα από το γεγονός ότι χαρακτηρίζονται πολύ ευαίσθητες στον εντοπισμό, αποτελούν επίσης υποκυρίαρχους πληθυσμούς του συνόλου. Αρκετές μελέτες έχουν εμφανίσει ότι η πηγή του γάλακτος καθώς και η επεξεργασία του (νωπό ή παστεριωμένο), αλλά και η προσθήκη διαφόρων συστατικών έχει μεγάλη επιρροή στη σύνθεση του μικροβιώματος του τελικού προϊόντος καθώς και στις τελικές του ιδιότητες. Παρόλα αυτά περισσότερες πληροφορίες είναι απαραίτητες σχετικά με τη λειτουργία και τη δραστηριότητα του μικροβιώματος κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας. Ελάχιστες είναι οι μελέτες που βασίζονται στη μεταγραφική ανάλυση και έχουν εφαρμοστεί στο κέντρο του τυριού με στόχο να διερευνηθούν οι λειτουργίες του μικροβιώματος που απαντάται στο περιβάλλον του.

Alessandria, V., Ferrocino, I., de Filippis, F., Fontana, M., Rantsiou, K., Ercolini, D., & Cocolin, L. (2016). Microbiota of an Italian Grana-like cheese during manufacture and ripening, unraveled by 16S rRNA-based approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(13), 3988–3995. <https://doi.org/10.1128/AEM.00999-16>

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Γενικές πληροφορίες για το NGS

2.1: Ιστορικά στοιχεία

Η αλληλούχιση πρώτης γενιάς έβαλε τους θεμέλιους λίθους για την εξέλιξη της επιστήμης των γονιδίων και στο παρών στάδιο η αλληλούχιση επόμενης γενιάς ή αλλιώς next generation sequencing (NGS), αποτελεί ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο για την ταυτοποίηση και σύνθεση γονιδίων. Η χρήση του NGS δίνει τη δυνατότητα σύνθεσης ολόκληρων γονιδιωμάτων ευκαριωτών, παρέχει πληροφορίες για το γενετικό τους υλικό και έχει τη δυνατότητα επεξεργασίας τεράστιου όγκου δεδομένων. Διαδικασίες σύνθεσης και ταυτοποίησης που μπορεί να διαρκούσαν μήνες αποτελούν πλέον ζήτημα λίγων ωρών και σε συνδυασμό με το χαμηλό της κόστος η τεχνολογία NGS βρίσκει πλέον ευρεία εφαρμογή σε μεγάλη ποικιλία ερευνών και αποτελεί σημαντικό εργαλείο επίλυσης επιστημονικών προβλημάτων. Ύστερα από την μεγάλη επέκταση της αλληλούχισης υψηλής απόδοσης, οι PCR-amplified αλληλουχίσεις 16S ομαδοποιούνται με κύριο κριτήριο την ομοιότητα για τη δημιουργία λειτουργικών ταξινομικών μονάδων (OTUs) και αντιπροσωπευτικές αλληλουχίσεις OTUs σε αντίθεση με αλληλουχίσεις οι οποίες βασίζονται στα αποτελέσματά τους σε βάσεις δεδομένων για την εξαγωγή συμπερασμάτων πιθανής ταξινόμησης. Αν αποτελεί μέθοδο χαρακτηριστικά μεγάλης ισχύος και είναι αρκετά εργονομική, η συγκεκριμένη χρήση της 16S απαιτεί ορισμένες παραδοχές, όπως για παράδειγμα το γεγονός πως ότι αλληλουχίες με > 95% ταυτότητα αντιπροσωπεύουν το ίδιο γένος, ενώ αλληλουχίες με > 97% ταυτότητα αντιπροσωπεύουν το ίδιο είδος. Οι αλληλουχίες 16S έχουν επίσης αξιοποιηθεί με τη χρήση χαμηλής απόδοσης μεθόδων για τη διάκριση των στελεχών, τα οποία πολλές φορές λαμβάνουν και την ονομασία υποείδη, και ταξινομούνται με βάση τους πολυμορφισμούς εντός του γονιδίου. Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτατα για την ανίχνευση και τον εντοπισμό στελεχών κλινικής σημασίας ή όταν υπάρχει άμεση, σταθερή συσχέτιση με άλλα τμήματα του γονιδιακού βακτηριακού απλότυπου με στόχο την πρόβλεψη φαινοτυπικών χαρακτηριστικών. Με τον τρόπο αυτό, οι ακριβείς και πλήρεις αλληλουχίσεις 16S μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μια τεράστια ποικιλία εφαρμογών. Μέχρι πρόσφατα, ωστόσο, ακριβείς, πλήρους μήκους 16S αλληλουχίες ήταν πέρα από το πεδίο εφαρμογής των υψηλών απόδοσης πλατφορμών αλληλούχισης. Οι παραδοχές των τεχνολογιών τρίτης γενιάς υπόσχονται υψηλές αποδόσεις αλληλουχίσεων 16S πλήρους γονιδιώματος.

Κυκλική αλληλουχία συναίνεσης CCS (Circular Consensus Sequencing), συνδυασμένη με πρότυπους, εξελιγμένους αλγόριθμους αποθορυβοποίησης για την αφαίρεση των PCR και σφάλματος του αλληλούχισης, μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως μπορούμε να έχουμε εκατομμύρια αναγνώσεις αλληλουχιών σε ένα ολόκληρο γονίδιο οι οποίες προσφέρουν υψηλής πιστότητας διακρίσεις αλληλουχιών οι οποίες μπορεί να διαφέρουν μόνο κατά ένα νουκλεοτίδιο. Μαζί, αυτές οι τεχνολογικές και

μεθοδολογικές πρόοδοι σημαίνουν ότι για πρώτη φορά καθίσταται να αξιοποιηθεί πλήρως το διακριτικό δυναμικό της 16S σε μια υψηλής απόδοσης μέθοδο. Οι μέθοδοι μοριακής βιολογίας αντικαθιστούν όλο και περισσότερο τις κλασικές μικροβιολογικές μεθόδους για τη διερεύνηση μικροβιακών κοινοτήτων στα τρόφιμα. Ειδικότερα, νέες εξελίξεις στην τεχνολογία αλληλούχισης έχουν καταστήσει τη χρήση της τεχνολογίας NGS περισσότερο προσιτή και ευρέως εφαρμόσιμη. Πιο συγκεκριμένα, για την 16S rRNA ανάλυση, η αλληλουχία γονιδιακών αμπλικονίων γίνεται ολοένα και περισσότερο ευρέως διαδεδομένη για τη διερεύνηση της σύνθεσης των βακτηριακών κοινοτήτων σε διάφορα οικοσυστήματα. Παρ' όλα αυτά, η βελτιστοποίηση και η επικύρωση τέτοιων προσεγγίσεων αποτελεί ένα δύσκολο έργο, ιδίως επειδή πολλές διαφορετικές πτυχές του αντικειμένου πρέπει να ληφθούν υπόψη αξιόπιστα αποτελέσματα. Για παράδειγμα, η σύγκριση των πιο ευρέως χρησιμοποιούμενων πλατφορμών αλληλούχισης, βάσεων δεδομένων και ταξινόμησης αλγορίθμων που εφαρμόζονται σε κοινότητες οι οποίες που αποτελούνται από βακτηριακά είδων που απαντώνται σε γαλακτοκομικά προϊόντα αποκάλυψε σημαντικές διαφοροποιήσεις στις παρατηρούμενες βακτηριακές κοινότητες. Επιπλέον, οι βακτηριακές ποικιλίες που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία των βακτηρίων είναι πολύ διαφορετικές και για αυτό το λόγο η ταξινόμηση των ειδών που παρουσιάζονται στο περιβάλλον πολύπλοκων δειγμάτων αποτελεί μια πρόκληση που εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Μερικοί από αυτούς είναι οι επιλεγμένοι εκκινητές, η μεταβλητότητα της 16S rRNA ανάλυσης στην συγκεκριμένη περιοχή του γονιδίου, η επιλεγμένη μέθοδος και βάση δεδομένων από τον αναλυτή. Βάσεις δεδομένων με βάση το οικοσύστημα για την ανάθεση ταξινομίας μπορούν να επιτύχουν υψηλότερη ανάλυση σε επίπεδο ειδών, όπως φαίνεται από τη βελτίωση στην ταξινόμηση σε επίπεδο ειδών που επιτυγχάνεται με μια ειδική και χειροκίνητα επιμελημένη βάση δεδομένων για την ανάλυση γάλακτος και τυριού σε σύγκριση με πιο γενικές βάσεις δεδομένων. Εκτός από τη σύγκριση των πλατφορμών αλληλούχισης και της βιοπληροφορικής ανάλυσης, είναι σχετικά πολύπλοκη η επικύρωση των αποτελεσμάτων της NGS με άλλες προσεγγίσεις, καθώς οι περισσότερες άλλες μέθοδοι δεν παρέχουν συγκρίσιμες σε βάθος δεδομένα. Για παράδειγμα, μια μελέτη που συγκρίνει την ανάλυση με παραδοσιακή καλλιέργεια και την ανάλυση με τη χρήση μεθόδου NGS σε κοπρανώδη και υποφαρυγγικά δείγματα υγείων παιδιών έδειξε πως με την NGS αναγνωρίστηκαν 7 έως 20 φορές περισσότερα μοναδικά είδη. Ωστόσο μια μεγάλη έρευνα με θέμα τη μελέτη των μικροβιακών κοινοτήτων σε λίμνες στη Βραζιλία ανέφερε μια αδύναμη συσχέτιση και σημαντικές διαφορές στην ταξινομική ποιότητα και αφθονία των δεδομένων μεταξύ των δύο μεθόδων. Ένας εγγενής περιορισμός της μεθόδου αλληλούχισης με τη χρήση NGS είναι η πληροφορία της σύνθεσής της από την άποψη των της σχετικής αφθονίας των επιμέρους μελών της της κοινότητας (λειτουργικές ταξινομικές μονάδες [OTUs], παραλλαγές της αλληλουχίας των αμπλικονίων [ASVs], και ταξινομικές ομάδες). Ωστόσο, η ποσοτικοποίηση των διαφορετικών μελών μιας πολύπλοκης μικροβιακής κοινότητας είναι ζωτικής σημασίας για την ανάλυση της διαφορικής αφθονίας προκειμένου να υπάρξει μια ευρύτερη και πιο ουσιαστική κατανόηση της δυναμικής της μικροβιακής κοινότητας και γενικότερα του μικροβιώματος στο περιβάλλον των

τροφίμων καθώς αυτή μπορεί να αποτελέσει παράγοντα αλλοίωσης της γεύσης και της ποιότητας προϊόντων ζύμωσης. Η real time PCR (qPCR) είναι μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την ακριβή ποσοτικοποίηση βακτηρίων σε πολύπλοκα οικοσυστήματα. Η βασικότερη δυσκολία που τίθεται για δυσκολία που τίθεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό ειδικών ταξινομήσεων σε πολύπλοκα συστήματα είναι το γεγονός πως πρέπει να σχεδιαστούν από το μηδέν πολύ συγκεκριμένα συστήματα εκκινήτων, το οποίο είναι μια αρκετά ανορθόδοξη διαδικασία για ένα εργαστήριο επιπροσθέτως ο μικρός όγκος δεδομένων που εισέρχονται για ανάλυση με συμβατικά συστήματα qPCR είναι ένας περιορισμός που ανεβάζει το κόστος της αρκετά. Η ανάπτυξη της υψηλής απόδοσης qPCR (HTqPCR) οδήγησε στη μείωση του φόρτου εργασίας και στο συνολικό κόστος εξοπλισμού του εργαστηρίου και άνοιξε αρκετά νέα πεδία εφαρμογών. Ήταν ένα εργαλείο το οποίο χρησιμοποιήθηκε ευρέως στη μάχη για την αντιμετώπιση της νόσου covid-19. Επιμέρους πεδία εφαρμογών περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό των λειτουργικών γονιδίων σε εδάφη, την ποσοτικοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών σε περιττώματα και σε εμβολιασμένα δείγματα νερού, έρευνα για την μικροβιακή ποικιλομορφία στο έντερο χοιριδίων και η ποσοτικοποίηση των βακτηρίων *riophages* των ειδών *Lactococcus* και *Leyconostoc spp.* στο τυρί και στο γάλα. Στην μικροβιολογία τροφίμων η qPCR και το NGS βρίσκουν όλο και μεγαλύτερη εφαρμογή τα τελευταία χρόνια καθώς έχουν τεράστια συμβολή στην κατανόηση της μικροβιακής σύνθεσης διαφόρων τροφίμων. Τα τρόφιμα που αποτελούν προϊόντα ζύμωσης συνήθως αποτελούνται από έναν αρκετά περιορισμένο αριθμό ειδών “κλειδιά” το οποία επιλέγονται κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παραγωγής και η περιορισμένη παρουσία θρεπτικών συστατικών και άλλοι παράγοντες όπως το pH και η θερμοκρασία καθιστούν τις συνθήκες αυτές κατάλληλες για τη μελέτη των βακτηριακών κοινοτήτων με χρήση qPCR. Παρόλα αυτά η χρήση της HT-qPCR αποτελεί πολύ πρόσφατη επιλογή ανάλυσης για συστηματικές αναλύσεις προϊόντων ζύμωσης σε σχέση με την NGS η οποία εδώ και χρόνια εφαρμόζεται ευρέως.

(Matthias Dreier, Marco Meola, H el ene Berthoud, Noam Shani, Daniel Wechsler and Pilar Junier, High-throughput qPCR and 16S rRNA gene amplicon sequencing as complementary methods for the investigation of the cheese microbiota, 2022)

2.1.1.: Γενικές πληροφορίες για τις μεθόδους NGS

Η αλληλούχιση του DNA, αναπτύχθηκε από κάτοχο δύο βραβείων νόμπελ Laureate Frederick Sanger και την ομάδα επιστημόνων του το 1977, φέρνοντας την επανάσταση όχι μόνο για τις βιολογικές επιστήμες, αλλά και για την ανθρώπινη κοινωνία γενικότερα, λόγω της ευρείας χρήσης της σχετιζόμενης με

τεχνολογίες που σχετίζονται με το DNA. Για παράδειγμα, ορισμένες ασθένειες και μορφές καρκίνου μπορούν να ανιχνευθούν με τη χρήση τσιπ DNA, γεγονός που τα προηγούμενα χρόνια αποτελούσε σενάριο επιστημονικής φαντασίας. Η Sanger αλληλούχιση πρώτης γενιάς με τερματισμό αλυσίδας (Chain termination Sanger DNA sequencing) αναπτύχθηκε σημαντικά με τη σήμανση με φθορισμό και την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση σε ένα πλήρως αυτοματοποιημένο όργανο. Η μέθοδος αυτή μπορεί να διαβάσει με ακρίβεια 700-900 bp(base pairs) και επομένως αποτελεί μέθοδο ιδανική καλή την αλληλούχιση μεμονωμένων γονιδίων. Παρά το γεγονός ότι 96 μεμονωμένα δείγματα μπορούν να εκτελεστούν ταυτόχρονα με αυτή τη συγκεκριμένη μέθοδο, ο χρόνος εκτέλεσης και το κόστος είναι υψηλά και η απόδοση σε σχέση με τον όγκο δεδομένων είναι χαμηλή όταν εφαρμόζεται για αλληλούχιση σε όλο το γονιδίωμα. Το 2005, μια νέα τεχνολογία που αναφέρεται ως αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS) οδηγεί στον προσδιορισμό εκατομμυρίων αλληλουχιών DNA με τη χρήση μίας μόνο διαδικασίας. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της πυροαλληλούχισης (pyrosequencing), το 454 Genome Sequencer (<http://www.454.com>) έχει τη δυνατότητα να παράγει περίπου 700 Mbp από από μία μόνο εκτέλεση. Η μεταγενέστερη ανάπτυξη τεχνολογιών έφερε διάφορες πλατφόρμες NGS, συμπεριλαμβανομένου ενός αναστρέψιμου διερμηνευτή με βάση τον διερμηνευτή Illumina Genome Analyser, HiSeq και MiSeq (<http://www.illumina.com>), SOLiD με βάση τη σύνδεση ενός Genome Sequencer (<http://www.lifetechnologies.com>) και το Ion Personal Genome Machine με βάση τον ημιαγωγό (PGM) και Ion Proton (<http://www.lifetechnologies.com>). Αυτές οι πλατφόρμες NGS παρέχουν μικρές αναγνώσεις (50-700 bp), αλλά παράγουν μαζικές ποσότητες δεδομένων έως και 600 Gbp (π.χ. HiSeq 2500). Singlemolecule μέθοδοι αλληλούχισης (Harris et al., 2007- Korlach et al., 2008- Pushkarev et al., 2009) εισήχθησαν τον αναλυτή γονιδιώματος HeliScope(<http://www.helicosbio.com>), PacBio RSII (<http://www.pacificbiosciences.com>) και Starlight (<http://www.lifetechnologies.com>), τα οποία δεν απαιτούν κάποιο στάδιο ενίσχυσης του DNA. Παρόλα αυτά, οι νέες λεγόμενες τεχνολογίες "αλληλούχισης τρίτης γενιάς" είναι επί του παρόντος ακόμη υπό ανάπτυξη. Η NGS έχει καταφέρει να ελαχιστοποιήσει σε τεράστιο σημείο το κόστος λειτουργίας και έχει γίνει πλήρης απλούστευση της διαδικασίας εφόσον είναι πλέον αυτοματοποιημένη. Μια σύνοψη των βασικότερων χαρακτηριστικών των σημαντικότερων πλατφορμών NGS παρουσιάζεται στον πίνακα 2.1 . Εν τέλη, το συμπέρασμα που απορρέει είναι πως η ανάλυση γονιδιώματος αποτελεί μια χρονοβόρα και δαπανηρή διαδικασία. Επομένως, οι πόροι για την υποστήριξη τέτοιων μελετών είναι αρκετά περιορισμένοι. Ωστόσο, έχουν προκύψει αρκετές τεχνολογικές εξελίξεις, όπως είναι οι πιο απλουστευμένες μέθοδοι προετοιμασίας βιβλιοθηκών γενετικού υλικού οι οποίες προσφέρουν μεγαλύτερη ταχύτητα και υψηλές αποδόσεις. Αυτές οι εξελίξεις έχουν επεκτείνει την εμβέλεια της γονιδιωματικής επιστήμης, που κάποτε περιοριζόταν στον άνθρωπο και σε διάφορα είδη-μοντέλα, σε πολλά άλλα είδη, συμπεριλαμβανομένων των φωτοσυνθετικών ευκαρυωτικών φυκών. Μετά την επανάσταση της αλληλούχισης που έφερε ο Sanger, η τεχνολογία NGS έχει φτάσει σε σημείο να επηρεάζει διάφορους τομείς της

επιστήμης κάνοντας δυνατή τη διερεύνηση και αντιμετώπιση θεμελιωδών ερωτημάτων παρέχοντας μεγαλύτερη διορατικότητα στην κοινωνία.

Platform/Current company	Sequencing method	Amplification method	Read length (bp)	Capacity for paired reads?	Error rate for raw reads (%)	Reagent cost per Mb	Yield (Mb) / run
Sanger	Chain terminator	PCR	600–900	Yes	0.001–1.0	\$1500	0.01
454 GS FLX +/Roche	Pyrosequencing	Emulsion PCR	600–800	Yes	3–4	\$12.4	700
Solexa GAIIx/Illumina	Synthesis	Solid-phase PCR	150	Yes	0.3–3.8	\$0.12	96 000
SOLiD4/Life Technologies	Ligation	Emulsion PCR	50	Yes	0.1–1.0	\$0.12	71 400
HeliScope/Helicos	Synthesis	Single-molecule template	25–35	Yes	3–7	N/A	28 000
Ion Torrent (316 chip)/Life Technologies	Synthesis	Emulsion PCR	100–400	No	~1	\$7.5	>1 000
PacBio/Pacific Biosciences	Synthesis	Real-time single-molecule template	964 average	No	0.001	~\$180	5–10
Starlight/Life Technologies	Synthesis	Single-molecule sequencing with quantum dots	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Πίνακας 2.1, Σύγκριση μεταξύ πλατφορμών NGS (Glenn 2011 & Harisson, Kinder 2011)

2.2: Βασικές πηγές της γενετικής πληροφορίας

❖ Την πιο γνωστή και ευρέως μελετημένη μορφή γενετικής πληροφορίας αποτελεί το γονιδίωμα (Genome). Στα πεδία της μοριακής βιολογίας και της γενετικής, το γονιδίωμα είναι το σύνολο των γενετικών πληροφοριών ενός οργανισμού. Αποτελείται από νουκλεοτιδικές αλληλουχίες DNA (ή RNA σε ιούς RNA). Το πυρηνικό γονιδίωμα περιλαμβάνει γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και γονίδια που δεν κωδικοποιούν, άλλες λειτουργικές περιοχές του γονιδιώματος, όπως ρυθμιστικές αλληλουχίες, και συχνά ένα σημαντικό ποσοστό "άχρηστου" DNA χωρίς εμφανή λειτουργία. Σχεδόν όλοι οι ευκαρυώτες διαθέτουν μιτοχόνδρια και ένα μικρό μιτοχονδριακό γονιδίωμα.

❖ Το μεταγραφόγραμμα (Transcriptome) δεν αποτελεί παρά ένα μέτρο της κυτταρικής κατάστασης. Περαιτέρω απογραφές του κυτταρικού περιεχομένου είναι επίσης αρκετά σημαντικές. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται και οι μετρήσεις των τελικών προϊόντων των μονοπατιών, όπως νουκλεοτίδια, αμινοξέα, λιπαρά οξέα και άλλοι συμπαράγοντες, καθώς και των δομικών στοιχείων από τα οποία προέρχονται τα αναβολικά μονοπάτια. Επιπλέον, η μεταβολωμική προσπαθεί να ποσοτικοποιήσει επίσης την ποσότητα κάθε ενδιάμεσου προϊόντος κάθε μονοπατιού στο κύτταρο.

