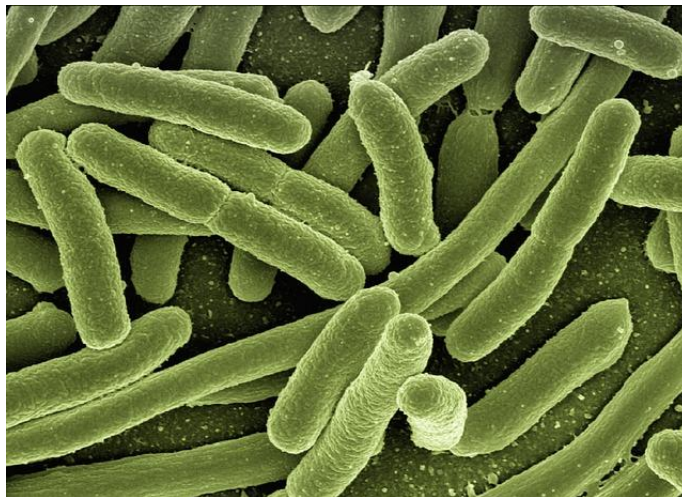


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**  
**Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων**

**"Τα σπορογόνα βακτήρια στα τρόφιμα: πρόσφατα  
δεδομένα"**



**Φοιτητές: Μηζύθρας Γρηγόριος 15054**  
**Κωστανίκος Κώστας 15048**

**Αθήνα 8/7/2021**

**Εγκρίθηκε από τριμελή εξεταστική επιτροπή**

Αθήνα, 2021

**ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ**

1. Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Ανθιμία Μπατρίνου Βιολόγος MSc, PhD, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

2. Μέλος επιτροπής: Βασίλης Σπηλιώτης Βιολόγος MSc, PhD, Καθηγητής Μικροβιολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

3. Μέλος επιτροπής: Σπυρίδων Κοντελής Γεωπόνος, PhD, Ακαδημαϊκός Υπότροφος, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

## **ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ ΜΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ**

Δηλώνω υπεύθυνα και γνωρίζοντας τις κυρώσεις του νόμου περί Πνευματικής Ιδιοκτησίας, ότι είμαι η/ο αποκλειστική-ός συγγραφέας 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. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, σε περίπτωση που αποδειχθεί διαχρονικά ότι η εργασία αυτή αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Μηζύθρας Γρηγόριος

Κωστανίκος Κώστας

# ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Οφείλουμε να εκφράσουμε τις ευχαριστίες μας σε ορισμένους ανθρώπους που μας στήριξαν στην προσπάθεια αυτή. Αρχικά θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τους γονείς μας για τη στήριξη τους, την υπομονή τους αλλά και την αδιάκοπη αγάπη τους. Επίσης, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά τους καθηγητές μας για την αποδοχή και την έγκριση του θέματος της εργασίας καθώς και για τη γενικότερη βοήθεια, τις πολύτιμες υποδείξεις και την καθοδήγηση κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ταξινόμηση των αλλοιωγόνων σπορογόνων βακτηρίων είναι απαραίτητο να μελετάτε και να εμπλουτίζεται με νέα δεδομένα που προκύπτουν από εξελιγμένες μεθόδους ταυτοποιήσεις και απαρίθμησης των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σε διάφορους τύπους τροφίμων. Η ιδιότητα των σπόρων να βλαστάνουν και να αναπτύσσονται επηρεάζει το σταθερό ή μη σταθερό μικροβιακό φορτίο στα θερμικός επεξεργασμένα τρόφιμα. Στην περίπτωση που το τρόφιμο είναι αρκετά μολυσμένο τότε παρατηρούνται μεταβολές στην υφή και την οσμή του, αύξηση ή μείωση του pH καθώς και παραγωγή αερίου. Οι μεταβολές αυτές ποικίλουν ανάλογα με το είδος της πρώτης ύλης (φυτό ή ζώο). Στην συνέχεια θα γίνει αναφορά για κάθε είδος τροφίμου (Γαλακτοκομικά, αρτοσκευάσματα, λαχανικά, κρεατοσκευάσματα καθώς και κονσερβοποιημένα) και στην αντίστοιχη μικροχλωρίδα μικροοργανισμών που προσβάλλει κάθε τροφικό ξεχωριστά. Παράλληλα θα αναλυθεί η δομή και τα βασικά χαρακτηριστικά των σημαντικότερων σπορογόνων μικροοργανισμών όπως οι *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *sporolactobacillus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium spp.* καθώς και η διαδικασία κατά την οποία σχηματίζουν σπόρια στην επιφάνεια των τροφίμων και πως αυτή επηρεάζεται από τους εξωγενής παράγοντες. Τέλος θα γίνει αναφορά στις παλαιότερες αλλά και τις πλέον σύγχρονες μεθόδους ταυτοποιήσεις μικροοργανισμών που έχουν εξελιχθεί, όπως οι μοριακές τεχνικές, η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR / Polymerase Chain Reaction) και η μέθοδος ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης (ELISA / Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