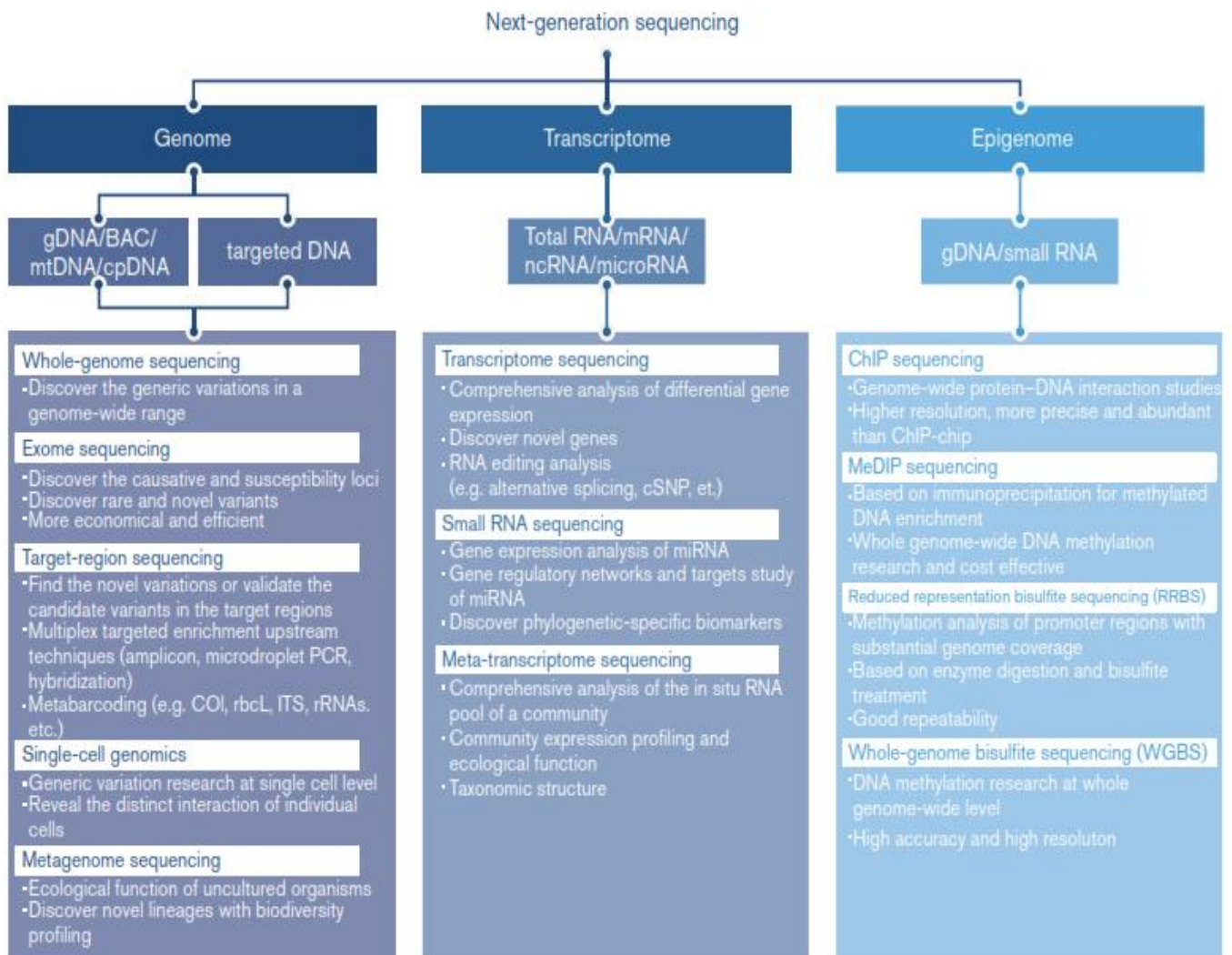
Επιπλέον, τα μέσα μέτρησης του πρωτεώματος συνεχίζουν να εξελίσσονται, αν και οι μετρήσεις επικεντρώνονται στην αποπρωτεΐνη και όχι στο λειτουργικό ολοένζυμο. Μαζί, αυτά τα μέτρα υποδηλώνουν τόσο την υγεία όσο και την ικανότητα του κυττάρου σε ένα συγκεκριμένο στάδιο. Η έλευση της φαινομικής, κατά την οποία χιλιάδες πειράματα φαινοτυπικής χρονικής πορείας εκτελούνται σε μορφή πλάκας μικροτιτλοδότησης, επιτρέπει την ακριβή μέτρηση αυτών των ικανοτήτων. Μαζί, έχει αναπτυχθεί ένα ολοκληρωμένο σύνολο εργαλείων για την παρακολούθηση της κυτταρικής κατάστασης. Αυτό είναι το μεταγραφόγραμμα, το οποίο βρίσκεται στην πρώτη γραμμή αυτών των εξελίξεων τα τελευταία 15 χρόνια.

(R.A. LaRossa, in Brenner's Encyclopedia of Genetics Second Edition, 2013)

❖ Η επιγενετική (Epigenomics) είναι η μελέτη των φαινοτυπικών αλλαγών που συμβαίνουν απουσία τροποποίησης της αλληλουχίας του DNA. Η περιβαλλοντική επιγενετική περιγράφει τη σχέση μεταξύ ενδογενών και εξωγενών παραγόντων (όπως η έκθεση σε χημικές ουσίες) και του επιγονιδιώματος (Epigenome). Οι αλλαγές στο επιγονιδίωμα είναι σταθερές, κληρονομικές και αποτελούν στόχο για τους περιβαλλοντικούς τοξικούς παράγοντες. Ο όρος επιμεταλλαγή αναφέρεται σε μια κληρονομική αλλαγή στη γονιδιακή έκφραση που δεν επηρεάζει τη δομή του ζεύγους βάσεων του DNA. Το επιγονιδίωμα είναι ευάλωτο σε απορρύθμιση ανά πάσα στιγμή, αλλά είναι ιδιαίτερα ευάλωτο κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής, όταν ο ρυθμός σύνθεσης του DNA είναι υψηλός. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν μεταβολές στα πρότυπα έκφρασης των microRNAs, τροποποιήσεις των πρωτεϊνών ιστονών και μεθυλίωση του DNA. Αυτοί οι επιγενετικοί μηχανισμοί περιγράφονται. Τα microRNAs είναι μικρά τμήματα μη κωδικοποιημένου RNA που ρυθμίζουν τη μετα-μεταγραφική έκφραση του mRNA. Οι ιστόνες είναι μια ομάδα οκτώ πυρηνικών πρωτεϊνών που συσκευάζουν και συμπιέζουν σφιχτά τη χρωματίνη του DNA σε μικρότερα, συσπειρωμένα τμήματα που ονομάζονται νουκλεοσώματα και περιέχουν 146 ζεύγη βάσεων. Τροποποιήσεις των ιστονών, όπως η ακετυλίωση και η φωσφορυλίωση, μεταβάλλουν την πρωτεΐνη ιστόνη στην N-τελική ουρά, αλλάζοντας τη δομή των νουκλεοσωμάτων και ενεργοποιώντας ή καταστέλλοντας τη μεταγραφή. Η μεθυλίωση του DNA είναι μια καλά περιγραφόμενη επιγενετική τροποποίηση που περιλαμβάνει την προσθήκη μιας μεθυλομάδας στο νουκλεοτίδιο κυτοσίνη όταν προηγείται της γουανίνης, συχνά στην περιοχή του υποκινητή. Τα μεθυλιωμένα τμήματα του DNA είναι πιο σφιχτά συσπειρωμένα, κρύβοντας την περιοχή του υποκινητή και περιορίζοντας τη γονιδιακή έκφραση. Σε λιγότερο μεθυλιωμένες περιοχές, ο υποκινητής είναι ανοικτός, επιτρέποντας τη μεταγραφή του DNA. Η μεθυλίωση του DNA είναι ο μηχανισμός αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X κατά την εμβρυογένεση στα θηλυκά. Η ανώμαλη μεθυλίωση του DNA του χρωμοσώματος X εμπλέκεται στο σύνδρομο εύθραυστου X. Ενώ η μεθυλίωση του DNA δεν είναι εντελώς στατική κατά τη διάρκεια της ζωής, μεγάλο μέρος του επιγονιδιώματος εγκαθίσταται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Μια από τις καλύτερα περιγραφόμενες επιγενετικές διαδικασίες είναι η γονιδιωματική αποτύπωση. Η

γονιδιωματική αποτύπωση λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της πρώιμης ανάπτυξης και περιλαμβάνει την αποσιώπηση του ενός γονικού αλληλόμορφου που οδηγεί σε μονοπαλίνδρομη γονιδιακή έκφραση. Η απορρύθμιση της γονιδιωματικής αποτύπωσης, που ενδεχομένως οφείλεται σε ανώμαλη μεθυλίωση του DNA, οδηγεί σε διαταραχές όπως το σύνδρομο Angelman, το σύνδρομο Prader-Willi και το σύνδρομο Beckwith-Wiedemann και έχει συνδεθεί με τον αυτισμό και τον καρκίνο αργότερα στη ζωή. Τα γονίδια με αποτύπωση αποτελούν ιδανικά μοντέλα για τη μελέτη επιγενετικών τροποποιήσεων. Καθώς η αποτύπωση συμβαίνει νωρίς στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, οι επιγενετικές προσαρμογές είναι πιθανό να έχουν σημαντική επίδραση. Για παράδειγμα, ενήλικες που συνελήφθησαν κατά τη διάρκεια της ολλανδικής πείνας του Β' Παγκοσμίου Πολέμου (1944-1945) επιδεικνύουν εκτεταμένες και επίμονες αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA των αποτυπωμένων τόπων του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα-2 (IGF-2), με ποικίλες βιολογικές λειτουργίες. Αυτά τα γονίδια είναι γνωστό ότι είναι σημαντικοί ρυθμιστές της ανάπτυξης και οι επιγενετικές τροποποιήσεις εμπλέκονται στην ανάπτυξη μεταβολικών και καρδιαγγειακών παθήσεων στους ενήλικες. Οι απόγονοι που συνελήφθησαν κατά τη διάρκεια της πείνας ανέπτυξαν συχνότερα αυτές τις μεταβολικές και καρδιαγγειακές παθήσεις ως ενήλικες.

(Richard J. Martin MBBS, FRACP, Fanaroff and Martin's Neonatal-Perinatal Medicine, 2020)

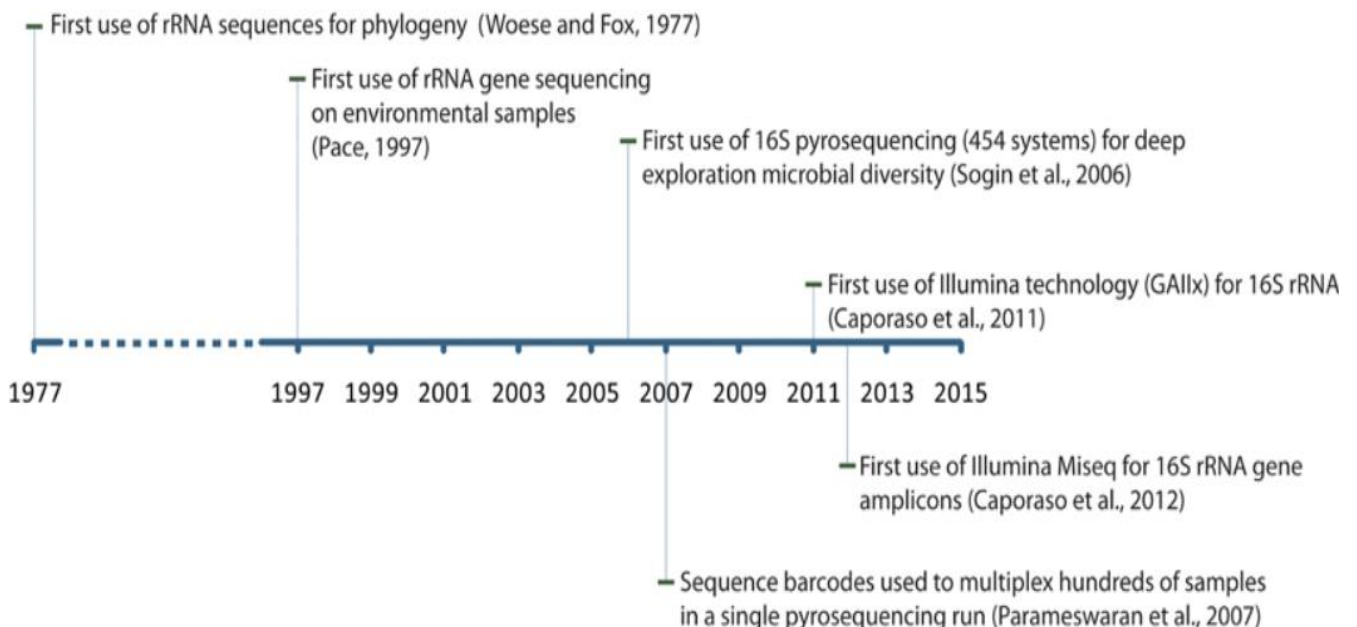


Διάγραμμα ροής 2.1, NGS και εφαρμογές με βάση τις τρεις πηγές γενετικής πληροφορίας: γονιδιώματα, μεταγραφώματα και επιγονιδιώματα. (Kyeong Mi Kim, Hwan Su Yoon, Jun-Hyung Park, Debashish Bhattacharya 2014)

2.3: 16S rRNA sequencing

Η αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA είναι μια δημοφιλής μέθοδος για τη σκιαγράφηση και τη σύγκριση μικροβιακών κοινοτήτων. Τα πρωτόκολλα και οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται, ωστόσο, διαφέρουν σημαντικά όσον αφορά τους εκκινητές ενίσχυσης, τους εκκινητές αλληλούχισης, τις τεχνολογίες αλληλούχισης καθώς και το ποιοτικό φιλτράρισμα και την ομαδοποίηση. Ο τρόπος με τον οποίο επηρεάζονται τα αποτελέσματα από αυτές τις επιλογές και ο βαθμός στον οποίο τα δεδομένα που παράγονται με διαφορετικά πρωτόκολλα μπορούν να συγκριθούν με νόημα, είναι συχνά άγνωστο. Οι μεγάλες ανακαλύψεις στην τεχνολογία αλληλούχισης νουκλεϊκών οξέων και στις μοριακές τεχνικές κατά τις τελευταίες δεκαετίες οδήγησαν τον τομέα της αλληλούχισης του γονιδίου 16S rRNA το οποίο αποτελεί πλέον τη ραχοκοκαλιά της σύγχρονης μικροβιακής οικολογίας. Ο Carl

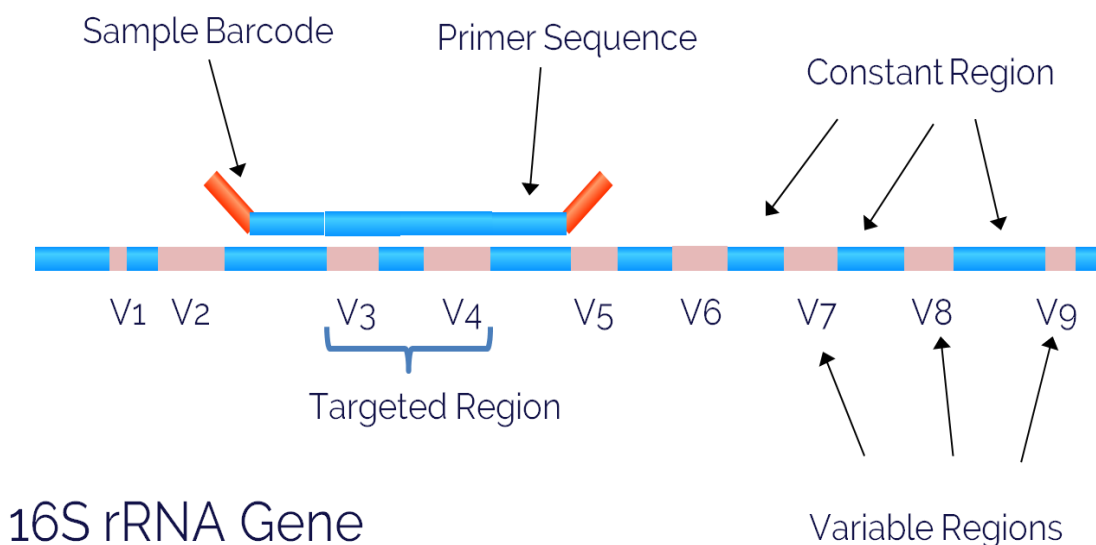
Woese ήταν ο πρώτος που ανέφερε τη χρήση των γονιδίων 16S rRNA ως δείκτη για τη διερεύνηση της βακτηριακής φυλογένεσης (Woese and Fox, 1977). Το έργο του αποτέλεσε τη βάση για αυτό που θα γινόταν τότε ένα νέο παράδειγμα για τη μικροβιακή οικολογία. Τις επόμενες δεκαετίες παρατηρήθηκε εκτεταμένη χρήση της τεχνολογίας Sanger για την αλληλούχιση των γονιδίων 16S rRNA, η οποία κορυφώθηκε με την απόδειξη ότι οι μικροοργανισμοί μπορούσαν να μελετηθούν (αλληλούχιση) απευθείας στο περιβάλλον τους, χωρίς την ανάγκη καλλιέργειας στο εργαστήριο (Pace, 1997). Αυτό αποτύπωσε μια διαρκή επίδραση στην κατανόηση της μικροβιακής ποικιλομορφίας. Με τάξεις μεγέθους υψηλότερη απόδοση αλληλούχισης, η τεχνολογία αλληλούχισης 454 θα αντικαθιστούσε τελικά τα συστήματα Sanger για τις έρευνες μικροβιακών πληθυσμών με την αλληλούχιση σύντομων τμημάτων του γονιδίου 16S rRNA (αντί γονιδίων rRNA πλήρους μήκους) (Sogin et al., 2006) και επέτρεψε την πολυπλεξία εκατοντάδων δειγμάτων σε μία μόνο εκτέλεση αλληλούχισης (Sogin et al., 2006; Parameswaran et al., 2007). Η εταιρεία Illumina κυκλοφόρησε αργότερα ένα όργανο αλληλούχισης ακόμη υψηλότερης απόδοσης (Genome Analyzer IIx) που ξεπέρασε σε μεγάλο βαθμό τα συστήματα 454 όσον αφορά την απόδοση και την ποιότητα των αναγνώσεων και επέτρεψε την αλληλούχιση βιβλιοθηκών υψηλής πολυπλεξίας (>100 δείγματα) ταυτόχρονα (Caporaso et al., 2011). Σήμερα, το σύστημα Illumina MiSeq έχει καθιερωθεί σταθερά ως το όργανο επιλογής για την αλληλούχιση των αμπλικονίων του γονιδίου 16S rRNA (Caporaso et al., 2012)



Εικόνα 2.1, Χρονολογικό διάγραμμα της εξέλιξης των πλατφορμών NGS (Julien Tremblay, Kanwar Singh, Alison Fern, Edward S. Kirton, Tanja Woyke, Janey Lee, Feng Chen, Jeffery L. Dang, Shaomei He and Susannah G. Tringe, Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing, 2015)

Η αλληλούχιση 16S rRNA αποτελεί πλέον μια από τις κορυφαίες μεθόδους για φυλογενετικές μελέτες. Ο μεγάλος βαθμός επιλογής της από τους αναλυτές μεταξύ άλλων μεθόδων αλληλούχισης οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην ευρεία διαθεσιμότητα εγκαταστάσεων PCR και NGS, όπως το MRDNA. Τι είναι όμως η αλληλούχιση 16S rRNA, και γιατί ποιους λόγους αξίζει η επιλογή των μεθόδων αλληλούχισης 16S έναντι άλλων μεθόδων αλληλούχισης DNA; Η αλληλούχιση 16S rRNA αναφέρεται στην αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA που κωδικοποιεί τη μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος (small subunit ή SSU) που βρίσκεται σε προκαρυώτες όπως τα βακτήρια και τα αρχαία. Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που καθιστούν το γονίδιο 16S rRNA τον τέλειο στόχο για την ολοκλήρωση των μελετών ταξινόμησης ή φυλογένεσης. Επειδή το γονίδιο 16S κωδικοποιεί το SSU του προκαρυωτικού ριβοσώματος, οι ερευνητές μπορούν να βασιστούν στο γεγονός ότι το γονίδιο-στόχος τους θα είναι παρόν σε κάθε κύτταρο. Το γονίδιο 16S περιέχει τόσο εξαιρετικά διατηρούμενες περιοχές όσο και μεταβλητές περιοχές. Η παρουσία των εξαιρετικά διατηρούμενων περιοχών επιτρέπει στους ερευνητές να σχεδιάζουν ζεύγη εκκινητών που θα ενισχύουν με ακρίβεια και αξιοπιστία την μεταβλητή περιοχή 16S της επιλογής τους. Η παρουσία των μεταβλητών περιοχών παρέχει στους ερευνητές τη δυνατότητα να διακρίνουν μεταξύ στενά συγγενών γενών ή ειδών που ανιχνεύονται στα δείγματά τους. Το συνολικό μέγεθος του γονιδίου 16S rRNA είναι σχετικά μικρό. ~1500bp. Ενώ η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδίου 16S είναι δύσκολη λόγω των περιορισμών του μήκους ανάγνωσης πολλών πλατφορμών NGS, η αλληλούχιση μιας ή περισσότερων μεταβλητών περιοχών είναι σχετικά γρήγορη και προσιτή. Δύο από τις πιο ζητούμενες αναλύσεις μας για την αλληλούχιση του 16S rRNA είναι η 27F-519R (περιοχή V1-V3) και η 515F-806R (περιοχή V4).

(Julien Tremblay, Kanwar Singh, Alison Fern, Edward S. Kirton, Tanja Woyke, Janey Lee, Feng Chen, Jeffery L. Dang, Shaomei He and Susannah G. Tringe, Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing, 2015)



16S rRNA Gene

Εικόνα 2.2, Διατηρούμενες και μεταβλητές περιοχές του γονιδίου 16S rRNA (lcsiences.com)

2.4: Illumina NGS

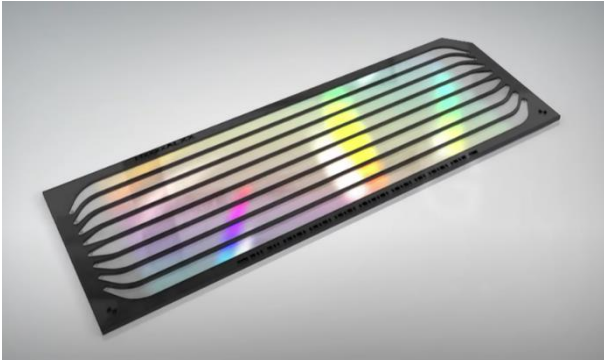
Η τεχνολογία Illumina NGS αποτελεί μια διαφορετική προσέγγιση από την κλασική μέθοδο Sanger chain-termination. Πλεονεκτεί έναντι αυτής αξιοποιώντας την τεχνολογία προσδιορισμού αλληλουχίας με σύνθεση και παρακολούθηση της προσθήκης ορισμένων νουκλεοτιδίων με ταυτόχρονη αντιγραφή του DNA με μαζικά παράλληλο τρόπο. Η τεχνολογία NGS δημιουργεί μάζες δεδομένων που περιέχουν πληροφορίες αλληλούχισης του DNA με τρόπο τέτοιο που την καθιστά λιγότερο δαπανηρή και χρονοβόρα από την κλασική μέθοδο αλληλούχισης Sanger. Η τεχνολογία Illumina έχει τη δυνατότητα να παράγει δεδομένα που κυμαίνονται από 300 kilobases έως και πολλαπλές terabases σε μια μόνο εκτέλεση ανάλογα με τον παρεχόμενο εξοπλισμό. (1kb=1.000 bases)

2.4.1: Προετοιμασία Βιβλιοθήκης

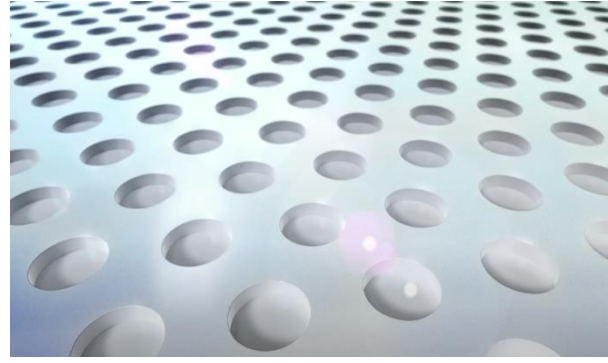
Η προετοιμασία της βιβλιοθήκης(library) αποτελεί βασικό στάδιο για την επιτυχία εργασιών με χρήση NGS, καθώς αυτή αποτελεί την βάση δεδομένων της διεργασίας. Σε αυτό το στάδιο τα δείγματα DNA ή RNA προετοιμάζονται κατάλληλα ώστε να είναι συμβατά με έναν προσδιοριστή (sequencer) αλληλουχίας. Ο πιο διαδεδομένος τρόπος για τη δημιουργία μιας βιβλιοθήκης είναι με κατακερματισμό του DNA και προσθήκης εξειδικευμένων προσαρμογέων(adapters) και στα δύο άκρα της αλυσίδας. Στην Illumina, οι προσαρμογείς αυτοί περιέχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες οι οποίες επιτρέπουν στα θραύσματα του DNA να συνδεθούν στην πλακέτα ροής(flow cell). Τα θραύσματα στην πορεία μπορούν να ενισχυθούν και να καθαριστούν. Για μεγαλύτερη εξοικονόμηση μπορούμε να συνδυάσουμε πολλές βιβλιοθήκες μαζί κατά τον ίδιο κύκλο αλληλούχισης. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως multiplexing. Κατά τη διάρκεια της σύνδεσης του προσαρμογέα προστίθενται αλληλουχίες κλειδιά μοναδικές για κάθε βιβλιοθήκη, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη διάκριση των βιβλιοθηκών μεταξύ τους κατά την ανάλυση δεδομένων.

2.4.2: Αρχή λειτουργίας του Flow cell

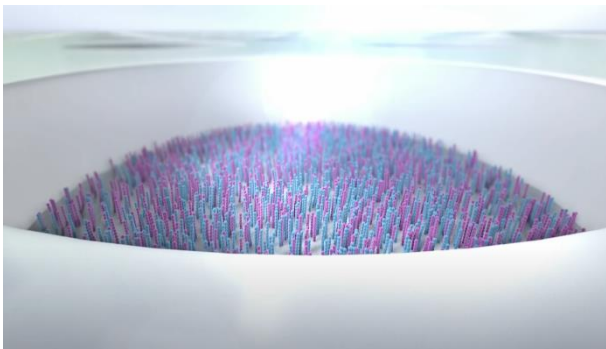
Οι πλακέτες ροής ή αλλιώς flow cells αποτελούν καινοτομία της Illumina για πειράματα αλληλούχισης που ενισχύουν σε τεράστιο βαθμό τον όγκο δεδομένων που εισάγονται, επεξεργάζονται και τελικώς της εξερχόμενης πληροφορίας που λαμβάνεται στο πέρας της διαδικασίας του sequencing. Η μηχανική του flow cell στηρίζεται στα δισεκατομμύρια nano Wells, δηλαδή μικρούς υποδοχείς οι οποίοι έχουν καθορισμένη θέση, σχήμα και κατανομή σε όλη την έκταση του flow cell. Οι υποδοχείς αυτοί δίνουν τη δυνατότητα ακριβές ελέγχου του μεγέθους των ομάδων που θα προκύψουν κατά τη διαδικασία του multiplexing καθώς και της κατανομής τους στο χώρο του flow cell, επιτρέποντας έτσι μεγάλης ακρίβειας αναλύσεις δειγμάτων υψηλών συγκεντρώσεων. Μερικά πλεονεκτήματα ακόμα είναι η μεγαλύτερη ποσότητα εξαγωγής δεδομένων σε μικρότερους χρόνους, περισσότερα “χτυπήματα” και μεγάλη μείωση του χρόνου για μια ολοκληρωμένη ανάλυση. Το flow cell συντάσσεται από νάνο-υποδοχείς οι οποίοι είναι χαραγμένοι και κατανεμημένοι στην επιφάνεια ενός γυάλινου υποστρώματος. Κατά την εκκίνηση της διαδικασίας, οι εκκινητές DNA διανέμονται αποκλειστικά σε ξεχωριστούς υποδοχείς. Κατά τη διαδικασία της δημιουργίας ομάδων ή cluster generation, η μέθοδος αυτή εξασφαλίζει ότι ένα και μοναδικό αποτύπωμα DNA θα προσκολληθεί σε κάθε διαφορετικό υποδοχέα. Αμέσως μόλις το αποτύπωμα συνδεθεί με τον εκκινητή ενισχύεται ταχύτατα, απαγορεύοντας έτσι σε άλλα αποτυπώματα να ενωθούν σε υποδοχείς που δεν ανήκουν και αποφεύγοντας έτσι τη δημιουργία ομάδων ανόμοιων πολύκλωνων αλυσίδων DNA. Έτσι διασφαλίζεται ο σχηματισμός ομάδων που αποτελούνται από μονόκλωνο DNA, η κάθε μια στον δικό της μοναδικό υποδοχέα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ένα μεγάλο ποσοστό των υποδοχέων να καθίστανται κατειλημμένοι από ομάδες που προέκυψαν από το ίδιο αποτύπωμα DNA. Μόλις οι διαδικασίες αυτές ολοκληρωθούν, η πλακέτα είναι έτοιμη και μπορεί να ξεκινήσει η διαδικασία της αλληλούχισης.



Εικόνα 2.2, Πλακέτα Ροής-Flow Cell (www.illumina.com)



Εικόνα 2.3, Κενοί υποδοχείς (www.illumina.com)



Εικόνα 2.4, Υποδοχέας μετά την προσθήκη εκκινητή (www.illumina.com)



Εικόνα 2.5, Πλήρεις υποδοχείς έτοιμοι για τη διαδικασία του sequencing (www.illumina.com)

2.4.3: Sequencing

Αμέσως μετά την εκκίνηση της εργασίας με NGS το κατακεραματισμένο DNA που περιέχεται στις βιβλιοθήκες μεταφέρεται στην πλακέτα ροής και τοποθετείται στον προσδιοριστή. Ύστερα ακολουθεί ομαδοποίηση κατά την οποία τα θραύσματα του DNA ενισχύονται και προκύπτουν εκατομμύρια αντίγραφα μονόκλωνου DNA. Σε μεγάλο κομμάτι του εξοπλισμού της Illumina, η ομαδοποίηση αυτή πραγματοποιείται αυτόματα. Το επόμενο βήμα ονομάζεται αλληλούχιση μέσω σύνθεσης (sequencing by synthesis) κατά την οποία τα χημικά τροποποιημένα νουκλεοτίδια συνδέονται με τον κλώνο της μήτρας του DNA μέσω φυσικής συμπληρωματικότητας. Κάθε νουκλεοτίδιο περιέχει μια φθορίζουσα ετικέτα και έναν αναστρέψιμο τερματιστή που λειτουργεί ως εμπόδιο κατά της ενσωμάτωσης επόμενης βάσης. Το φθορίζον σήμα υποδεικνύει ποιο νουκλεοτίδιο προστέθηκε τελευταίο και ύστερα διασπάται για να επιτρέψει τη σύνδεση επόμενης βάσης. Μετά την ανάγνωση των αποτελεσμάτων για τον πρώτο κλώνο τα δεδομένα εξαλείφονται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τον αντίστροφο κλώνο. Η μέθοδος αυτή ονομάζεται αλληλούχιση ζευγών-άκρων (paired-end sequencing). Τα δεδομένα της ανάλυσης στην πορεία παρουσιάζονται αναλυτικά με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Εφαρμογή NGS για τη μελέτη του μικροβιώματος τυριών Ελληνικής παραγωγής

3.1: Γενικευμένο υπόβαθρο για τον ανθότυρο

Ο ανθότυρος ανήκει στην κατηγορία των λευκών τυριών και είναι ένα προϊόν το οποίο παρασκευάζεται παραδοσιακά στην Ελλάδα και πιο συγκεκριμένα, η προέλευση του είναι από την Κρήτη. Παρασκευάζεται με την προσθήκη αιγοπρόβειου γάλακτος ή κρέμας γάλακτος σε πρόβειο ή κατσικίσιο τυρόγαλα. Το ανθότυρο αποτελεί κατεξοχήν προϊόν μυζήθρας, γεγονός το οποίο δικαιολογείται καθώς τα δύο τυριά παρασκευάζονται με τον ίδιο τρόπο. Πολύς κόσμος τείνει να δυσκολεύεται πολλές φορές στο να διαχωρίσει τα δύο είδη καθώς αυτά έχουν παρόμοια όψη. Τα χαρακτηριστικά των δύο τυριών προσομοιάζουν αρκετά αυτά του γνωστού ιταλικού τυριού ricotta. Η ουσιαστικότερη διαφορά μεταξύ των δύο είναι πως ο ανθότυρος έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λιπαρά (περίπου 10-20% μεγαλύτερη από τη μυζήθρα), γεγονός που του προσφέρει αρκετά καλύτερη δομή, και χαμηλότερη περιεκτικότητα σε αλάτι. Στην αγορά διατίθενται δύο ειδών ανθότυροι: ο φρέσκος, μαλακός ανθότυρος και ο ώριμος, ξηρός ανθότυρος ο οποίος εμφανισιακά είναι ένα λευκό ημίσκληρο τυρί με τραχιά επιφάνεια που χαρακτηρίζεται από μια έντονη, υφάλμυρη βουτυρώδη γεύση. Για την ποιότητά του φημίζεται ιδιαίτερα ο ξηρός ανθότυρος της Κρήτης. Σε όλα τα είδη ανθότυρου κατά την παραγωγή και συντήρηση ένα πολύ σημαντικό στάδιο είναι η παρακολούθηση της υγρασίας, καθώς αυτή δεν πρέπει να ξεπερνά το 70% στην νωπό και το 40% στον ξηρό. Μερικά από τα βασικότερα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του ανθότυρου συγκριτικά με τη μυζήθρα εμφανίζονται στον πίνακα 3.1.

(Ανυφαντάκης, 2004)

Είδος τυριού	Είδος γάλακτος	pH	Υγρασία	%Λίπος	Πρωτεΐνες	NaCl
Ανθότυρος	Τυρόγαλα	5,8	65-70%	5-10%	10-12g /100g	1g /100g
Μυζήθρα	Τυρόγαλα	5,8	65-70%	20-21%	10-14g /100g	1,2g/ 100g

Πίνακας 3.1, Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ανθότυρου και μυζήθρας (Μάντης, 2015)

3.2: Μέθοδοι και υλικά

Η παρούσα μελέτη έγινε πάνω σε τέσσερις διαφορετικές επωνυμίες ανθότυρων ελληνικής παραγωγής, στα οποία για τη διανομή και έκθεσή τους στο σημείο πώλησης έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικές μέθοδοι συσκευασίας. Αναλυτικές λεπτομέρειες για την προέλευση, συντήρηση, μεθόδους διανομής καθώς και για τα επιμέρους χαρακτηριστικά των δειγμάτων που αναλύθηκαν με NGS αναφέρονται παρακάτω:

❖ C4 A-Packed

Όσον αφορά το δείγμα C4 Packed πρόκειται για συσκευασμένο ανθότυρο. Πρόκειται λευκό, μαλακό τυρί μικρής διάρκειας ζωής το οποίο αποτελείται από τυρόγαλα από παστεριωμένο αγελαδινό, πρόβειο και αιγινό γάλα, κρέμα γάλακτος και σχετικά μικρή περιεκτικότητα σε αλάτι (0.9%). Η αναγραφόμενη ημερομηνία παραγωγής για το συγκεκριμένο τυρί ήταν 08/01/2022 και η δειγματοληψία έγινε στις 13/12/2022.

❖ C14-Packed

Το δείγμα C14 Packed είναι επίσης ανθότυρο. Πρόκειται επίσης για συσκευασμένο, λευκό, μαλακό τυρί. Αποτελείται από τυρόγαλα ελληνικής προέλευσης και από πρόβεια ή κατσικίσια κρέμα γάλακτος ολλανδικής προέλευσης και μικρή περιεκτικότητα σε αλάτι (0.95%). Η αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης ήταν 03/03/2022 και η δειγματοληψία έγινε στις 07/02/2022. Ως προς τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά το συγκεκριμένο δείγμα ήταν ελαφρώς κιτρινωμένο και είχε μια ελάχιστα ξινή γεύση.

❖ C7-Unpacked

Το δείγμα C7-Unpacked αποτελεί μη συσκευασμένο ανθότυρο επώνυμου σούπερ μάρκετ. Πρόκειται για λευκό, μαλακό τυρί το οποίο διανέμεται χύμα σε βαρέλια. Η δειγματοληψία για το συγκεκριμένο έγινε στις 07/02/2022. Επίσης το δείγμα είχε pH ίσο με 5,86.

❖ C8-Unpacked

Το δείγμα C8-Unpacked, αποτελεί επίσης μη συσκευασμένο ανθότυρο επώνυμου σούπερ μάρκετ. Είναι επίσης λευκό, μαλακό τυρί και διανέμεται χύμα σε βαρέλια. Η δειγματοληψία έγινε στις 07/02/2022 και το συγκεκριμένο δείγμα είχε pH ίσο με 6,23.

3.2.1: Πρωτόκολλο ανάλυσης

Όλα τα δείγματα επεξεργάστηκαν κατάλληλα και αναλύθηκαν με τεχνολογία NGS, με βάση το πρωτόκολλο *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* της Illumina. Οι αναλύσεις έγιναν στο μηχάνημα *Illumina ISeq 100*, του εργαστηρίου *Μοριακής Ανάλυσης Τροφίμων*, του τμήματος *Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων* του *Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής*.

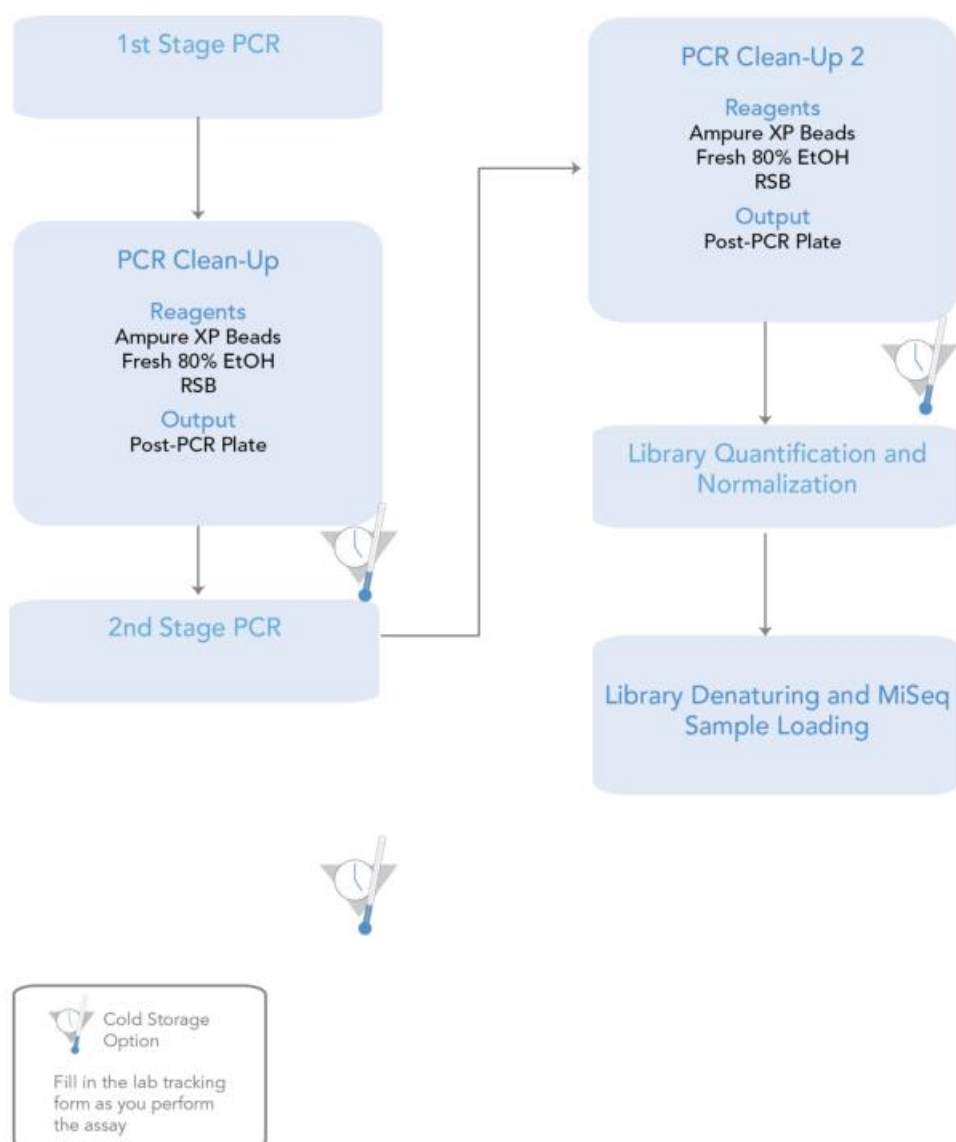


Εικόνα 3.1, Illumina ISeq 100 (www.illumina.com)

Οι μεταγονιδιωματικές μελέτες πραγματοποιούνται συνήθως με την ανάλυση των προκαρυωτικών 16S ριβοσωμικών RNA (16S rRNA), το οποίο έχει μήκος περίπου 1.500 bp και περιέχει εννέα μεταβλητές περιοχές που παρεμβάλλονται μεταξύ συντηρητικών περιοχών. Οι μεταβλητές περιοχές του 16S rRNA συχνά χρησιμοποιούνται σε φυλογενετικές ταξινομήσεις, όπως το γένος ή το είδος, σε διάφορους μικροβιακούς πληθυσμούς. Το ποια περιοχή του 16S rRNA θα πρέπει να αλληλουχηθεί αποτελεί ένα στάδιο το οποίο πρέπει να είναι καθορισμένο και ξεκάθαρο καθώς η περιοχή για την οποία ενδιαφερόμαστε την εκάστοτε φορά είναι πιθανό να διαφέρει σύμφωνα με τους στόχους της κάθε ανάλυσης αλλά και σύμφωνα με τη φύση και το σχεδιασμό των προς ανάλυση δειγμάτων. Το πρωτόκολλο *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* της Illumina σύμφωνα με το οποίο εργαστήκαμε περιγράφει μια μέθοδο προετοιμασίας δειγμάτων για την αλληλούχιση των μεταβλητών V3 και V4, του γονιδίου 16S rRNA.