# ABSTRACT

It is necessary that altered sporogenic bacteria is studied and enhanced with new updated research data, resulting from advanced identification and methods of reorganization of microorganisms which develop in various types of food. Germ seeds have the capacity to germinate and develop, having an impact on the steady or non steady microbistic load of heat treated foods. We observe that when food is highly infected, there are changes in its texture and smell, a rise or fall in its pH, as well as changes in the production of gas. These changes vary depending on the type of raw material (plant or animal). Below will follow a reference to: a) each type of food (dairy, pastries, vegetables, meat products as well as canned food) b) the relevant microorganism's microflora which infects each type of food separately. At the same time, a discussion will follow on the structure and basic features of *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium* spp., as well as the process by which the formation of spores on food surfaces is created and how this is influenced by external factors. Finally, a reference will be made to older but as well as to contemporary methods of identification of microorganisms which have been developed, such as the molecular techniques, the method of chain reaction, polymerase (PCR / Polymerase Chain Reaction), and the method of enzyme immunoabsorption (ELISA / Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

## Περιεχόμενα

<b>1. Εισαγωγή</b> .....	10
<b>Σπορογόνα βακτήρια: χαρακτηριστικά σπορογόνων μικροοργανισμών.</b> .....	10
<b>1.1 BACILLUS</b> .....	10
<b>1.1.1 Βιομηχανικά χαρακτηριστικά: δημιουργία νέων ποικιλιών.</b> .....	11
<b>1.1.2 Ενζυμικές Δράσεις.</b> .....	12
<b>1.1.3 Χημικές Ιδιότητες.</b> .....	13
<b>1.1.4 Χρήσεις στη γεωργία.</b> .....	14
<b>1.1.5 Φαρμακευτικές ιδιότητες.</b> .....	15
<b>1.2 CLOSTRIDIUM</b> .....	17
<b>1.2.1 Βιολογία</b> .....	19
<b>1.2.2 Παθολογία</b> .....	19
<b>1.2.3 Τύποι νευροτοξίνων</b> .....	19
<b>1.3 CLOSTRIDIUM DIFFICILE</b> .....	20
<b>1.3.1 Μικροβιολογία.</b> .....	20
<b>1.3.2 Παράγοντας μολυσματικότητας</b> .....	21
<b>1.3.3 Πρόληψη</b> .....	21
<b>1.4 CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</b> .....	22
<b>1.4.1 Τροφική δηλητηρίαση</b> .....	22
<b>1.4.2 Μόλυνση</b> .....	23
<b>1.4.3 Χαρακτηριστικά αποικιών.</b> .....	23
<b>1.5 CLOSTRIDIUM TETANI</b> .....	24
<b>1.5.1 Χαρακτηριστικά</b> .....	24
<b>1.5.2 Τοξικότητα</b> .....	24
<b>1.5.3 Δράση τοξινών</b> .....	25
<b>1.6 DESULFOTOMACULUM</b> .....	26
<b>1.6.1 ΣΠΟΡΙΩΣΗ</b> .....	26
<b>1.6.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ</b> .....	27