3.2.2: Καθαρισμός δειγμάτων με τη χρήση PCR

Κατά το στάδιο της προετοιμασίας τη βιβλιοθήκης, τα δείγματα περνούν από διαδοχικά στάδια PCR προκειμένου να καθαριστούν από επιμέρους επιμολύνσεις DNA οι οποίες μπορεί να προέκυψαν κατά τη δειγματοληψία και διανομή των εκάστοτε δειγμάτων, αλλά και για την ενίσχυση του σήματος DNA της περιοχής στην οποία σκοπεύουμε να εργαστούμε. Στο παρακάτω διάγραμμα ροής φαίνεται ενδεικτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε, στο οποίο περιλαμβάνονται και μερικοί σταθμοί ασφαλείας μεταξύ των βημάτων.



Διάγραμμα ροής 3.1, Τα βήματα για την προετοιμασία βιβλιοθήκης κατά το πρωτόκολλο Illumina 16S Metagenomics Library Preparation (www.illumina.com).

3.3: Πίνακες αποτελεσμάτων

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που λάβαμε μέσω του εργοστασιακού λογισμικού *MiSeq Reporter* του μηχανήματος. Η ροή εργασίας *Metagenomics* εκτελεί μια φυλογενετική ταξινόμηση χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων *Greengenes* που δείχνει το επίπεδο σε βασίλειο, κλάση, τάξη, οικογένεια, γένος, είδος και στέλεχος καθώς και τις συνολικές θετικές ταυτοποιήσεις (hits) αλλά και το ποσοστό που αντιστοιχεί στην κάθε μία. Τα αποτελέσματα που λάβαμε από τις αναλύσεις των τεσσάρων δειγμάτων παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

C4A PACKED

Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Strain	num_hits	%_hits
1	Unclassified								
2	Bacteria	Proteobacteria						6345	49.076
3	Bacteria	Proteobacteria		Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas		5678	43.917
4	Bacteria							173	1.338
5	Bacteria	Firmicutes						75	0.58
6	Bacteria	Firmicutes						59	0.456
7	Bacteria	Proteobacteria						47	0.364
8	Bacteria	Proteobacteria						43	0.333
9	Bacteria	Proteobacteria						38	0.294
10	Bacteria	Firmicutes						37	0.286
11	Bacteria	Proteobacteria						29	0.224
12	Bacteria	Proteobacteria						27	0.209
13	Bacteria	Proteobacteria						22	0.17
14	Bacteria	Proteobacteria						19	0.147
15	Bacteria	Thermotogae						18	0.139
16	Bacteria	Firmicutes						16	0.124
17	Bacteria	Proteobacteria						15	0.116
18	Bacteria	Proteobacteria						13	0.101
19	Bacteria	Acidobacteria						11	0.085
20	Bacteria	Firmicutes						10	0.077
21	Bacteria	Proteobacteria						9	0.07
22	Bacteria	Proteobacteria						8	0.062
23	Bacteria	Proteobacteria						7	0.054
24	Bacteria	Proteobacteria						7	0.054
25	Bacteria	Proteobacteria						7	0.054
26	Bacteria	Proteobacteria						7	0.054
27	Bacteria	Proteobacteria						7	0.054
28	Bacteria	Proteobacteria						6	0.046
29	Bacteria	Proteobacteria						6	0.046
30	Bacteria	Proteobacteria						6	0.046
31	Bacteria	Proteobacteria						5	0.039
32	Bacteria	Cyanobacteria/Chloroplast						5	0.039
33	Bacteria	Proteobacteria						5	0.039
34	Bacteria	Firmicutes						5	0.039
35	Bacteria	Proteobacteria						5	0.039
36	Bacteria	Proteobacteria						4	0.031

37	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	Streptococcus_pseudoporcinus	DQ303209	4	0.031
38	Bacteria	Cyanobacteria/Chloroplast	Chloroplast	Unclassified	Chloroplast	Streptophyta	Lotus_japonicus	AP002983	4	0.031
39	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter	Marinobacter_szutsaonensis	EU164778	4	0.031
40	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiales_incertae_sedis	Thiomonas			4	0.031
41	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_oryzihabitans	D84004	4	0.031
42	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Thalassolituus	Thalassolituus_marinus	GQ426888	4	0.031
43	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Staphylococcus			3	0.023
44	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_amygdali	Z76654	3	0.023
45	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales					3	0.023
46	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus			3	0.023
47	Bacteria	DeinococcusUnclassifiedThermus	Deinococci	Deinococcales	Deinococcaceae	Deinococcus			3	0.023
48	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_panacis	AY87208	3	0.023
49	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria_incertae_sedis	Unclassified	Porticoccus	Porticoccus_hydrocarbonoclasticus	NR_118247.1	2	0.015
50	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Delftia	Delftia_deserti	NR_136837.1	2	0.015
51	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales					2	0.015
52	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Serratia	Serratia_ureilytica	AJ854062	2	0.015
53	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Leuconostocaceae	Leuconostoc			2	0.015
54	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Edwardsiella			2	0.015
55	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Saccharosporillaceae	Saccharosporillum			2	0.015
56	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylobacteriaceae	Meganema	Meganema_periderodes	AF180468	2	0.015
57	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	Ureibacillus	Ureibacillus_suwonensis	AY850379	2	0.015
58	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Legionellales	Coxiellaceae	Coxiella			2	0.015
59	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Hahellaceae	Endozoicomonas	Endozoicomonas_eunicicola	JX488684	2	0.015
60	Bacteria	Firmicutes							2	0.015
61	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae				2	0.015
62	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Lonsdalea			2	0.015
63	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Leuconostocaceae	Fructobacillus	Fructobacillus_fructosus	AF360737	2	0.015
64	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae_1	Alteribacillus			2	0.015
65	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Idiomarinaceae	Altidimarina	Altidimarina_minuta	NR_146032.1	2	0.015
66	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Paracoccus			2	0.015
67	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Ectothiorhodospiraceae	Ectothiorhodospira			2	0.015
68	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae				2	0.015
69	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Neptunibacter			2	0.015
70	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Leuconostocaceae	Weissella			1	0.008
71	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus	Enterococcus_asini	Y11621	1	0.008
72	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae_1	Bacillus			1	0.008
73	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_xanthomarina	AB176954	1	0.008
74	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae_2	Oceanobacillus	Oceanobacillus_neutripilus	EU709018	1	0.008
75	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae				1	0.008

76	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae_2				1	0.008
77	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Shewanellaceae	Shewanella	Shewanella_olleyana	AF295592	1	0.008
78	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Enterobacter	Escherichia_vulneris	NR_041927.1	1	0.008
79	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	Streptococcus_pharyngis	NR_137219.1	1	0.008
80	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Amphritea	Amphritea_sp.	KI867528	1	0.008
81	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae_1	Bacillus	Bacillus_aerius	AJ831843	1	0.008
82	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Chromatiales	Ecotiorhodospiraceae	Oceanococcus	Oceanococcus_atlanticus	KC997601	1	0.008
83	Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae	Veillonella			1	0.008
84	Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas			1	0.008
85	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Colwelliaceae	Colwellia			1	0.008
86	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Beijerinckia			1	0.008
87	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Marinomonas			1	0.008
88	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Aerococcaceae	Aerococcus			1	0.008
89	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Aerococcaceae	Aerococcus	Aerococcus_vaginalis	AB818493	1	0.008
90	Bacteria	Cyanobacteria/Chloroplast	Chloroplast	Unclassified	Chloroplast	Streptophyta	Anthoceros_formosae	AB086179	1	0.008
91	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Oleispira	Oleispira_lenta	EU980447	1	0.008
92	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Pragia	Pragia_fontium	AI233424	1	0.008
93	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Microbulifer			1	0.008
94	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Oxalobacter	Oxalobacter_formigenes	U49757	1	0.008
95	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhodobiaceae	Parvibaculum			1	0.008
96	Bacteria	Cyanobacteria/Chloroplast	Chloroplast	Unclassified	Chloroplast	Streptophyta	Zygnema_circumcarinatum	AY958086	1	0.008
97	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_straminea	D84023	1	0.008
98	Bacteria	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacteriales	Campylobacteraceae	Campylobacter			1	0.008
99	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_fluorescens	D84013	1	0.008
100	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Aerococcaceae	Facklamia	Facklamia_sourekii	Y17312	1	0.008
101	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae				1	0.008
102	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Halomonas	Halomonas_neptunia	AF212202	1	0.008
103	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Enterobacter	Enterobacter_siamensis	HQ888848	1	0.008
104	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae_2	Sinibacillus	Ornithinibacillus_sp.	KC404830	1	0.008
105	Bacteria	DeinococcusUnclassifiedThermus	Deinococci	Deinococcales	Deinococcaceae	Deinococcus	Deinococcus_sp.	KC4949323	1	0.008
106	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Oceanospirillales	Halellaceae				1	0.008
107	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Chromatiales	Ecotiorhodospiraceae	Thiogranum	Thiogranum_longum	AB983478	1	0.008
108	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae				1	0.008
109	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Oceanospirillum			1	0.008
110	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Shewanellaceae	Shewanella			1	0.008
111	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	Streptococcus_fryi	NR_112960.1	1	0.008
112	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Chromatiales	Chromatiaceae	Rheinheimera			1	0.008
113	Bacteria	Firmicutes	Bacilli						1	0.008
114	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria						1	0.008

115	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Halomonas	1	0.008
116	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae		1	0.008
117	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae		1	0.008
118	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae		1	0.008
119	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae_2	Virgibacillus	1	0.008
120	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Halothiobacillaceae	Virgibacillus_soli	EU213011	0.008
121	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Idiomarinaceae		1	0.008
122	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Ignatzschineria	1	0.008
123	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Psychrobacter	NR_118813.1	0.008
124	Bacteria	Acidobacteria				Psychrobacter_urativorans	1	0.008
125	Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Holdemanella	M59230	0.008
						Eubacterium_biforme	1	0.008

C14 PACKED

Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Strain	num_hits	% hits
1	Unclassified							11249	50.953
2	Bacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas			7689	34.828
3	Bacteria	Firmicutes	Lactobacillales	Streptococcaceae	Lactococcus			845	3.828
4	Bacteria	Proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae				423	1.916
5	Bacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Janthinobacterium			292	1.323
6	Bacteria	Proteobacteria						275	1.246
7	Bacteria							142	0.643
8	Bacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae				138	0.625
9	Bacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_saponiphila	FM208264	105	0.476
10	Bacteria	Proteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Oceaniserpentilla	Oceaniserpentilla_haliotis	AM747817	73	0.331
11	Bacteria	Proteobacteria						64	0.29
12	Bacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_kummingensis	JQ246444	58	0.263
13	Bacteria	Proteobacteria	Oceanospirillales	Saccharosporillaceae	Saccharosporillum	Saccharosporillum_impatiens	AJ315983	52	0.236
14	Bacteria	Acidobacteria	Unclassified	Unclassified	Gp6	uncultured_Acidobacteria	Z95728	28	0.127
15	Bacteria	Firmicutes	Lactobacillales	Leuconostocaceae	Leuconostoc			27	0.122
16	Bacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Buchnera	Buchnera_aphidicola	CP001817	27	0.122
17	Bacteria	Firmicutes	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus			27	0.122
18	Bacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales					26	0.118
19	Bacteria	Gammaaproteobacteria	Oceanospirillales	Halellaceae	Endozoicomonas			22	0.1
20	Bacteria	Proteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Cellvibrio			18	0.082
21	Bacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Enterobacter	Enterobacter_siemensis	HQ888848	18	0.082
22	Bacteria	Proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Yersinia			17	0.077
23	Bacteria	Betaproteobacteria						15	0.068
24	Bacteria	Proteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter			15	0.068
25	Bacteria	Gammaaproteobacteria	Thiotrichales	Thiotrichaceae	Thiothrix	Thiothrix_flexilis	AB042545	14	0.063
26	Bacteria	Thermotogae	Petrotogales	Petrotogaceae	Marinitoga			14	0.063
27	Bacteria	Proteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter	Marinobacter_halophilus	NR_137207.1	13	0.059
28	Bacteria	Proteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Halomonas	Halomonas_neptunia	AF212202	12	0.054
29	Bacteria	Proteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_aeruginosa	X06684	11	0.05
30	Bacteria	Proteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Pseudosporillum	Pseudosporillum_japonicum	AB006766	11	0.05
31	Bacteria	Firmicutes	Lactobacillales					10	0.045
32	Bacteria	Firmicutes	Lactobacillales	Streptococcaceae				10	0.045
33	Bacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_chlororaphis	FI168539	9	0.041
34	Bacteria	DeinococcusUnclassifiedThermus	Deinococcales	Deinococcaceae	Deinococcus	Deinococcus_sp.	KC494323	9	0.041
35	Bacteria	Aquificae	Aquificales	Hydrogenothermaceae	Sulfurhydrogenibium			9	0.041
36	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria incertae sedis	Unclassified	Porticcoccus	Porticcoccus_hydrocarbonoclasticus	NR_118247.1	8	0.036

37	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Enterobacter	Escherichia_vulneris	NR_041927.1	8	0.036
38	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Salmonella			8	0.036
39	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter	Marinobacter_szutsaomensis	EU164778	8	0.036
40	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Pectobacterium	Serratia_fonticola	NR_121793.1	7	0.032
41	Bacteria	Cyanobacteria/Chloroplast	Chloroplast	Unclassified	Chloroplast	Streptophyta			7	0.032
42	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Undibacterium			7	0.032
43	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus			7	0.032
44	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Reinekea	Reinekea_blandensis	DO403810	7	0.032
45	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae				6	0.027
46	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Moraxella	Moraxella_oblonga	AB681778	6	0.027
47	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Psychrobacter	Psychrobacter_urativorans	NR_118813.1	6	0.027
48	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_amgdali	Z76654	5	0.023
49	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae				5	0.023
50	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Massilia			5	0.023
51	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Ectothiorhodospiraceae	Thiogranum	Thiogranum_longum	AB983478	5	0.023
52	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Lonsdalea			5	0.023
53	Bacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetales	Propionibacteriaceae	Naumammella	Naumammella_halotolerans	FR832425	5	0.023
54	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Bordetella	Bordetella_pertussis	U04950	5	0.023
55	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Enterobacter	Enterobacter_mori	EU721605	4	0.018
56	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Saccharosporillaceae	Saccharosporillum			4	0.018
57	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Legionellales	Coxiellaceae	Coxiella			4	0.018
58	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Buttiauxella			4	0.018
59	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter	Marinobacter_vinifirmus	DQ235263	4	0.018
60	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Delftia	Delftia_deserti	NR_136837.1	4	0.018
61	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Ignatzschineria			4	0.018
62	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales					4	0.018
63	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia			3	0.014
64	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae				3	0.014
65	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Halomonas			3	0.014
66	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	Salmonella			3	0.014
67	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_fluorescens	D84013	3	0.014
68	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	Photobacterium			3	0.014
69	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales					3	0.014
70	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Serratia	Serratia_ureilytica	AI854062	3	0.014
71	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Hahellaceae	Endozoicomonas	Endozoicomonas_eunicelcola	JX488684	3	0.014
72	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Photobacterium			3	0.014
73	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_oryzihabitans	D84004	3	0.014
74	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae				3	0.014
75	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae_1	Clostridium_sensu_stricto	Clostridium_cadaveris	AB542932	3	0.014

76	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_panacis	AY787208	3	0.014
77	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Sinobacteraceae	Steroidobacter	Steroidobacter_dentrificans	EF605262	2	0.009
78	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Blautia	Blautia_luti	AJ133124	2	0.009
79	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Thalassolituus	Thalassolituus_marinus	GQ426888	2	0.009
80	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Edwardsiella			2	0.009
81	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Ectothiorhodospiraceae	Ectothiorhodospira			2	0.009
82	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Microbulbifer			2	0.009
83	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Erwinia	Erwinia_rhapontici	AJ233417	2	0.009
84	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylobacteriaceae	Meganema	Meganema_perideroedes	AF180468	2	0.009
85	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	Vibrio			2	0.009
86	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	Vibrio			2	0.009
87	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Erwinia			2	0.009
88	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Chromatiaceae	Rheinheimera			2	0.009
89	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales					2	0.009
90	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	Burkholderia_multivorans	Y18703	2	0.009
91	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cardiobacteriales	Cardiobacteriaceae				2	0.009
92	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae_1	Bacillus			2	0.009
93	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfarculales	Desulfarculaceae	Desulfarculus	Desulfarculus_baarsii	AF418174	2	0.009
94	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Pragia	Pragia_fontium	AJ233424	2	0.009
95	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales					2	0.009
96	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Marinobacterium			2	0.009
97	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae				2	0.009
98	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Neptunibacter			2	0.009
99	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae				1	0.005
100	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Listeriaceae	Listeria			1	0.005
101	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	Defluviococcus	Defluviococcus_vanus	AF179678	1	0.005
102	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylobacteriaceae	Methylobacterium			1	0.005
103	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Marinospirillum	Marinospirillum_minutulum	AB006769	1	0.005
104	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacteriales	Rhodobacteraceae	Amaricoccus	Amaricoccus_tamworthensis	U88044	1	0.005
105	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae_1	Anoxybacillus			1	0.005
106	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Hahellaceae	Hahella	Hahella_chejuensis	CP000155	1	0.005
107	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Oceanospirillum			1	0.005
108	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_putida	D84020	1	0.005
109	Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Bulleidia	Bulleidia_extracta	AF220064	1	0.005
110	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Oceanospirillum	Oceanospirillum_maris	AB006763	1	0.005
111	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillales_Incertae_Sedis_XI	Gemella			1	0.005
112	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Oxalobacter	Oxalobacter_formigenes	U49757	1	0.005
113	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_xanthomarina	AB176954	1	0.005
114	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter			1	0.005

115	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Tetragenococcus	1	0.005
116	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Moraxella	1	0.005
117	Bacteria	Cyanobacteria/Chloroplast	Cyanobacteria	Unclassified			1	0.005
118	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Shewanellaceae	Shewanella	X82131	0.005
119	Bacteria	Tenericutes	Mollicutes	Entomoplasmatales	Spiroplasmataceae	Spiroplasma	HM037992	0.005
120	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium		0.005
121	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria_incertae_sedis	Unclassified	Alkalimonas		0.005
122	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Sinobacteraceae		1	0.005
123	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Oligella	AJ251912	0.005
124	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Lactovum	AJ439543	0.005
125	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Serratia		0.005
126	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae		1	0.005
127	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Legionellales	Coxiellaceae	Coxiella	NR_116014.1	0.005
128	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Oleispira	EU980447	0.005
129	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae		1	0.005
130	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae_2	Salimicrobium		0.005
131	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Faecalibacterium_prausnitzii	AJ413954	0.005
132	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Clostridium_IV	L34625	0.005
133	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae_1	Clostridium_sensu_stricto	AF069742	0.005
134	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae_1	Bacillus	EU194897	0.005
135	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Chromatococcus	AM691086	0.005
136	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillales_incertae_se	Gyvuella	KC213486	0.005
137	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Novosphingobium	D16147	0.005
138	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Urdibacterium	AM397629	0.005
139	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	AY204889	0.005
140	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	NR_146371.1	0.005
141	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	NR_137386.1	0.005
142	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus		0.005
143	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Azomonas	AB175652	0.005
144	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Saainisphaerales	Saainisphaeraceae	Saainisphaera		0.005
145	Bacteria	Acidobacteria					1	0.005
146	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Buchnera	AE013218	0.005
147	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Enterobacter	NR_115869.1	0.005
148	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	Aeromonas	DD013306	0.005
149	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardiaceae	Gordonia	JN008111	0.005
150	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfufovibrionales	Desulfufovibrionaceae	Desulfufovibrio	U31080	0.005
151	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Ruminococcus2		0.005
152	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Xenorhabdus		0.005
153	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Reinekea		0.005

154	Bacteria	Tenericutes	Mollicutes	Acholeplasmatales	Acholeplasmataceae	Acholeplasma		1	0.005	
155	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Mycococcales	Sandaracinaceae	Sandaracinus	Sandaracinus_amylolyticus	HQ540311	1	0.005
156	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Hyphomonadaceae			1	0.005	
157	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Idiomarinaeae			1	0.005	
158	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Alisewanella	Alisewanella_fetalis	AF144407	1	0.005
159	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria_incertae_sedis	Unclassified	Methylohalomonas	Methylohalomonas_lacus	DQ834966	1	0.005
160	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales				1	0.005	
161	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium		1	0.005	
162	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiales_incertae_sedis			1	0.005	
163	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Catenovulum		1	0.005	
164	Bacteria	Tenericutes	Mollicutes	Mycoplasmatales	Mycoplasmataceae	Mycoplasma		1	0.005	
165	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacteriales	Rhodobacteraceae			1	0.005	
166	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Amphritea	Amphritea_sp.	KJ867528	1	0.005
167	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae_1	Proteiniclasticum	Proteiniclasticum_ruminis	DQ852338	1	0.005
168	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter	Marinobacter_maritimus	AJ704395	1	0.005
169	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Halothobacillaceae			1	0.005	
170	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae_2	Streptothobacillus	Streptothobacillus_salinus	F746578	1	0.005

C7 UNPACKED

Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Strain	num_hits	%_hits
1	Unclassified							11928	62,888
2	Bacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas			4268	22,502
3	Bacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Shewanella			590	3,111
4	Bacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Shewanellaceae	Shewanella			583	3,074
5	Bacteria	Gammaaproteobacteria						225	1,186
6	Bacteria	Firmicutes	Lactobacillales	Streptococcaceae	Lactococcus			163	0,859
7	Bacteria							112	0,59
8	Bacteria	Proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Hafnia			76	0,401
9	Bacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales					70	0,369
10	Bacteria	Gammaaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	Aeromonas			61	0,322
11	Bacteria	Proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Yersinia			58	0,306
12	Bacteria	Proteobacteria	Alteromonadales	Shewanellaceae	Shewanella	Shewanella_morhuae	AB205576	54	0,285
13	Bacteria	Proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Hafnia	Obesumbacterium_proteus	AJ233422	51	0,269
14	Bacteria	Proteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Oceaniserpentilla	Oceaniserpentilla_haliotis	AM747817	43	0,227
15	Bacteria	Proteobacteria						40	0,211
16	Bacteria	Firmicutes	Lactobacillales	Leuconostocaceae	Leuconostoc			30	0,158
17	Bacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_saponiphila	FM208264	29	0,153
18	Bacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter			24	0,127
19	Bacteria	Gammaaproteobacteria	Oceanospirillales	Saccharosporillaceae	Saccharosporillum	Saccharosporillum_impatiens	AJ315983	24	0,127
20	Bacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Moritellaceae	Moritella			23	0,121
21	Bacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_kunmingensis	JQ246444	23	0,121
22	Bacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter			21	0,111
23	Bacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Janthinobacterium			19	0,1
24	Bacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Enterobacter	Enterobacter_siamensis	HQ888848	18	0,095
25	Bacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Microbulbifer			14	0,074
26	Bacteria	Proteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Halomonas	Halomonas_neptunia	AF212202	13	0,069
27	Bacteria	Proteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Pseudosporillum	Pseudosporillum_japonicum	AB006766	13	0,069
28	Bacteria	Proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Buchnera	Buchnera_aphidicola	CP001817	13	0,069
29	Bacteria	Proteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Reinekea	Reinekea_blandensis	DQ403810	12	0,063
30	Bacteria	Thermotogae	Petrotogales	Petrotogaceae	Marinitoga			11	0,058
31	Bacteria	Proteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter	Marinobacter_halophilus	NR_137207.1	10	0,053
32	Bacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae				10	0,053
33	Bacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Cellvibrio			10	0,053
34	Bacteria	Proteobacteria	Oceanospirillales	Hahellaceae	Endozoicomonas			10	0,053
35	Bacteria	Proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Serratia	Serratia_urelytica	AI854062	8	0,042
36	Bacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Pectobacterium	Serratia_fonticola	NR_121793.1	8	0,042

37	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Buttiauxella	8	0,042	
38	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	Salinivibrio	8	0,042	
39	Bacteria	DeinococcusUnclassifiedThermus	Deinococci	Deinococcales	Deinococcaceae	Deinococcus_sp.	KC494323	7	0,037
40	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae	Methylophaga_muralis	AY694421	7	0,037
41	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Buchnera		7	0,037
42	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp6	Unclassified	Unclassified	Gp6	Z95728	7	0,037
43	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Oceanospirillum		7	0,037
44	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	X06684	6	0,032
45	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Chromatiales	Ectothiorhodospiraceae	Ectothiorhodospira		6	0,032
46	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Shewanellaceae	Shewanella	AF295592	6	0,032
47	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia		6	0,032
48	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	D84004	6	0,032
49	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Thalassolituus	GQ426888	5	0,026
50	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	Aeromonas	DQ013306	5	0,026
51	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales				5	0,026
52	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Erwinia		5	0,026
53	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Edwardsiella		4	0,021
54	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Enterobacter	EU721605	4	0,021
55	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	Photobacterium		4	0,021
56	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus		4	0,021
57	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Z76654	4	0,021
58	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	Aeromonas	X60412	4	0,021
59	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Pragia	AJ233424	4	0,021
60	Bacteria	Proteobacteria	Epsilonaproteobacteria	Campylobacteriales	Campylobacteriaceae	Arcobacter		4	0,021
61	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	AY787208	4	0,021
62	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Oceanospirillum	AB006763	3	0,016
63	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Moraxella		3	0,016
64	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Oceanospirillales				3	0,016
65	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae			3	0,016
66	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Amphritea	KJ867528	3	0,016
67	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Celerinatantimonadaceae	Celerinatantimonas	DQ913890	3	0,016
68	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Gammaaproteobacteria_incertae_sedi:Unclassified	Unclassified	Alkalimonas		3	0,016
69	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Colwelliaceae			3	0,016
70	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae			3	0,016
71	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Alishewanella_fetalis	AF144407	3	0,016
72	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Oceanospirillales	Hahellaceae	Hahella	CP000155	3	0,016
73	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter_sztujsaensis	EU164778	3	0,016
74	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter_vinifirmus	DQ235263	3	0,016
75	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Idiomarinaceae	Alidiomarina	NR_146032.1	3	0,016

76	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Oceanospirillales	Hahellaceae	Endozoicomonas	Endozoicomonas_eunicicola	JX488684	2	0,011
77	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	Pseudoalteromonas			2	0,011
78	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Delftia	Delftia_deserti	NR_136837.1	2	0,011
79	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Psychromonadaceae	Psychromonas			2	0,011
80	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	Carnobacterium			2	0,011
81	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadales_incertae_sedi	Alteromonadales_incertae_sedi	Gammaaproteobacteria_bacterium	AB930131	2	0,011
82	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Gammaaproteobacteria	Unclassified	Eionea	Eionea_flava	NR_137230.1	2	0,011
83	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae				2	0,011
84	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Xenorhabdus	Xenorhabdus_hominickii	DQ211719	2	0,011
85	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus			2	0,011
86	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae_1	Clostridium_sensu_stricto			2	0,011
87	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Perluclidibaca	Perluclidibaca_piscinae	DQ664237	2	0,011
88	Bacteria	Cyanobacteria/Chloroplast	Chloroplast	Unclassified	Chloroplast	Streptophyta			2	0,011
89	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae				2	0,011
90	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Salmonella			2	0,011
91	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Paraglacicola	Glaciicola_arctica	EU365479	2	0,011
92	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Pantoea	Pantoea_stewartii	U80208	2	0,011
93	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Oceanospirillales	Oleiphilaceae	Oleiphilus	Oleiphilus_messinensis	AI295154	2	0,011
94	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Chromatiales	Ectothiorhodospiraceae	Thiogranum	Thiogranum_longum	AB983478	2	0,011
95	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Marinobacterium			2	0,011
96	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Thiotrichales	Thiotrichaceae	Thiothrix	Thiothrix_flexilis	AB042545	2	0,011
97	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	Chitinibacter			2	0,011
98	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Oceanospirillales	Saccharospirillaceae	Saccharospirillum			2	0,011
99	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Erwinia	Erwinia_rhapontici	AI233417	2	0,011
100	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Pasteurellales	Pasteurellaceae	Pasteurella	Pasteurella_testudinis	AY362926	2	0,011
101	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	Algicola	Algicola_bacteriolytica	D89929	1	0,005
102	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales					1	0,005
103	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Bordetella	Bordetella_pertussis	U04950	1	0,005
104	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp3	Unclassified	Unclassified	Gp3	uncultured_Acidobacteria	EF457378	1	0,005
105	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Leuconostocaceae	Weissella			1	0,005
106	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Legionellales	Coxiellaceae	Coxiella			1	0,005
107	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Microbulbifer	Microbulbifer_gwangyangensis	JF751045	1	0,005
108	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Thiotrichales	Thiotrichaceae	Thiothrix	Thiothrix_fructosivorans	GU269554	1	0,005
109	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Bowmanella			1	0,005
110	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Chromatiales	Halotheobacillaceae	Thiofabia	Thiofabia_tepidiphila	AB304258	1	0,005
111	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_putida	D84020	1	0,005
112	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Ferrimonadaceae	Ferrimonas			1	0,005
113	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacteriales	Rhodobacteraceae	Providencia			1	0,005
114	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Providencia	Providencia_heimbachae	AM040490	1	0,005

115	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_selenipraecipitans	FI422810	1	0,005
116	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	Vibrio			1	0,005
117	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Thiotrichales	Francisellaceae	Francisella			1	0,005
118	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	Lysinibacillus			1	0,005
119	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae				1	0,005
120	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Litoribrevibacter	Oceanospirillaceae_bacterium	KI000475	1	0,005
121	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Glaciecola			1	0,005
122	Bacteria	Chlamydiae	Chlamydia	Chlamydiales	Parachlamydiaceae	Neochlamydia	Criblamydia_sequanensis	NR_115696.1	1	0,005
123	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae				1	0,005
124	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfarculales	Desulfarculaceae	Desulfarculus	Desulfarculus_baarsii	AF418174	1	0,005
125	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Chromatiales	Chromatiaceae	Rheinheimera			1	0,005
126	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Legionellales	Coxiellaceae	Coxiella	Coxiella_cheraxi	NR_116014.1	1	0,005
127	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Chromatiales	Ecrotiorhodospiraceae	Acidiferrobacter	Sulfuricaulis_limicola	NR_147747.1	1	0,005
128	Bacteria	Chloroflexi	Ktedonobacteria	Ktedonobacteriales	Thermosporotrichaceae	Thermosporothrix	Thermosporothrix_hazakensis	AB500145	1	0,005
129	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_nitroreducens	NR_115611.1	1	0,005
130	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp19	Unclassified	Unclassified	Gp19	uncultured_Acidobacteria	EF457508	1	0,005
131	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Lonsdalea			1	0,005
132	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacteriales	Rhodobacteraceae	Amaricoccus	Amaricoccus_tamworthensis	U88044	1	0,005
133	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Buchnera	Buchnera_aphidicola	AE013218	1	0,005
134	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Morganella			1	0,005
135	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Xanthomonadales	Sinobacteraceae	Nevskia	Nevskia_terrae	GQ845011	1	0,005
136	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Xanthomonadales	Sinobacteraceae	Steroidobacter	Steroidobacter_denitrificans	EF605262	1	0,005
137	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Pasteurellales	Pasteurellaceae	Bisgaardia			1	0,005
138	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Leminorella	Leminorella_grimontii	AJ233421	1	0,005
139	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Photorhabdus			1	0,005
140	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Ignatzschineria			1	0,005
141	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Pectobacterium	Pectobacterium_cacticola	AJ223409	1	0,005
142	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Azomonas	Azomonas_agilis	AB175652	1	0,005
143	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter	Tamiladulibacter_salinus	NR_137364.1	1	0,005
144	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_fluorescens	D84013	1	0,005
145	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Aeromonadales	Succinivibrionaceae	Succinimonas	Succinimonas_amylytica	Y17599	1	0,005
146	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Cronobacter			1	0,005
147	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Leminorella	Leminorella_richardii	HF558368	1	0,005
148	Bacteria	DeinococcusUnclassified	Thermus	Deinococcales	Deinococcaceae	Deinococcus	Deinococcus_xibeiensis	NR_117922.1	1	0,005
149	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Idiomarinaceae				1	0,005
150	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae				1	0,005
151	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Ferrimonadaceae	Ferrimonas	Ferrimonas_pelagia	JQ780822	1	0,005
152	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Pasteurellales	Pasteurellaceae	Pasteurella			1	0,005
153	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae				1	0,005

154	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiales_incertae_sedi	Thiomonas			1	0,005
155	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Gammaproteobacteria	incertae_sedi	Unclassified	Porticoccus	Porticoccus_hydrocarbonsoclasticus	NR_118247.1	0,005
156	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales			Shewanella	Shewanella_algidipiscicola	AB205570	0,005
157	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales			Brochothrix		1	0,005
158	Bacteria	DeinococcusUnclassified	Thermus	Deinococcales			Deinococcus		1	0,005
159	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Arenicellales			Arenicella	Arenicella_xantha	AB500096	0,005
160	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales			Glaciecola	Glaciecola_punicea	U85853	0,005
161	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Oceanospirillales			Halomonas		1	0,005
162	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales			Psychrobacter	Psychrobacter_urativorans	NR_118813.1	0,005
163	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales			Meganema	Meganema_perideroedes	AF180468	0,005
164	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales			Arsenophonus	Arsenophonus_nasoniae	AY264674	0,005
165	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Gammaproteobacteria_incertae_sedi	Unclassified		Umboniibacter	Umboniibacter_roseus	NR_145653.1	0,005
166	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales			Taylorella		1	0,005
167	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales			Umboniibacterium		1	0,005
168	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Oceanospirillales			Neptuniibacter		1	0,005
169	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales			Geopsychrobacter	Geopsychrobacter_electrodiphilus	AY187303	0,005
170	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales			Pseudalteromonas	Pseudalteromonas_aliena	AY387858	0,005
171	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Methylococcales			Methyloprofundus	Methyloprofundus_sedimenti	KF484906	0,005
172	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Legionellales			Legionella	Legionella_hackellae	HF558377	0,005
173	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Oceanospirillales			Oleispira	Oleispira_antarctica	A426420	0,005

C8 UNPACKED

Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Strain	num_hits	% hits
Unclassified								31125	58.24
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas			10739	20.094
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Shewanellaceae	Shewanella			2425	4.538
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae				2238	4.188
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Lactococcus			1995	3.733
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria						516	0.966
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Hafnia			513	0.96
Bacteria								350	0.655
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae				323	0.604
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Hafnia	Obesumbacterium_proteus	AJ233422	272	0.509
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Yersinia			252	0.472
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Leuconostocaceae	Leuconostoc			249	0.466
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Shewanellaceae	Shewanella	Shewanella_morhuae	AB205576	196	0.367
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	Aeromonas			169	0.316
Bacteria	Proteobacteria							147	0.275
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Oceanispirillum	Oceanispirillum_haliotis	AM747817	118	0.221
Bacteria	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacteriales	Campylobacteraceae	Arcobacter			83	0.155
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_saponiphila	FM208264	81	0.152
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Moritellaceae	Moritella			79	0.148
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Saccharospirillaceae	Saccharospirillum	Saccharospirillum_impatiens	AJ315983	71	0.133
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Enterobacter	Enterobacter_siagensis	HQ888848	69	0.129
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter			69	0.129
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Buchnera	Buchnera_aphidicola	CP001817	56	0.105
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Halomonas	Halomonas_neptunia	AF212202	55	0.103
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Pectobacterium	Serratia_fonticola	NR_121793.1	52	0.097
Bacteria	DeinococcusUnclassifiedThermus	Deinococci	Deinococcales	Deinococcaceae	Deinococcus	Deinococcus_sp.	KC494323	40	0.075
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Microbulifer			36	0.067
Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp6	Unclassified	Unclassified	Gp6	uncultured_Acidobacteria	Z95728	35	0.065
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Janthinobacterium			33	0.062
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter	Marinobacter_halophilus	NR_137207.1	32	0.06
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	Salinivibrio			30	0.056
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_kummingensis	JQ246444	28	0.052
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus			25	0.047
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae				25	0.047
Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae				24	0.045
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia			22	0.041

37	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter		21	0.039
38	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Buttiauxella		20	0.037
39	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Buchnera		19	0.036
40	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Salmonella		18	0.034
41	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	Photobacterium		18	0.034
42	Bacteria	Thermotogae	Thermotogae	Petrogales	Petrogaceae	Marinitoga		18	0.034
43	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae			16	0.03
44	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Cronobacter		16	0.03
45	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Pseudospirillum	AB006766	14	0.026
46	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Cellvibrio		13	0.024
47	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Chromatiaceae	Rheinheimeria		13	0.024
48	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	X06684	13	0.024
49	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oleiphilaceae	Oleiphilus	AJ295154	13	0.024
50	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Enterobacter	EU721605	12	0.022
51	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae	Methylophaga	AY694421	12	0.022
52	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Oceanospirillum		11	0.021
53	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Edwardsiella		11	0.021
54	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Reinekea	DQ403810	11	0.021
55	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria					11	0.021
56	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Halomonas		10	0.019
57	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Z76654	10	0.019
58	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Hahellaceae	Endozoicomonas		10	0.019
59	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Saccharosporillaceae	Saccharosporillum		10	0.019
60	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Erwinia		9	0.017
61	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales				8	0.015
62	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Pragia	AJ233424	8	0.015
63	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Thiotrichaceae	Thiothrix	AB042545	7	0.013
64	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	Z93440	7	0.013
65	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria_incertae_sedis	Unclassified	Eionea	NR_137230.1	7	0.013
66	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Francisellaceae	Francisella		7	0.013
67	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp19	Unclassified	Unclassified	Gp19	EF457508	7	0.013
68	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Ectothiorhodospiraceae	Thiogranum	AB983478	7	0.013
69	Bacteria	Aquificae	Aquificae	Aquificales	Hydrogenothermaceae	Sulfurihydrogenibium		7	0.013
70	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae_1	Clostridium_sensu_stricto		6	0.011
71	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	Pseudoalteromonas		6	0.011
72	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	FL168539	6	0.011
73	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae			6	0.011
74	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	Pseudoalteromonas	AY387858	6	0.011
75	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Thiotrichaceae	Beggiatoa	AF110274	6	0.011

115	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_azotoformans	D84009	4	0.007
116	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Celerinatantimonadaceae	Celerinatantimonas	Celerinatantimonas_diazotrop	DQ913890	4	0.007
117	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Psychromonadaceae	Psychromonas			3	0.006
118	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Chromatococcus	Chromococcus_haltolerans	AM691086	3	0.006
119	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria						3	0.006
120	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Ectothiorhodospiraceae	Ectothiorhodospira			3	0.006
121	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Raoultella	Raoultella_planticola	AF129443	3	0.006
122	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pasteurellales	Pasteurellaceae	Pasteurella	Pasteurella_testudinis	AY362926	3	0.006
123	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales					3	0.006
124	Bacteria	Cyanobacteria/Chloroplast	Chloroplast	Unclassified	Chloroplast	Streptophyta			3	0.006
125	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria_incertae_sedis	Unclassified	Alkalimonas			3	0.006
126	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Idiomarinaceae	Idiomarina	Idiomarina_planktonica	KC762312	3	0.006
127	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	Carnobacterium			3	0.006
128	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae_1	Bacillus			3	0.006
129	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	Chitinibacter			3	0.006
130	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Thalassolituus	Thalassolituus_marinus	GQ426888	3	0.006
131	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	Iodobacter			3	0.006
132	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylococcaceae	Methylobacter			3	0.006
133	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Syntrophomonadaceae	Syntrophomonas	Syntrophomonas_cellicola	DQ288691	3	0.006
134	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Serratia	Serratia_symbiotica	GU394001	2	0.004
135	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae				2	0.004
136	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Roseovarius	Roseovarius_lutimaris	JF714703	2	0.004
137	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Psychrobacter			2	0.004
138	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Ectothiorhodospiraceae	Acidiferrobacter	Sulfuricaulis_limicola	NR_147747.1	2	0.004
139	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylococcaceae	Methyloprofundus	Methyloprofundus_sedimenti	KF484906	2	0.004
140	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Chromatiaceae	Rheinheimera	Rheinheimera_soli	EF575565	2	0.004
141	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria_incertae_sedis	Unclassified	Methylohalomonas	Methylohalomonas_lacus	DQ834966	2	0.004
142	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria_incertae_sedis	Unclassified	Umbonibacter	Umbonibacter_roseus	NR_145653.1	2	0.004
143	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Klebsiella	Klebsiella_alba	NR_132596.1	2	0.004
144	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	Aeromonas	Aeromonas_eucrenophila	X60411	2	0.004
145	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Hyphomonadaceae				2	0.004
146	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Glaciecola	Glaciecola_punicea	U85853	2	0.004
147	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Pluralibacter	Pluralibacter_pyrinus	AJ010486	2	0.004
148	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Perluclibaca	Perluclibaca_piscinae	DQ664237	2	0.004
149	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Photorhabdus			2	0.004
150	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales					2	0.004
151	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus			2	0.004
152	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Paraglaccola	Glaciecola_arctica	EU365479	2	0.004
153	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Lactovum	Lactovum_miscens	AJ439543	2	0.004

154	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Providencia	Providencia_heimbachae	AM040490	2	0.004
155	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	Alysiella			2	0.004
156	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae				2	0.004
157	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Neorhizobium			2	0.004
158	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Amphritea	KJ867528		2	0.004
159	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae				2	0.004
160	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	Algicola	D89929		2	0.004
161	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Syntrophomonadaceae	Thermosyntropha			2	0.004
162	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales					2	0.004
163	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Buchnera	Buchnera_aphidicola	AE013218	2	0.004
164	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Idiomarinaceae	Alidiomarina	NR_146032.1		2	0.004
165	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Moraxella	AB681778		2	0.004
166	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Chromatiaceae	Halochromatium	Halochromatium_glycolicum	X93472	2	0.004
167	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Colwelliaceae				2	0.004
168	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Psychrobacter	Psychrobacter_urativorans	NR_118813.1	2	0.004
169	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Serratia	Serratia_ureilytica	AJ854062	2	0.004
170	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_agarici	Z76652	2	0.004
171	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Budvicia			2	0.004
172	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Arenicellales	Arenicellaceae	Arenicella	Arenicella_xantha	AB500096	2	0.004
173	Bacteria	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacteriales	Campylobacteraceae				2	0.004
174	Bacteria	Verrucomicrobia	Spartobacteria	Unclassified	Unclassified	Xiphinematobacter			1	0.002
175	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Sporolactobacillaceae	Sporolactobacillus			1	0.002
176	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Achromobacter			1	0.002
177	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Suttonella			1	0.002
178	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cardiobacteriales	Cardiobacteriaceae		Suttonella_indologenes	M35015	1	0.002
179	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae				1	0.002
180	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadales_incertae_sedis	Psychrobium	Gammaproteobacteria_bacter	AB930131	1	0.002
181	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Sinobacteraceae	Steroidobacter	Steroidobacter_denitrificans	EF605262	1	0.002
182	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	Streptococcus_pharyngis	NR_137219.1	1	0.002
183	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Enterobacter			1	0.002
184	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiales_incertae_sedis	Tepidimonas	Tepidimonas_thermarum	AM042693	1	0.002
185	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Franconibacter			1	0.002
186	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Plesiomonas	Plesiomonas_shigelloides	X60418	1	0.002
187	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Shewanellaceae	Shewanella	Shewanella_coralii	FJ041083	1	0.002
188	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp23	Unclassified	Unclassified				1	0.002
189	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pasteurellales	Pasteurellaceae	Actinobacillus			1	0.002
190	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Zymomonas			1	0.002
191	Bacteria	Tenericutes	Mollicutes	Mycoplasmatales	Mycoplasmataceae	Mycoplasma	Mycoplasma_mobile	M24480	1	0.002
192	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_straminea	D84023	1	0.002