1.7	SPOROLACTOBACILLUS .....	29
1.8	SPOROSARCINA .....	31
2.	Μικροχλωρίδα μικροοργανισμών που ευδοκιμεί σε διάφορους τύπους τροφίμων: .....	32
2.1	Αναερόβια βακτήρια σε κατεψυγμένα κρέατα συσκευασμένα υπό κενό .....	32
2.2	Χλωρίδα που σχηματίζει σπόρια σε γαλακτοκομικά προϊόντα .....	34
2.2.1	Φρέσκο γάλα: βασική πηγή μικροοργανισμών .....	34
2.2.2	Παστεριωμένο γάλα: ψυγμένο γάλα.....	35
2.2.3	Αποστειρωμένο γάλα : μικροβιακή σταθερότητα σε συνθήκες περιβάλλοντος.....	36
2.2.4	Αφυδατωμένο γάλα: γάλα σε σκόνη .....	37
2.2.5	Γάλα που έχει υποστεί ζύμωση: τυριά .....	37
2.3	Κονσερβοποιημένα τρόφιμα: οι πιο ανθεκτικοί μικροοργανισμοί στη θερμότητα.....	38
2.3.1	Όξινα κονσερβοποιημένα τρόφιμα.....	38
2.3.2	Μετρίως όξινα κονσερβοποιημένα τρόφιμα .....	39
2.3.3	Κονσερβοποιημένα τρόφιμα χαμηλής οξύτητας .....	40
3.	Αρχιτεκτονική και μορφολογία των Clostridium sporogenes – στρατηγική σχηματισμού σπορίων σπορογόνων βακτηρίων.....	41
3.1	Σχηματισμός εξωσπορίου του C. sporogenes και άλλων Κλωστρίδιων .....	44
3.2	Αποκάλυψη της εσωτερικής και εξωτερικής όψης του εξωσπορίου με μικροσκόπιο ατομικής δύναμης (AFM).....	48
3.3	Τρισδιάστατη δομή της αυτοσυναρμολογημένης και ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης CsxA αντίστοιχη αυτής που υπάρχει στην φυσική συστοιχία του εξωσπορίου. ....	51
3.4	Ηλεκτρονική κρυσκοπία (CryoEM) ανασυνδυασμένων κρυστάλλων CsxA (εμφάνιση δακτύλιου έξι υποομάδων πρωτεΐνης σε ανάλυση 9 – Å).....	52
3.5	Το AFM των κρυστάλλων CsxA αποκαλύπτει μια αναστρέψιμη αλλαγή διαμόρφωσης κατά την ενυδάτωση. ....	54
4.	Μηχανισμός σπορίωσης .....	56
4.1	Πρόκληση σπορίωσης.....	56
4.2	Πυκνότητα κυττάρων .....	59
4.3	Η εμφάνιση σπορίωσης στα βιοφίλμ .....	59
4.4	Εξωγενής παράγοντες που προκαλούν την έναρξη του φαινομένου σπορίωσης. Επιδράσεις περιβαλλοντικών παραγόντων. ....	61
4.4.1	Θερμοκρασία.....	62
4.4.2	pH .....	63
4.4.3	Ενεργότητα ύδατος .....	63
4.4.4	Αερισμός.....	64



4.4.5	Ορυκτά.....	65
4.4.6	Παρουσία άλλης μικροχλωρίδας.....	65
4.4.7	Φως και διάτμηση.....	66
4.5	Συνδυασμένες επιπτώσεις περιβαλλοντικών παραγόντων σε ολόκληρη την τροφική αλυσίδα ...	66
4.5.1	Υποστρώματα ζώων .....	66
4.5.2	Διατροφή των ζώων .....	67
5.	Σύγχρονες μέθοδοι ανίχνευσης και χαρακτηρισμού μικροοργανισμών.....	67
5.1	Ανοσοβιολογικές μέθοδοι.....	68
5.1.1	Παλαιότερες μέθοδοι.....	68
5.1.2	Νεότερες μέθοδοι.....	69
5.2	ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ.....	72
5.2.1	ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	72
5.2.2	ΑΝΟΣΟΜΑΓΝΗΤΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ.....	74
5.2.3	Ηλεκτροφόρηση .....	79
5.2.4	Υβριδισμός .....	84
5.3	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	86
5.3.1	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΤΡ.....	86
5.3.2	ΒΙΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ .....	87
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ .....	88
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	90

## 1. Εισαγωγή

Σπορογόνα βακτήρια: χαρακτηριστικά σπορογόνων μικροοργανισμών.