193	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pasteurellales	Pasteurellaceae				1	0.002
194	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Luteibacter	Luteibacter_anthropi	FM212561	1	0.002
195	Bacteria	Tenericutes	Mollicutes	Mycoplasmatales	Mycoplasmataceae	Ureaplasma			1	0.002
196	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Bordetella	Bordetella_pertussis	U04950	1	0.002
197	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales	Geobacteraceae	Geopyschrobacter	Geopyschrobacter_electrodip	AY187303	1	0.002
198	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	Acinetobacter_kookii	JX137279	1	0.002
199	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Klebsiella	Klebsiella_singaporensis	AF250285	1	0.002
200	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	Oceanisphaera			1	0.002
201	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Lysobacter			1	0.002
202	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylococcaceae	Methylomonas			1	0.002
203	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	Burkholderia_alpina	NR_146371.1	1	0.002
204	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	Mesorhizobium	Mesorhizobium_albiziae	DQ100066	1	0.002
205	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Alishewanella	Alishewanella_fetalis	AF144407	1	0.002
206	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Litoribrevibacter	Oceanospirillaceae_bacterium	KI000475	1	0.002
207	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Alteromonas			1	0.002
208	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Elizabethkingia	Elizabethkingia_miricola	AB071953	1	0.002
209	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	Desulfovibrio	Desulfovibrio_bizertensis	DQ422859	1	0.002
210	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Legionellales	Coxiellaceae	Coxiella			1	0.002
211	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Xenorhabdus			1	0.002
212	Bacteria	Tenericutes	Mollicutes	Entomoplasmatales	Spiroplasmataceae	Spiroplasma			1	0.002
213	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Polaromonas			1	0.002
214	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Tatumella			1	0.002
215	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Tahibacter			1	0.002
216	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Leuconostocaceae				1	0.002
217	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylococcaceae				1	0.002
218	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Succinivibrionaceae	Ruminobacter	Ruminobacter_amylophilus	Y15992	1	0.002
219	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Leuconostocaceae	Oenococcus	Oenococcus_oeni	AB022924	1	0.002
220	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales					1	0.002
221	Bacteria	Cyanobacteria/Chloroplast	Cyanobacteria	Unclassified					1	0.002
222	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillales_Incertae_Sedis_X	Thermicanus	Thermicanus_aegyptius	AJ242495	1	0.002
223	Bacteria	Firmicutes	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Halothiobacillaceae				1	0.002
224	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	Streptococcus_entericus	AJ409287	1	0.002
225	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hypomicrobiaceae	Devosia			1	0.002
226	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Catenovulum			1	0.002
227	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Shewanellaceae	Shewanella	Shewanella_dokdonensis	GQ245918	1	0.002
228	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae				1	0.002
229	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Massilia	Massilia_eurypsichrophila	NR_136470.1	1	0.002
230	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Hahellaceae	Kistimonas	Kistimonas_asteriae	EU599216	1	0.002
231	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Psychrobacter	Psychrobacter_lutiphocae	FM165580	1	0.002

232	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Orbales	Orbaceae	Frischella	Frischella_perrara	JX878306	1	0.002
233	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pasteurellales	Pasteurellaceae	Bigsgardia			1	0.002
234	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Rhizobium			1	0.002
235	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria	Neisseria_dentiae	AF487709	1	0.002
236	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	Vibrio	Vibrio_nigripulchritudo	X74717	1	0.002
237	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardiaceae	Nocardia			1	0.002
238	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Shewanellaceae	Shewanella	Shewanella_basaltis	EU143361	1	0.002
239	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae_2	Terribacillus			1	0.002
240	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Pectobacterium	Pectobacterium_cacticida	AJ223409	1	0.002
241	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter	Tamilnadubacter_salinus	NR_137364.1	1	0.002
242	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhodobiaceae	Parvibaculum			1	0.002
243	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Erwinia	Erwinia_billingiae	JN175337	1	0.002
244	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Thorsella			1	0.002
245	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Brenneria	Brenneria_alni	NR_114705.1	1	0.002
246	Bacteria	Candidatus_Caescamantes	Unclassified	Unclassified	Unclassified	Candidatus_Caescibacterium	bacterium_EMVclassified19	U05662	1	0.002
247	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Methylarcula	Methylarcula_marina	AF030436	1	0.002
248	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Pediococcus	Pediococcus_siamensis	AB258357	1	0.002
249	Bacteria	Chlamydiae	Chlamydia	Chlamydiales	Chlamydiaceae	Chlamydia			1	0.002
250	Bacteria	Firmicutes							1	0.002
251	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Shewanellaceae	Shewanella	Shewanella_glaealipiscicola	AB205571	1	0.002
252	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Oleispira	Oleispira_antarctica	A426420	1	0.002
253	Bacteria	DeinococcusUnclassifiedThermus	Deinococci	Deinococcales	Deinococcaceae	Deinococcus	Deinococcus_xibeiensis	NR_117922.1	1	0.002
254	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteriaceae	Phaeobacter	Phaeobacter_gallaeciensis	Y13244	1	0.002
255	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Massilia			1	0.002
256	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_xanthomarina	AB176954	1	0.002
257	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Coralomonas	Alkalimarinus_sediminis	NR_137384.1	1	0.002
258	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Oleispira	Oleispira_lenta	EU980447	1	0.002
259	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Gracilbacteraceae	Lutispora	Lutispora_thermophila	AB186360	1	0.002
260	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	Tolurmonas			1	0.002
261	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Ignatzschineria			1	0.002
262	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillales_incertae_sedis	Gyvuella	Gyvuella_sunshinyii	KC213486	1	0.002
263	Bacteria	Proteobacteria	Deitaproteobacteria	Myxococcales	Sandaracinaceae	Sandaracinus	Sandaracinus_amyolyticus	HQ540311	1	0.002
264	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae	Galenea	Galenea_microaerophila	JQ080912	1	0.002
265	Bacteria	DeinococcusUnclassifiedThermus	Deinococci	Deinococcales	Deinococcaceae	Deinococcus			1	0.002
266	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Shewanellaceae	Shewanella	Shewanella_algidipiscicola	AB205570	1	0.002
267	Bacteria	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacteriales	Campylobacteraceae	Campylobacter	Campylobacter_aviium	EU623473	1	0.002
268	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae_2				1	0.002
269	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales					1	0.002
270	Bacteria	Proteobacteria	Deitaproteobacteria	Desulfobacteriales					1	0.002

271	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfivibrionales	Desulfivibrionaceae	Desulfivibrio	Desulfivibrio_gabonensis	U31080	1	0.002
272	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_putida	D84020	1	0.002
273	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	Streptococcus_dysgalactiae	AB002485	1	0.002
274	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales					1	0.002
275	Bacteria	Bacteroidetes							1	0.002
276	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Mycococcales	Nannocystaceae	Nannocystis			1	0.002
277	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Balnearix	Balnearix_alpica	Y17112	1	0.002
278	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Shewanellaceae	Shewanella	Shewanella_surgensis	AB094597	1	0.002
279	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Psychromonadaceae	Psychromonas	Psychromonas_antarctica	Y14697	1	0.002
280	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae_1	Caloramator	Caloramator_coolhaasii	AF104215	1	0.002
281	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Microbulifer	Microbulifer_hydrolyticus	U58338	1	0.002
282	Bacteria	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	Arcobacter	Arcobacter	L14627	1	0.002
283	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Xanthomonas			1	0.002
284	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	Oceanimonas			1	0.002
285	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae_1	Clostridium	Clostridium_sensu_stricto	AB018183	1	0.002
286	Bacteria	Fusobacteria	Fusobacterilia	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium			1	0.002
287	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Idiomarinaceae	Idiomarina			1	0.002
288	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae_2	Oceanobacillus			1	0.002
289	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae		Oceanobacillus_neutrophilus	EU709018	1	0.002
290	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Idiomarinaceae				1	0.002
291	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptoniphilaceae	Peptoniphilus	Peptoniphilus_obesi	NR_125607.1	1	0.002
292	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Chitinomonas			1	0.002
293	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Pasteurellales	Pasteurellaceae	Vespertillibacter	Vespertillibacter_pulmonis	KF031240	1	0.002
294	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Gammaaproteobacteria_incertae_sedis	Unclassified	Eionea			1	0.002
295	Bacteria	Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter	Marinobacter_maritimus	AJ704395	1	0.002

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

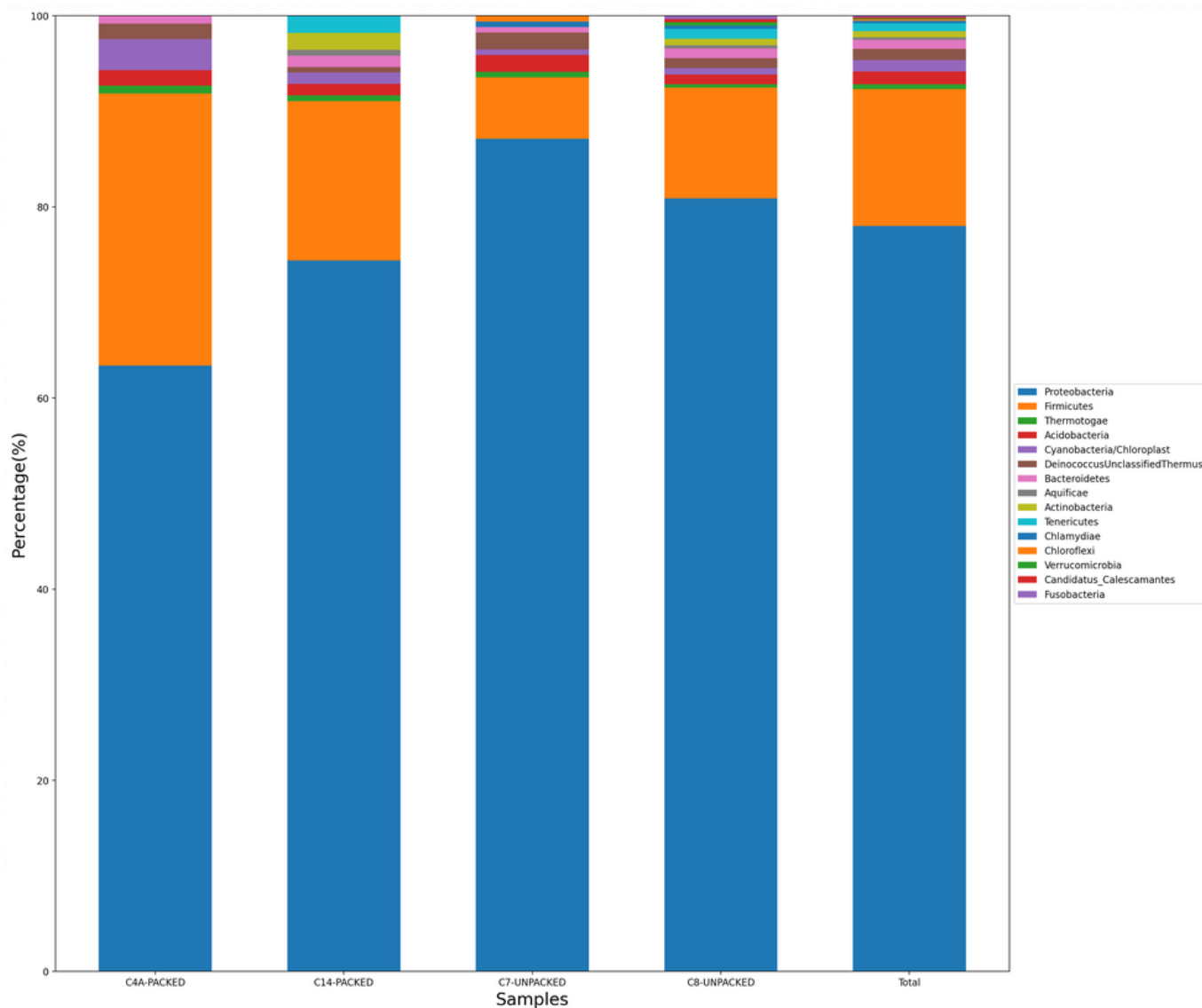
Αποτελέσματα

4.1: Ανάλυση αποτελεσμάτων NGS

Όπως είναι εύκολα αντιληπτό από τους πίνακες αποτελεσμάτων του κεφαλαίου 3, ένα μεγάλο ποσοστό του συνόλου των μικροοργανισμών αντιστοιχεί σε μικροοργανισμούς που δεν μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν. Πιο συγκεκριμένα τα ποσοστά αυτά ανέρχονται σε 49,08% για το δείγμα C4 PACKED, 62,9% για το δείγμα C7 UNPACKED, 58,24% για το δείγμα C8 UNPACKED και 50,95% για το δείγμα C14 PACKED και χαρακτηρίζονται ως Unclassified. Οι στατιστικές αναλύσεις και χειρισμοί που πραγματοποιήθηκαν αφορούν τους αντίστοιχους πληθυσμούς από τους οποίους το μη ταυτοποιημένο κομμάτι έχει εξαιρεθεί. Οι στατιστικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν γράφηκαν σε γλώσσα προγραμματισμού *python* και ο σχεδιασμός των διαγραμμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω χρήσης των πακέτων απεικόνισης στατιστικών δεδομένων *Matplotlib* και *Seaborn*. Όσο για τους μη ταυτοποιημένους πληθυσμούς μπορούμε να υποθέσουμε ότι συμπεριφέρονται με ανάλογο τρόπο.

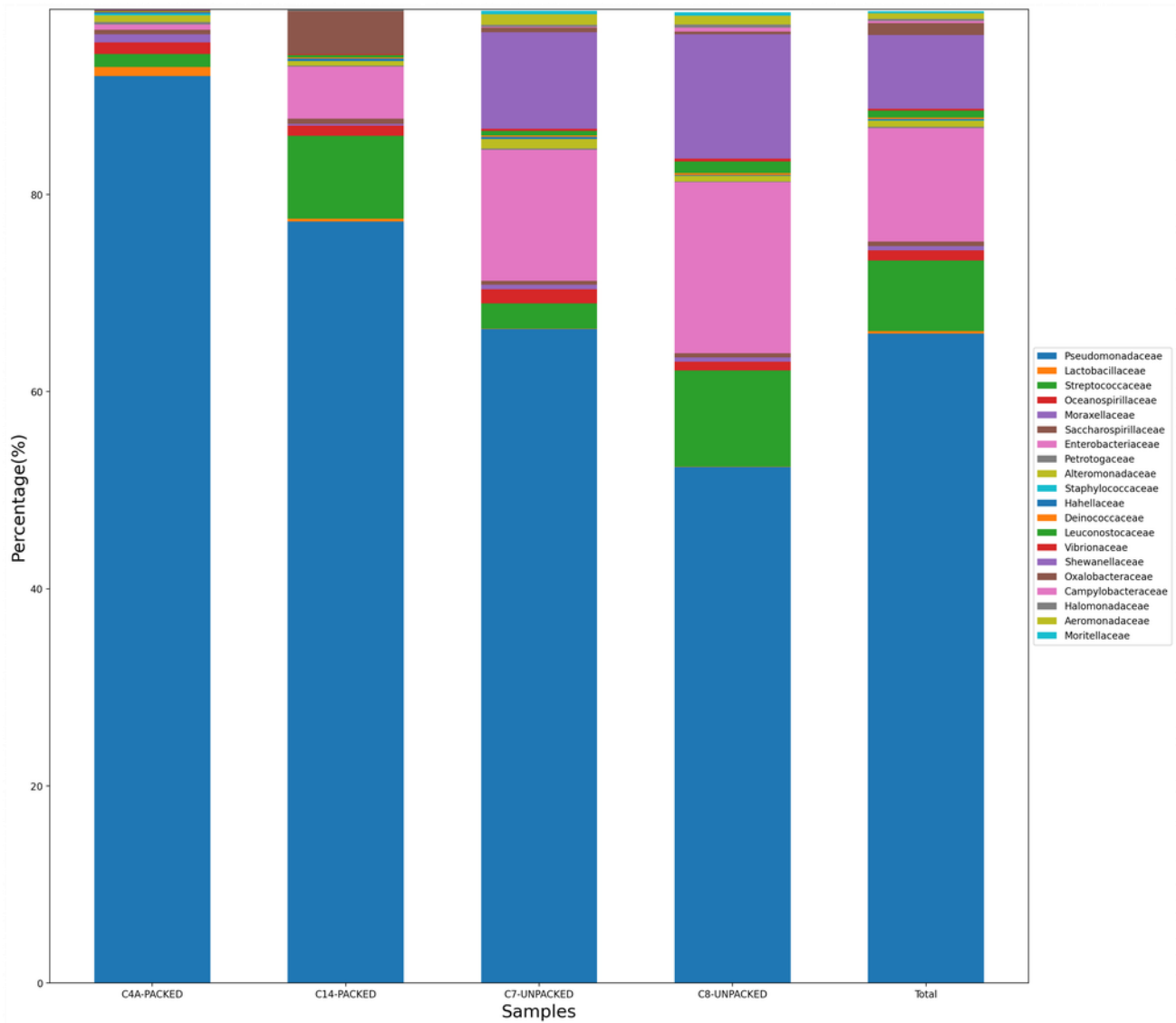
4.2.1: Βακτηριακή ποικιλότητα για τον ανθότυρο

Το μικροβίωμα όλων των δειγμάτων ανθότυρου που αναλύθηκαν με NGS αποτελείται από 203 Είδη βακτηρίων τα οποία συνυπάρχουν ταξινομικά σε 241 Γένη, 101 Οικογένειες και 15 Φύλα. Το πιο κυρίαρχο Φύλο ήταν τα *Proteobacteria* (78,01% μεταξύ των ειδών) ακολουθούμενο από τα *Firmicutes* (14,30% μεταξύ των ειδών), *Acidobacteria* (1,33% μεταξύ των ειδών), *Cyanobacteria* (1,19% μεταξύ των ειδών), *Bacteroidetes* (0,93% μεταξύ των ειδών) και *Thermotogae* (0,53% μεταξύ των ειδών). Τα *Proteobacteria* αποτελούν ένα από το πιο ποικιλόμορφα Gram-αρνητικά βακτήρια τα οποία σύμφωνα με πολλές μελέτες είναι υπεύθυνα για αρκετές ανθρώπινες παθολογικές ασθένειες. Το δεύτερο πιο κυρίαρχο Φύλο, τα *Firmicutes* αποτελούν Gram-θετικά βακτήρια, κυρίως των Γενών *Lactococcus*, *Lactobacillus* και *Streptococcus* και η παρουσία τους σύμφωνα με αρκετές μελέτες είναι απολύτως αναμενόμενη καθώς είναι απόλυτα συνδεδεμένα με προϊόντα τα οποία προέρχονται από πρόβειο και κατσικίσιο γάλα. Η ποσοστιαία καταμέτρηση για τα φύλα παρουσιάζεται αναλυτικά στο διάγραμμα 4.1 .



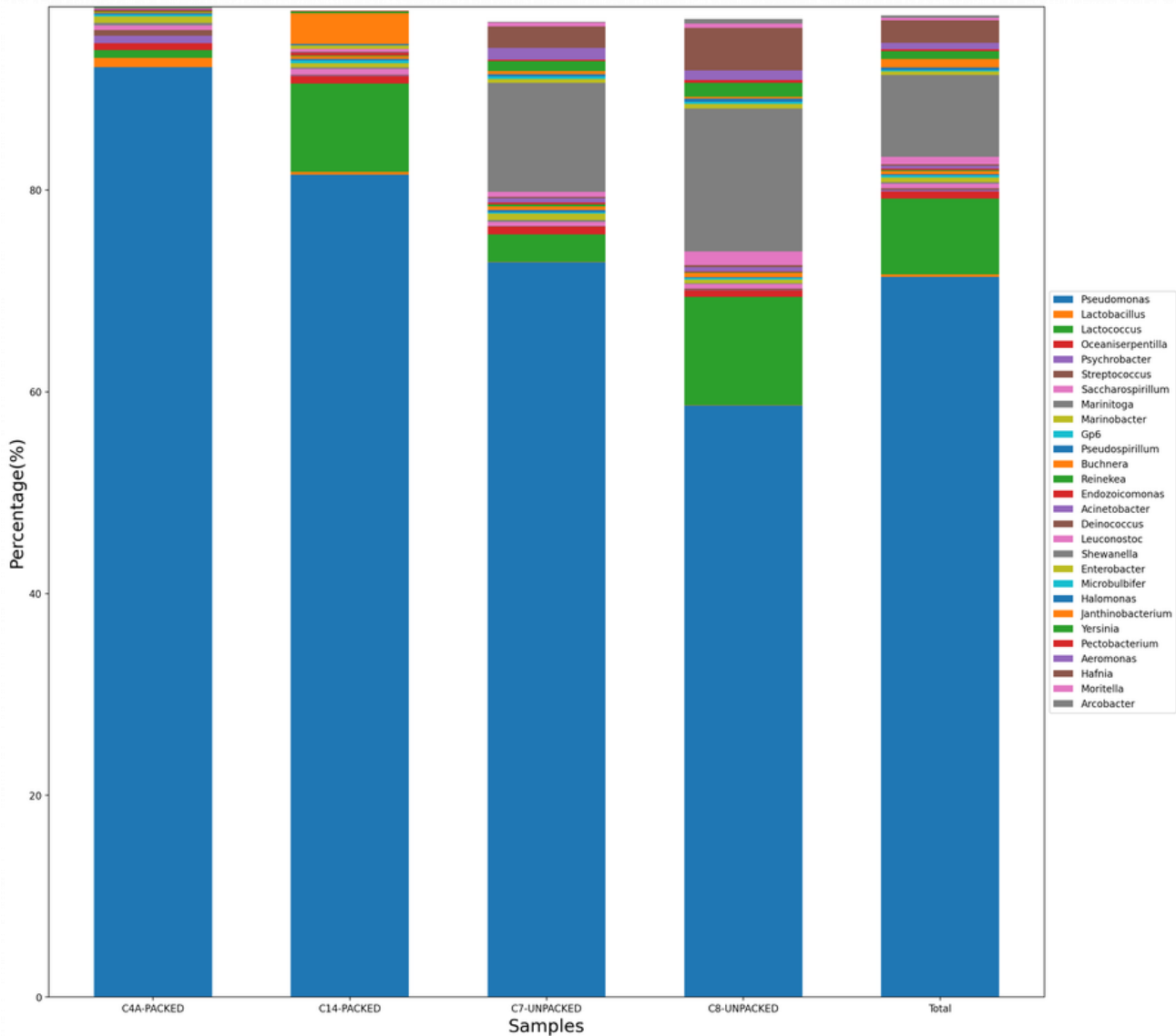
Διάγραμμα 4.1, Διάγραμμα ποσοστιαίας καταμέτρησης των Φύλων μεταξύ των τεσσάρων δειγμάτων που αναλύθηκαν (generated with Matplotlib)

Στο διάγραμμα 4.2 παρουσιάζεται η ποσοστιαία καταμέτρηση για τις Οικογένειες μεταξύ των τεσσάρων δειγμάτων και μεταξύ του συνόλου. Στο διάγραμμα συμπεριλήφθηκαν μόνο οι 20 πιο κυρίαρχες Οικογένειες με ποσοστά μεγαλύτερα από 0,054% , με την Οικογένεια *Pseudomonacae* να αποτελεί την πιο κυρίαρχη μεταξύ των τεσσάρων δειγμάτων (65,91% μεταξύ των ειδών). Σε μεγάλα ποσοστά ανιχνεύθηκαν επίσης οι *Lactobacillaceae* (0,22% μεταξύ των ειδών) και *Streptococcaceae* (7,18% μεταξύ των ειδών), με δικαιολογημένη παρουσία καθώς αποτελούν συνηθισμένες καλλιέργειες εκκίνησης LAB για το συγκεκριμένο είδος τυριού. Τα υπεραυξημένα ποσοστά *Pseudomonacae* και *Enterobacteriaceae* (11,52% μεταξύ των ειδών) υποδηλώνουν λάθη στις συνθήκες αποθήκευσης, συντήρησης και μεταφοράς καθώς η παρουσία τους σε τέτοια ποσοστά πιθανό να οφείλεται σε επιμολύνσεις κατά τα προαναφερθέντα στάδια. Παρατηρήθηκαν επίσης σημαντικοί πληθυσμοί των Οικογενειών *Moraxellaceae* (0,43% μεταξύ των ειδών) *Oceanospirillaceae* (1,04% μεταξύ των ειδών).



Διάγραμμα 4.2, Διάγραμμα ποσοστιαίας καταμέτρησης των Οικογενειών μεταξύ των τεσσάρων δειγμάτων που αναλύθηκαν (generated with Matplotlib)

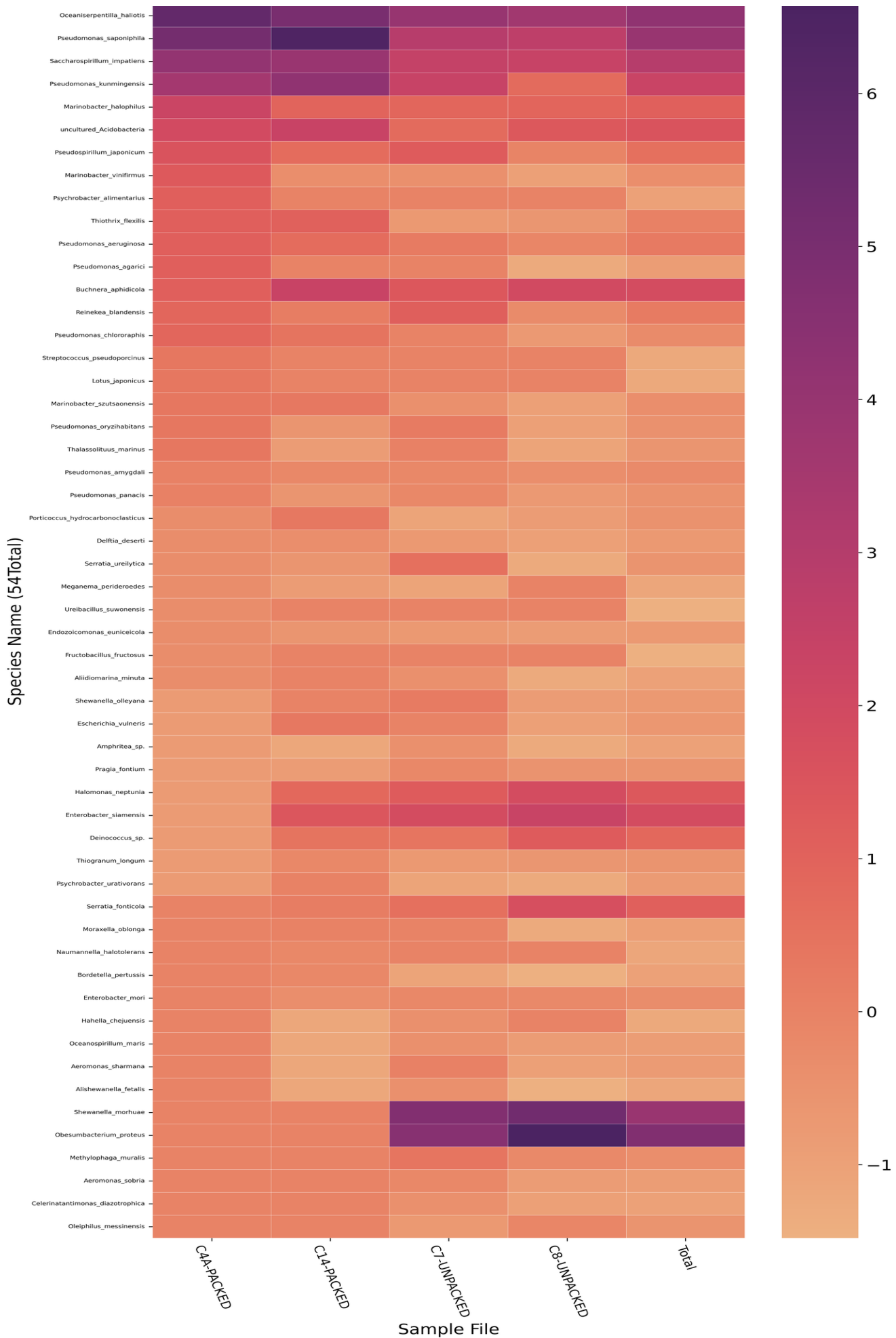
Κατασκευάστηκε επίσης το διάγραμμα 4.3 στο οποίο παρουσιάζεται η ποσοστιαία καταμέτρηση για τα γένη των τεσσάρων δειγμάτων που αναλύθηκαν. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται τα 28 πιο κυρίαρχα Γένη με ποσοστά μεγαλύτερα του 0,042% με τα έξι πιο κυρίαρχα Γένη να είναι τα *Pseudomonas* (71,38% μεταξύ των ειδών), *Lactococcus* (7,53% μεταξύ των ειδών), *Oceaniserpentilla* (0,68% μεταξύ των ειδών), *Lactobacillus* (0,24% μεταξύ των ειδών), *Streptococcus* (0,18% μεταξύ των ειδών) και *Psychrobacter* (0,14% μεταξύ των ειδών).



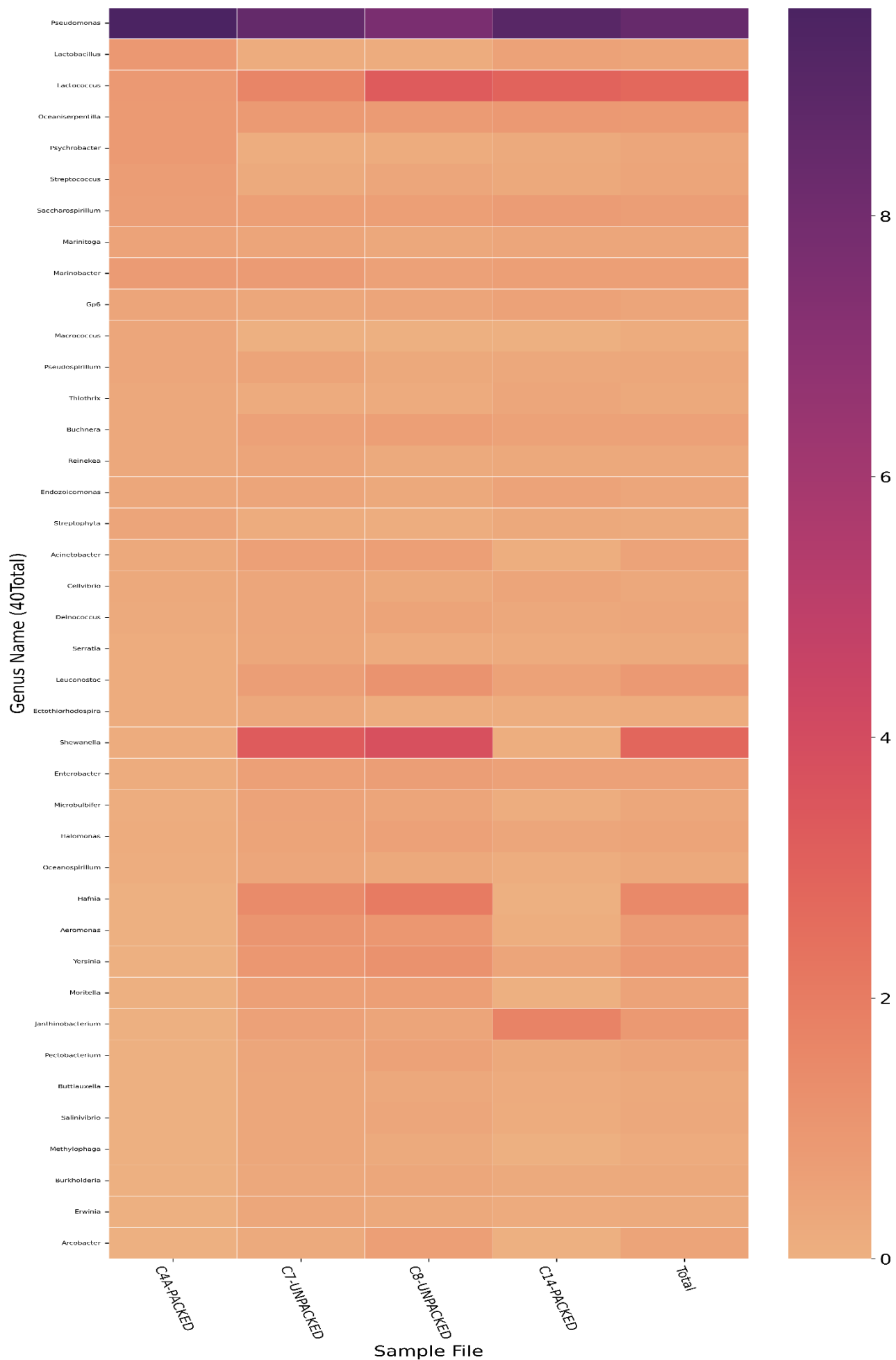
Διάγραμμα 4.3, Διάγραμμα ποσοστιαίας καταμέτρησης των Γενών μεταξύ των τεσσάρων δειγμάτων που αναλύθηκαν (generated with Matplotlib)

4.2.2: Απεικόνιση των Ειδών και Γενών για τον ανθότυπο

Για την απεικόνιση των κυρίαρχων ειδών μεταξύ των τεσσάρων δειγμάτων που αναλύθηκαν κατασκευάστηκε το διάγραμμα 4.4, το οποίο αποτελεί ένα heatmap στο οποίο παρουσιάζονται τα 54 πιο κυρίαρχα Είδη που ανιχνεύθηκαν μεταξύ των δειγμάτων καθώς και μεταξύ του ολικού μικροβιώματος που ανιχνεύθηκε με τη χρήση NGS. Το χρώμα κάθε κελιού υποδηλώνει την τιμή της περιεκτικότητας κάθε είδους μεταξύ των δειγμάτων. Ως προς τη διαμόρφωση της χρωματικής κλίμακας, για πιο ομαλή κατανομή και ξεκάθαρη παρουσίαση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση Box-Cox. Τα παρόμοια Είδη μεταξύ των δειγμάτων ομαδοποιήθηκαν και το συνολικό πληθυσμιακό ποσοστό τους επεξεργάστηκε με χρήση της εξίσωσης.



Διάγραμμα 4.4, Heatmap πληθυσμιακών τιμών για τα Είδη μεταξύ των δειγμάτων (generated with Seaborn)



Διάγραμμα 4.5, Heatmap πληθυσμιακών τιμών για τα Γένη μεταξύ των δειγμάτων (generated with Seaborn)

Με παρόμοιο τρόπο εργαστήκαμε για την κατασκευή του διαγράμματος 4.5, το οποίο αποτελεί Heatmap στο οποίο φαίνεται η κατανομή για τα 40 πιο κυρίαρχα Γένη μεταξύ των τεσσάρων δειγμάτων. Λαμβάνοντας τα αποτελέσματα για τα γένη, παρατηρούμε πως το σύνολο των δεδομένων εμφανίζουν πολύ μεγάλο εύρος τιμών. Αυτό συμβαίνει λόγω της περίπτωσης του γένους *Pseudomonas*, η ακραία τιμή του οποίου φαίνεται να είναι υπερδεκαπλάσια των υπόλοιπων, καθιστώντας οποιοσδήποτε διαφορές μεταξύ των υπόλοιπων κελιών μη εμφανείς. Για τον λόγο αυτό, ήταν αναγκαίο να χρησιμοποιηθεί κάποιο είδος κλιμάκωσης που θα μπορέσει να φέρει τις τιμές πιο κοντά μεταξύ τους, ώστε να είναι εμφανέστερες οι διαφορές μεταξύ των κελιών του διαγράμματος. Επομένως για πιο ξεκάθαρη κατανομή των αποτελεσμάτων, για την διαμόρφωση της χρωματικής κλίμακας επιλέχθηκε η κλιμάκωση τετραγωνικής ρίζας στις τιμές των ποσοστών.

Στην περίπτωση των Species, τα αποτελέσματα μας είναι παρόμοια των ανωτέρων, με το εύρος τιμών να διαμορφώνεται στην πραγματικότητα από έναν μικρό αριθμό τιμών. Παρόλα αυτά, στη συγκεκριμένη περίπτωση οι ακραίες τιμές που λαμβάνουν τα κελιά δεν εμφανίζουν τόσο μεγάλη απόκλιση μεταξύ τους. Ταυτόχρονα, είναι εμφανές πως τα δεδομένα δεν εμφανίζουν σε καμία περίπτωση κάποιου είδους κανονική κατανομή. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιείται κλιμάκωση μέσω της αρχικής μορφής της εξίσωσης Box-Cox, θέτοντας το $\lambda=0.5$. Η επιλογή λ μικρότερου του 1 έγινε επειδή θέλαμε εκ νέου τον περιορισμό ακραίων τιμών, ώστε να γίνουν εμφανέστερες οι διαφορές μεταξύ των δεδομένων.

Εξίσωση Box-Cox:

$$y_i^{(\lambda)} = \begin{cases} \frac{y_i^\lambda - 1}{\lambda} & \text{if } \lambda \neq 0, \\ \ln(y_i) & \text{if } \lambda = 0, \end{cases}$$

4.3: Συζήτηση

Η τεχνική 16S metagenomic analysis δίνει μία πολύ καλή εικόνα του συνόλου των βακτηρίων που υπάρχουν σε ένα δείγμα, είτε των ζωντανών βακτηρίων που βρίσκονται την στιγμή της ανάλυσης στο δείγμα, είτε των βακτηρίων που έχουν θανατωθεί αλλά έχει παραμείνει το γενετικό τους υλικό (DNA) μέσα στο δείγμα. Επομένως, λαμβάνουμε πληροφορίες για το βακτηριακό αποτύπωμα που έχει ένα βιολογικό δείγμα και όταν πρόκειται για ένα τρόφιμο, μπορούμε να αντλήσουμε στοιχεία για το μικροβιακό περιβάλλον στο οποίο παράγεται, για τις συνθήκες υγιεινής στην διαδικασία παραγωγής, για την παρουσία μικροοργανισμών που πιθανόν να επηρεάζουν τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά, την ποιότητά του ή και τον ρυθμό αλλοίωσής του και για την παρουσία διαφόρων κατηγοριών μικροοργανισμών που μπορεί να είναι είτε παθογόνοι, είτε αλλοιογόνοι, είτε