### 1.1 BACILLUS

Το γένος *Bacillus* είναι ένα σπορογόνο βακτήριο με μοναδικές ιδιότητες στη διαφοροποίηση των κυττάρων, το οποίο επιτρέπει τον σχηματισμό σπόρων υπό συνθήκες πίεσης και ενεργοποιείται στο φυτικό κύτταρο, με τα κατάλληλα περιβάλλοντα που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής να συμβάλλουν στην πρόκληση αυτής της διαδικασίας. Ο βίότοπός του είναι κυρίως στο έδαφος, πράγμα που σημαίνει ότι πολλά είδη *Bacillus* συνδέονται με φυτά καθώς και με βακτήρια ριζόσφαιρας και ενδοφυτικά βακτήρια. Η μεταγωγή σήματος είναι ο κύριος μηχανισμός αλληλεπιδράσεων, τόσο εντός της κυτταρικής κοινότητας όσο και με το εξωτερικό περιβάλλον, το οποίο παρέχει τις επόμενες λειτουργίες ή ιδιότητες για το κύτταρο. Οι αντιμικροβιακές ενώσεις του *Bacillus* είναι δυνητικά χρήσιμα προϊόντα, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί στη γεωργία για την αναστολή των φυτοπαθογόνων, για την τόνωση της ανάπτυξης των φυτών, και στη βιομηχανία τροφίμων ως προβιοτικά (Mongkolthanaruk, 2012).

Το γένος *Bacillus* αντιπροσωπεύει ένα πολύ μεγάλο σύνολο βακτηρίων που έχουν ένα κοινό αλλά ξεχωριστό χαρακτηριστικό: την ικανότητα να δημιουργούν αδρανή ενδοσπόρια αερόβια όταν αντιμετωπίζουν δυσμενείς συνθήκες ανάπτυξης (Zeigler & Perkins, 2009).

Παλιότερα, τα διάφορα είδη *Bacillus* χωρίζονταν σε ομάδες με βάση τον φαινότυπο των σποραγγειών (π.χ. διογκωμένα ή μη διογκωμένα), τα ώριμα σπόρια (π.χ. σφαιρικά, κυλινδρικά ή ελλειψοειδή), τις βιοχημικές δοκιμές (π.χ. καταλάση, υδρόλυση αμύλου) και τις ιδιότητες ανάπτυξης (π.χ. 7% NaCl), με τα είδη εντός αυτών των ομάδων να είναι εξαιρετικά ετερογενή (Gordon, 1989). Από τότε, ωστόσο, υπήρξαν πολλές σημαντικές ανακατατάξεις των ειδών του *Bacillus*, οι οποίες προκλήθηκαν σε μεγάλο βαθμό από την εισαγωγή πιο εξελιγμένων μεθόδων δοκιμών που βασίζονται στη σύγκριση σε επίπεδο γονιδιώματος και στη συνεχή εισροή νέων ειδών που έχουν απομονωθεί από ακραία περιβάλλοντα. Το γένος μικροοργανισμών *Bacillus*

αντιπροσωπεύει τώρα μόνο ένα μικρό μέρος μιας μεγαλύτερης ταξινομικής ομάδας βακτηρίων που παράγουν ενδοσπόρια και αναφέρονται ως *Bacillus sensu lato* (Zeigler & Perkins, 2009).

### 1.1.1 Βιομηχανικά χαρακτηριστικά: δημιουργία νέων ποικιλιών.

Το είδος *Bacillus* έχει διαδραματίσει καθοριστικό ρόλο στη δημιουργία ενός ευρέος φάσματος βιώσιμων διαδικασιών βιομηχανικής ζύμωσης, οι οποίες σε ορισμένες περιπτώσεις (π.χ. ριβοφλαβίνη) έχουν αντικαταστήσει παλαιότερες, λιγότερο αποτελεσματικές χημικές διεργασίες. Τα εμπορικά προϊόντα που παράγονται από τα είδη του *Bacillus* κυμαίνονται από ειδικά χημικά και αντιβιοτικά έως βιταμίνες και ένζυμα τροφίμων (Schallmey, et al., 2004).