ωφέλιμοι (πχ προβιοτικοί μικροοργανισμοί). Μια ουσιαστική ομαδοποίηση που θα μπορούσε να γίνει μεταξύ των τεσσάρων δειγμάτων είναι με βάση τη συσκευασία τους. Είναι εμφανές πως στα δύο συσκευασμένα δείγματα C4 A Packed και C14 Packed, τα ποσοστά των *Proteobacteria* (63.41% και 74.41% αντίστοιχα) είναι εμφανώς μειωμένα σε σχέση με αυτά των μη συσκευασμένων δειγμάτων C7 Unpacked και C8 Unpacked (87.14% και 80.89% αντίστοιχα). Τα *Firmicutes* όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε στο διάγραμμα 4.1 λειτουργούν αντίστροφα έχοντας μεγαλύτερα ποσοστά στα συσκευασμένα δείγματα (28.45% και 16.66% για τα C4 A Packed και C14 Packed αντίστοιχα) και χαμηλότερα στα μη συσκευασμένα (6.43% και 11.60% για τα C7 Unpacked και C8 Unpacked αντίστοιχα). Ως προς τις Οικογένειες παρατηρήθηκαν μεγάλα ποσοστά της Οικογένειας *Enterobacteriaceae* στα μη συσκευασμένα δείγματα 17.72 % και 15.15 % για τα C7 Unpacked και C8 Unpacked αντίστοιχα αλλά και ένα σημαντικό ποσοστό 13.15% για το C14 Packed. Όσον αφορά τα γένη, τα ποσοστά του κυρίαρχου γένους *Pseudomonas* είναι υψηλότερα στα δύο συσκευασμένα δείγματα (11.76% και 8.03% για τα C4 A Packed και C14 Packed αντίστοιχα) σε σχέση με τα δύο μη συσκευασμένα (7.24% και 5.60% για τα C7 Unpacked και C8 Unpacked αντίστοιχα). Ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού που ανιχνεύθηκε αποτελεί βακτήρια του γένους *Pseudomonas*. Τα *Pseudomonas spp.* είναι αερόβια, μη σπορογόνα, Gram-αρνητικά, ραβδοειδή στο σχήμα βακτήρια. Ορισμένα από τα είδη εμφανίζουν διακριτές μορφολογίες αποικιών ή χρωματισμό (π.χ. το μπλε-πράσινο παράγωγο της φαιναζίνης, η πυοκυανίνη, και οι κιτρινοπράσινες φθορίζουσες χρωστικές (Kiska and Gilligan, 1999). Τα ψυχρότροφα *Pseudomonas* αναγνωρίζονται ως σημαντικοί μικροοργανισμοί αλλοίωσης με βάση τα εξωκυτταρικά τους ένζυμα. Τα ένζυμα είναι γενικά καλός δείκτης της ποιότητας διατήρησης τροφίμων πλούσιων σε πρωτεΐνες και λιπίδια (Cousin, 2001). Τα *Pseudomonas* θα έπρεπε να είχαν καταστραφεί μετά τη διαδικασία της παστερίωσης. Ο λόγος για τον οποίο οι συγκεντρώσεις αυτές είναι τόσο αυξημένες οφείλεται σε μη επιλογή κατάλληλης μεθόδου αποθήκευσης, ημιτελή διαδικασία της παστερίωσης, επιμολύνσεις λόγω απρόσεκτης μεταφοράς ή χειρισμού στο χώρο του εργαστηρίου ή κάποιο συνδυασμό των παραπάνω παραγόντων. Η επόμενη πληθυσμιακή μονάδα που μας απασχόλησε είναι τα LAB, τα οποία χρησιμοποιούνται γενικά ως καλλιέργειες εκκίνησης σε τυριά αλλά όχι στην περίπτωσή μας, αφού για παραγωγή ανθότυρων δεν χρησιμοποιούνται καλλιέργειες εκκίνησης. Είναι πολύ πιθανό όμως, η παρουσία των LAB αυτών στους χώρους παραγωγής ή στον εξοπλισμό να αποτελεί πηγή επιμόλυνσης στην πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται για την παραγωγή ανθότυρου. Οι πιο συνήθεις καλλιέργειες εκκίνησης των γενών *Lactococcus*, *Lactobacillus* και *Streptococcus* βρέθηκαν σε υψηλά ποσοστά. Επίσης παρατηρήθηκε το *Psychrobacter* το οποίο όπως και τα περισσότερα ψυχρότροφα βακτήρια είναι υπεύθυνο για την καταστροφή ορισμένων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τυριού. Ωστόσο, η παρουσία μεγάλης ποικιλίας ειδών LAB που δεν αποτελούν εκκινήτες σε εμπορικά τυριά ΠΟΠ είναι επίσης σημαντική, καθώς αποτελούν μέρος του φυσικού μικροβιώματος του γάλακτος, καθώς και του περιβάλλοντος του εξοπλισμού και της επεξεργασίας και μπορεί να συμβάλλουν σημαντικά στην ωρίμανση και την ανάπτυξη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τυριού.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτέλεσε ο εντοπισμός μεγάλων συγκεντρώσεων του βακτηρίου *Oceaniserpentilla haliotis* της Οικογένειας *Oceanospirillaceae* στα τρία από τα τέσσερα δείγματα στα οποία εργαστήκαμε και πιο συγκεκριμένα το στέλεχος AM747817 για το οποίο πολύ λίγες πληροφορίες μας είναι γνωστές. Η οικογένεια *Oceanospirillaceae*, που ανήκει στην τάξη *Oceanospirillales*, αποτελείται σήμερα από 17 γένη, συμπεριλαμβανομένων των *Amphritea*, *Balneatrix*, *Bermanella*, *Marinomonas*, *Marinospirillum*, *Neptuniibacter*, *Neptunomonas*, *Nitrincola*, *Oceaniserpentilla*, *Oceanobacter*, *Oceanospirillum*, *Oleibacter*, *Oleispira*, *Pseudospirillum*, *Reinekea*, *Spongiispira* και *Thalassolituus*. Όλα έχουν περιεκτικότητα σε GC του DNA 41-63 mol% και είναι κατά βάση αερόβια αρνητικά κατά gram βακτήρια. (Masataka Satomi & Tateo Fujii, 2014). Πολλά είδη *Oceanospirillaceae* έχουν μοναδικά χαρακτηριστικά που εφαρμόζονται σε βιομηχανικούς τομείς, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας αποικοδόμησης ενώσεων πετρελαίου και έκκρισης βακτηριοκτόνων ενώσεων ή χρωστικής μελανίνης. Η παρουσία τους ωστόσο είναι από τη μία ανορθόδοξη καθώς πρόκειται για βακτήρια τα οποία συναντώνται σε θαλάσσιο περιβάλλον ιδίως ωκεανών και κοραλλιογενών υφάλων, από την άλλη όμως δικαιολογημένη αφού τα περισσότερα γένη της οικογένειας ευδοκούν ιδανικά σε περιβάλλον με υψηλές περιεκτικότητες άλατος, όπως τα τρία δείγματα (Masataka Satomi & Tateo Fujii, 2014). Μια άλλη οικογένεια πρωτεοβακτηρίων που βρέθηκε σε αφθονία είναι η *Moraxellaceae*, με το *Acinetobacter* να είναι το πιο διαδεδομένο αρνητικό κατά Gram γένος, το οποίο βρέθηκε στα τρία από τα τέσσερα δείγματα, με ποσοστό που κυμαινόταν από 0,005% έως 0,125%. Τα υπόλοιπα είδη *Moraxellaceae* που ταυτοποιήθηκαν ήταν τα *Perlucidibaca*, *Psychrobacter alimentarius*, *Psychrobacter urativorans* και *Moraxella oblonga*. Το *Acinetobacter* είναι ένας ψυχρότροφος μολυσματικός παράγοντας που έχει βρεθεί να μολύνει το νωπό κατσικίσιο γάλα (Kamilari, E., Anagnostopoulos, D.A., Papademas, P., Efthymiou, M., Tretiak, S., Tsaltas, 2020) και οι ψυχρότροφες απομονώσεις του από το νωπό γάλα μπορεί να είναι ιδιαίτερα λιπολυτικές (Hantsis-Zacharov, 2007).

4.4: Συμπεράσματα

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων NGS των τεσσάρων δειγμάτων ανθότυρου μας προσέφερε μια εικόνα 203 βακτηριακών ειδών. Από το γεγονός αυτό μπορούμε να καταλάβουμε πως το περιβάλλον ενός τυριού το οποίο δεν αποτελεί προϊόν ωρίμανσης, όπως είναι ο ανθότυρος, έχει τη δυνατότητα να φιλοξενήσει ένα πολυσύνθετο μικροβιακό αποτύπωμα ποικίλων ειδών, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να συνυπάρχουν μεταξύ τους. Επιπλέον, εάν εξαιρέσουμε την πληθυσμιακή ποσότητα που δεν κατάφερε να ταυτοποιηθεί, κρίνοντας από τα αποτελέσματα των αναλύσεων βλέπουμε ότι με τη χρήση της τεχνολογίας NGS, μιας τεχνολογίας ανεξάρτητης από τις καλλιέργειες εκκίνησης, η οποία μπορεί να εφαρμοστεί σχετικά άμεσα σε μια τεράστια ποικιλία δειγμάτων, είναι δυνατή η διερεύνηση και η αποτύπωση με εξαιρετική λεπτομέρεια του μικροβιώματος του ανθότυρου το οποίο ένα ευαλλοίωτο προϊόν και αποτελεί ένα ενδιαφέρον περιβάλλον για μελέτη. Επίσης το επίπεδο της λεπτομέρειας που προσφέρει η τεχνολογία NGS στον τομέα της καταγραφής των αποτελεσμάτων είναι ανώτερο σε πολλά επίπεδα σε σχέση με αυτό που θα προσέφερε μια ανάλυση εξαρτώμενη από τις καλλιέργειες εκκίνησης. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι ένα μεγάλο κομμάτι του πληθυσμού δεν κατάφερε να ταυτοποιηθεί, οι πληροφορίες αυτές αποτελούν ουσιαστικά ένα στιγμιότυπο μιας μεγαλύτερης και πολύ πιο σύνθετης εικόνας των μικροβιακών κοινοτήτων των γαλακτοκομικών προϊόντων ωρίμανσης, η οποία δεν παύει να είναι χρήσιμη, δεδομένου ότι οι διάφοροι μικροοργανισμοί είτε εμπεριέχονται ενδογενώς σε κάποια από τις πρώτες ύλες είτε προσκολλώνται εξωγενώς ως επιμολύνσεις από λαθεμένους χειρισμούς επεξεργασίας, αποθήκευσης και διανομής. Δεδομένου ότι όλοι οι χειρισμοί εκτελούνται σωστά, το ολικό μικροβίωμα έχει σημαντική επίδραση στις τελικές οργανοληπτικές ιδιότητες στην συνολική ποιότητα του προϊόντος καθώς και στον τελικό χρόνο ζωής του.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη Βιβλιογραφία:

1. Martley, F. G., & Crow, V. L. (1993). Interactions between Non-starter Microorganisms during Cheese Manufacture and Ripening. In *Int. Dairy Journal* (Vol. 3).
2. Smit, Gerrit. (2003). *Dairy processing : improving quality*. CRC Press.
3. M. Calasso, M. Gobbetti, in *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Second Edition), 2011
4. Marco Gobbetti, in *Encyclopedia of Food Microbiology*, 1999
5. M. Gobbetti, F. Minervini, in *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition), 2014
6. S. Bredholt, T. Nesbakken, A. Holck (2001), Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats
7. Eileen F. O'Shea, Paula M. O'Connor, Emma J. Raftis, Paul W. O'Toole, Catherine Stanton, Paul D. Cotter, R. Paul Ross, and Colin,(2011) Hill Production of Multiple Bacteriocins from a Single Locus by Gastrointestinal Strains of *Lactobacillus salivarius*
8. Messaoudi, S., Manai, M., Kergourlay, G., Prévost, H., Connil, N., Chobert, J. M., & Dousset, X. (2013). *Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity. In *Food Microbiology* (Vol. 36, Issue 2, pp. 296–304).
9. Saxelin, M., Grenov, B., Svensson, U., Fonde'n, R., Reniero, R., & Mattila-Sandholm, T. (1999). The technology of probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 387–392.
10. Mattila-Sandholm, T. (1999). The PROBDEMO project: Demonstration of the nutritional functionality of probiotic foods. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 385–386.
11. Lourens-Hattingh, A., and B. C. Viljoen. 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *Int. Dairy J.* 11:1–17.
12. FONDÉN R (1989) 'Development of new fermented milk products', *Food Techn Int Europe*, 1989(1), 158–160.
13. Hawley, H. B., P. A. Shepard, and D. M. Wheeler, 1959. Factors affecting the implantation of lactobacilli in the intestine. *J. Appl. Bacteriol.* 22: 360-367.

14. Gilliland, S.E. (1989) Acidophilus milk products: a review of potential benefits to consumers. *J. Dairy Sci.* 72, 2483-2493.
15. Speck, M. L. 1975. Market outlook for acidophilus food products. *Cult. Dairy Prod. J.* 10(4):8-10
16. YOUNG C K and NELSON F E (1978), 'Survival of *Lactobacillus acidophilus* in sweet acidophilus milk during refrigerated storage', *J Food Protec*, 41(4), 248–250.
17. HAGEN M and NARVHUS A (1999), 'Production of ice cream containing probiotic bacteria', *Milchwissenschaft*, 54(3), 265–268.
18. HEKMAT S and MCMAHON D J (1992), 'Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food', *J Dairy Sci*, 75(6), 1415–1422.
19. ALAMPREESE C, FOSCHINO R, ROSSI M, POMPEI C and SAVANI L (2002), 'Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and influence of its addition in retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentrations', *Int Dairy J*, 12(2), 201–208.
20. GARDINER G E, O'SULLIVAN E, KELLY J, AUTY M A E, FITZGERALD G F, COLLINS J K, ROSS R P and STANTON C (2000), 'Comparitive survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying', *Appl Envir Microbiol*, 66(6), 2605–2612.
21. GARDINER G, STANTON C, LYNCH P B, COLLINS J K, FITZGERALD G and ROSS R P (1999), 'Evaluation of cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract', *J Dairy Sci*, 82(7),1379–1387.
22. GARDINER G E, O'SULLIVAN E, KELLY J, AUTY M A E, FITZGERALD G F, COLLINS J K, ROSS R P and STANTON C (2000), 'Comparitive survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying', *Appl Envir Microbiol*, 66(6), 2605–2612.
23. GILLILAND S E (1989), 'Acidophilus milk products: a review of potential benefits to the consumers', *J Dairy Sci*, 72(10), 2483–2494.
24. LINDBERG A, CHRISTIANSSON A, RUKKE E, EKLUND T and MOLIN G (1996), 'Bacterial flora of Norwegian and Swedish semi-hard cheeses after ripening, with special references to *Lactobacillus*', *Neth Milk Dairy J*, 50(4), 563–572.
25. BJÖRNEHOLM S and FONDÉN R (2002), 'Lactobacillus F19 – closing the broken circle' *Microb Ecol Health Dis*, Suppl (3), 3.

26. BJÖRNEHOLM S, EKLÖW A, SAARELA M and MÄTTÖ J (2002), 'Enumeration and identification of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19', *Microbiol Ecol Health Dis*, Suppl 3, 7–13.
27. GOMES A M P, MALCATA F A, KLAVER M and GRANDE H G (1995), 'Incorporation and survival of *Bifidobacterium* sp. strain Bo and *Lactobacillus acidophilus* strain Ki in a cheese product', *Neth Milk Dairy J*, 49(2), 71–95.
28. VINDEROLA C G, PROSELLO W, Ghiberto T D and Reinheimer J A (2000), 'Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco cheese', *J Dairy Sci*, 83(9), 1905–1911.
29. DALY C and DAVIS R (1998), 'The biotechnology of lactic acid bacteria with emphasis on applications in food safety and human health', *Agric. Food Sci Finland*, 7, 251–265.
30. HAENEL H and BENDIG J (1975) 'Intestinal flora in health and disease', *Progr Food Nutr Sci*, 1, 21–64.
31. MITSUOKA T (1982), 'Recent trends in research on intestinal flora', *Bifidobacteria Microflora*, 1, 3–24.
32. SALMINEN S, OUWEHANDA A C and ISOLAURI E (1998), 'Clinical applications of probiotic bacteria', *Int Dairy J*, 8, 563–572
33. BERG R D (1996), 'The indigenous gastrointestinal microflora', *Trends Microbiol*, 4, 430–435. BJÖRNEHOLM S and FONDÉN R (2002), 'Lactobacillus F19 – closing the broken circle' *Microb Ecol Health Dis*, Suppl (3), 3.
34. SALMINEN, S, ISOLAURI, E and ONNELA T (1995), 'Gut microflora in health and disease', *Chemotherapy*, 41, 5–15.
35. SCHAAFSMA G (1995), 'Application of lactic acid bacteria in novel foods from a nutritional perspective', in G Novel and J-F Le Querler, *Lactic Acid Bacteria: Actes du Colloque LACTIC 94*. Caen, Presses Universitaires de Caen, p. 85–93.
36. AUSTIN D J, KRISTINSSON K G and ANDERSON R M (1999), 'The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance', *PNAS*, 96, 1152–1156.
37. ROBERFROID M B (1998), 'Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties', *Br J Nutr*, 80, S197–S202
38. FULLER, R (1989), 'Probiotics in man and animals', *J Appl Bacteriol*, 66, 365–378. GARDINER G, ROSS R P, COLLINS J K, FITZGERALD G and

- STANTON C (1998), 'Development of a probiotic cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains', *Appl Environ Microbiol*, 64(6), 2192–2199.
39. BENGMARK S (1998), 'Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic bacteria', *Gut*, 42, 2–7.
40. FUKUSHIMA Y, KAWATA Y, HARA H, TERADA A and MITSUOKA T (1998), 'Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children', *Int J Food Microbiol*, 42, 39–44.
41. JOHANSSON M-L, NOBAEK S, BERGGREN A, NYMAN M, BJÖRCK I, AHRNE S, JEPPSSON B and MOLIN G (1998), 'Survival of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (299v), and effect on the short-chain fatty acid content of faeces after ingestion of a rose-hip drink with fermented oats', *Int J Food Microbiol*, 42, 29–38.
42. DONNET-HUGHES A, ROCHAT F, SERRANT P, AESCHLIMANN J M and SCHIFFRIN J E (1999), 'Modulation of nonspecific mechanisms of defence by lactic acid bacteria: effective dose', *J Dairy Sci*, 82, 863–869.
43. ALANDER M, SATOKARI R, KORPELA R, SAXELIN M, VILPPONEN-SALMELA T, MATTILASANDHOLM T and VON WRIGHT A (1999), 'Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption', *Appl Environ Microbiol*, 65, 351–354.
44. ALANDER M, MÄTTÖ J, KNEIFEL W, JOHANSSON M, KÖGLER B, CRITTENDEN R, MATTILASANDHOLM T and SAARELA M (2001), 'Effect of galacto-oligosaccharide supplementation on human faecal microflora and on survival and persistence of *Bifidobacterium lactis* Bb12 in the gastrointestinal tract', *Int Dairy J*, 11, 817–825.
45. WALTER J, HERTEL C, TANNOCK G W, LIS C M, MUNRO K and HAMMES W P (2001), 'Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis', *Appl Environ Microbiol*, 67, 2578–2585.
46. MCFARLAND L V (2000), 'A review of the evidence of health claims for biotherapeutic agents', *Microbial Ecol Health Dis*, 12(1), 65–76.
47. ALVAREZ-OLMOS M I and OBERHELMAN R A (2001), 'Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy', *Clin Infect Dis*, 32, 1567–1576.
48. KOPP-HOOLIHAN L (2001), 'Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review', *J Am Diet Assoc*, 101, 229–238.

49. SAARELA M, MOGENSEN G, FONDEN R, MÄTTÖ J and MATTILA-SANDHOLM T (2000), 'Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties', *J Biotechnol*, 84(3), 197–215.
50. HAMILTON-MILLER J M T and SHAH S (2001), 'Deficiencies in microbiological quality and labelling of probiotic supplements', *Int J Food Microbiol*, 72, 175–176.
51. TEMMERMAN R, HUYS G, POT B and SWINGS J (2002), 'Quality analysis and label correctness of commercial probiotic products', *Innov Food Technol*, 14, 72–73.
52. ROBERFROID M B (1998), 'Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties', *Br J Nutr*, 80, S197–S202.
53. (R. Di Cagno, M. Gobbetti, in *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Second Edition), 2011,),(V. Crow, B. Curry, in *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2002)
54. Alessandria, V., Ferrocino, I., de Filippis, F., Fontana, M., Rantsiou, K., Ercolini, D., & Cocolin, L. (2016). Microbiota of an Italian Grana-like cheese during manufacture and ripening, unraveled by 16S rRNA-based approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(13), 3988–3995.
55. Richard J. Martin MBBS, FRACP, Fanaroff and Martin's Neonatal-Perinatal Medicine, 2020
56. Matthias Dreier, Marco Meola, Hélène Berthoud, Noam Shani, Daniel Wechsler and Pilar Junier, High-throughput qPCR and 16S rRNA gene amplicon sequencing as complementary methods for the investigation of the cheese microbiota, 2022 R.A.
57. LaRossa, in *Brenner's Encyclopedia of Genetics* Second Edition, 2013
58. Harris TD, Buzby PR, Babcock H, Beer E, Bowers J, Braslavsky I, Causey M, Colonell J, Dimeo J, Efcavitch JW, et al. Single-molecule DNA sequencing of a viral genome. *Science*. 2008;320:106–109.
59. Tremblay, J., Singh, K., Fern, A., Kirton, E. S., He, S., Woyke, T., Lee, J., Chen, F., Dangl, J. L., & Tringe, S. G. (2015). Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 6(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00771>
60. Lusk, T. S., Ottesen, A. R., White, J. R., Allard, M. W., Brown, E. W., & Kase, J. A. (2012). Characterization of microflora in Latin-style cheeses by next-generation sequencing technology. *BMC Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-254>

61. Hayes, J. L., Tzika, A., Thygesen, H., Berri, S., Wood, H. M., Hewitt, S., Pendlebury, M., Coates, A., Willoughby, L., Watson, C. M., Rabbitts, P., Roberts, P., & Taylor, G. R. (2013). Diagnosis of copy number variation by Illumina next generation sequencing is comparable in performance to oligonucleotide array comparative genomic hybridisation. In *Genomics* (Vol. 102, Issue 3, pp. 174–181). <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2013.04.006>
62. Haeng Nam, J., Sun Cho, Y., Rackerby, B., Goddik, L., & Hong Park, S. (n.d.). *Shifts of microbiota during cheese production: impact on production and quality*. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11201-5/Published>
63. High-throughput qPCR and 16S rRNA gene amplicon sequencing as complementary methods for the Dreier, M., Meola, M., Berthoud, H., Shani, N., Wechsler, D., & Junier, P. (2022). investigation of the cheese microbiota. *BMC Microbiology*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02451-y>
64. Kim, K. M., Park, J. H., Bhattacharya, D., & Yoon, H. S. (2014). Applications of next-generation sequencing to unravelling the evolutionary history of algae. In *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (Vol. 64, Issue PART 2, pp. 333–345). <https://doi.org/10.1099/ijs.0.054221-0>
65. Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1).
66. Jagadeesan, B., Gerner-Smidt, P., Allard, M. W., Leuillet, S., Winkler, A., Xiao, Y., Chaffron, S., van der Vossen, J., Tang, S., Katase, M., McClure, P., Kimura, B., Ching Chai, L., Chapman, J., & Grant, K. (2019). The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice. In *Food Microbiology*
67. Hantsis-Zacharov, E.; Halpern, M. Culturable Psychrotrophic Bacterial Communities in Raw Milk and Their Proteolytic and Lipolytic Traits. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73, 7162–7168.

Ελληνική Βιβλιογραφία:

1. Papadakis, P., Konteles, S., Batrinou, A., Ouzounis, S., Tsironi, T., Halvatsiotis, P., Tsakali, E., van Impe, J. F. M., Vougiouklaki, D., Strati, I. F., & Houhoula, D. (2021). Characterization of bacterial microbiota of P.D.O. feta cheese by 16s metagenomic analysis. *Microorganisms*, 9(11).
2. Kamilari, E.; Anagnostopoulos, D.A.; Papademas, P.; Efthymiou, M.; Tretiak, S.; Tsaltas, D. Snapshot of Cyprus Raw Goat Milk Bacterial Diversity via 16S rDNA High-Throughput Sequencing; Impact of Cold Storage Conditions. *Fermentation* 2020, 6, 100.
3. Τυροκομία, Ανυφαντάκης Ε. 2004
4. Μάντης Α., Παπαγεωργίου Δ., Φλετούρης Δ., Αγγελίδης Α. (2015) Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του, 401-405, 464 Εκδόσεις Κυριακύδη, Θεσσαλονίκη

Ιστοσελίδες:

1. <http://www.illumina.com>
2. <http://www.454.com>
3. <http://www.helicosbio.com>
4. <http://www.lifetechnologies.com>
5. <http://www.lcsciences.com>