Σε μεγάλο βαθμό, πολλές από αυτές τις διαδικασίες καθιερώθηκαν ή βελτιώθηκαν χρησιμοποιώντας ένα συνδυασμό κλασικών γενετικών μεθόδων και πιο σύγχρονης τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA. Η εφαρμογή αυτών των τελευταίων τεχνικών διευκολύνθηκε από την εξαιρετική φυσική ικανότητα και τους μηχανισμούς ανασυνδυασμού DNA που επιδεικνύουν πολλά από αυτά τα είδη (Dubnau, 1991; Hamoen, et al., 2003). Ωστόσο, η πιο εκτεταμένη σειρά γενετικών εργαλείων έχει αναπτυχθεί για το *Bacillus subtilis* και περιλαμβάνει πολλούς φορείς κλωνοποίησης πλασμιδίου (Bruckner, 1992; Choi, et al., 2002), συστήματα μεταλλαξιγένεσης μεταθετών στοιχείων (Le Breton, et al., 2006; Steinmetz & Richter, 1994), επιλογή δεικτών ανοχής στα αντιβιοτικά για μετασηματισμένα κύτταρα (Dale, et al., 1995; Perkins & Youngman, 1983), συστατικοί και ρυθμιζόμενοι υποκινητές (Goldstein & Doi, 1995; Lee & Pero, 1981) και κασέτες έκφρασης γονιδίων μονής και πολλαπλής αντιγραφής, συμπεριλαμβανομένων εκείνων με συνδυασμούς αλληλουχίας υποκινητή και σήματος για την έκκριση πρωτεϊνών και ενζύμων υψηλής αξίας. Η εισαγωγή γενετικού υλικού στο κύτταρο μπορεί να συμβεί μέσω της φυσικής προσαρμοστικής αντίδρασης των βακτηρίων, της σύντηξης πρωτοπλαστών, καθώς και διάφορες μεθόδους μετασηματισμού ηλεκτροδιάτρησης, και σε ορισμένες περιπτώσεις μέσω σύζευξης (Aquino de Muro & Priest, 2000; Jensen, et al., 1996). Αν και τα περισσότερα από αυτά τα εργαλεία αναπτύχθηκαν για πρώτη φορά στο *Bacillus subtilis*, πολλά έχουν προσαρμοστεί για χρήση σε διάφορα άλλα είδη *Bacillus*, γεγονός το οποίο διευκολύνει την ταχεία ανάπτυξη νέων διαδικασιών. Επιπλέον, η χρησιμότητα αυτών των εργαλείων έχει ενισχυθεί από τη

διαθεσιμότητα της πλήρους αλληλουχίας γονιδιωμάτων του *Bacillus subtilis* και των συναφών ειδών. Έτσι, με πολλούς τρόπους, η ανάπτυξη και η ευκολία χρήσης των σύγχρονων ανασυνδυασμένων γενετικών εργαλείων στο *Bacillus* ανταγωνίζεται την αντίστοιχη άλλων γνωστών ξενιστών παραγωγής, όπως οι *Escherichia coli* και *Saccharomyces cerevisiae* (Zeigler & Perkins, 2009).

### 1.1.2 Ενζυμικές Δράσεις.

Το μεγαλύτερο ποσοστό ενζύμων που παράγεται από είδη *Bacillus* έχουν μοναδικές ιδιότητες, όπως είναι η αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες (θερμοσταθερότητα), οι αλκαλικές συνθήκες, η ευρεία κλίμακα pH και τα ανασταλτικά επίπεδα υποπροϊόντων, τα οποία τα καθιστούν την ιδανική επιλογή για πολλές βιομηχανικές διαδικασίες και οικιακές λειτουργίες (Meima, et al., 2004). Επιπλέον, με τη διαθεσιμότητα κλασικών και ανασυνδυασμένων μεθόδων, έχουν αναπτυχθεί νέες παραλλαγές πρωτεϊνών με νέες ή βελτιωμένες καταλυτικές ιδιότητες προκειμένου να επεκταθεί η χρήση τους σε νέες εμπορικές εφαρμογές (Nielsen & Borchert, 2000; Olempska-Beer, et al., 2006). Λόγω της τάσης τους να εκκρίνουν πρωτεΐνες στο εξωκυτταρικό μέσο, τα είδη του *Bacillus* είναι επίσης καλοί ξενιστές για την παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών (Zeigler & Perkins, 2009)

Έχουν αναφερθεί πολλές γονιδιακές κασέτες έκφρασης πλασμιδίου που συνδυάζουν σήματα ελέγχου μεταγραφής και μετάφρασης με αλληλουχίες σήματος έκκρισης που επιτρέπουν τη μεταφορά των υποψήφιων πρωτεϊνών στο μέσο καλλιέργειας για επακόλουθη απομόνωση. Επιπροσθέτως, έχει κατασκευαστεί ποικιλία μεταλλαγμάτων με ανεπάρκεια πρωτεάσης για την πρόληψη της αποδόμησης της ετερόλογης πρωτεΐνης, καθώς επίσης και στελέχη με έως και οκτώ κύριες και δευτερεύουσες διαγραφές γονιδίων που κωδικοποιούν την πρωτεάση (Pero & Sloma, 1993; Wu, et al., 2002).

### 1.1.3 Χημικές Ιδιότητες.

Ένας άλλος εμπορικός τομέας στον οποίο πολλά είδη *Bacillus* παίζουν σημαντικό ρόλο ως ξενιστές ζύμωσης είναι η παραγωγή βιταμινών και εκλεκτών χημικών. Οι εμπορικές διεργασίες περιλαμβάνουν εκείνες για νουκλεοζίτες πουρίνης, ριβοφλαβίνη, πολυ-γ-γλουταμικό οξύ (Ashiuchi, et al., 2006), D-ριβόζη και μια σειρά από δευτερεύοντα προϊόντα όπως η θαυματίνη, ένα υποκατάστατο ζάχαρης χαμηλών θερμίδων, τον πολυυδροξυβουτυρικό εστέρα (αγγλ.: *PHB / polyhydroxybutyrate*), τη στρεπταβιδίνη και την 2-ακετυλο-1-πυρρολίνη. Όλοι εκτός από το PHB (από το *Bacillus cereus*) χρησιμοποιούν το *Bacillus subtilis* ως ξενιστή παραγωγής, ενώ οι διαδικασίες για άλλες βιταμίνες, όπως η βιοτίνη, το παντοθενικό οξύ, η θειαμίνη και το φολικό οξύ, έχουν αναφερθεί, αλλά καμία δεν έχει βγει στο εμπόριο (Perkins, et al., 2008).

Τα προϊόντα που παράγονται από τα είδη *Bacillus* έχουν μακρά ιστορία ασφαλούς χρήσης και ως εκ τούτου έχουν αποκτήσει το καθεστώς **GRAS** (*Generally Regarded As Safe* / ελλ.: *Γενικά Αναγνωρισμένο Ως Ασφαλές*) στις ΗΠΑ. Ένα καθεστώς παρόμοιο με το GRAS, που ονομάζεται QPS (*Qualified Presumption of Safety* / ελλ.: *Τεκμήριο Αναγνωρισμένης Ασφάλειας*), προτάθηκε πρόσφατα από τις ρυθμιστικές αρχές της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Barlow, et al., 2005).

Ένα σημαντικό κριτήριο για τον προσδιορισμό της κατάστασης GRAS είναι η έλλειψη παθογένειας του μικροοργανισμού παραγωγής. Από αυτή την άποψη, αυτά τα είδη *Bacillus* βρέθηκαν να μην είναι επιβλαβή για τον άνθρωπο ή τα ζώα. Ένα άλλο κανονιστικό ζήτημα που επηρεάζει τη χρήση βιομηχανικών διεργασιών *Bacillus* που χρησιμοποιούν στελέχη που προέρχονται από γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα είναι ο φυσικός περιορισμός των τροποποιημένων βακτηρίων. Επειδή τα σπόρια μπορούν να παραμείνουν στο περιβάλλον για χρόνια λόγω της μοναδικής τους αντοχής στη θερμότητα, τις χημικές ουσίες και την υπεριώδη ακτινοβολία, τα εμπορικά στελέχη πρέπει να περιέχουν μία ή περισσότερες μεταλλάξεις που αναστέλλουν αυτό το τελικό αναπτυξιακό στάδιο. Κατά συνέπεια, τα περισσότερα εμπορικά

στελέχη παραγωγής περιέχουν μια μετάλλαξη που εμποδίζει το σχηματισμό ενός ώριμου, ανθεκτικού σπόρου (Perkins & Pragai, 2004; Perkins, et al., 1999).

#### 1.1.4 Χρήσεις στη γεωργία.

Ο μικροοργανισμός *Bacillus* είναι επίσης ένα σημαντικό εμπορικό προϊόν στη γεωργική επιχείρηση, ενώ οι ποικιλίες *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus popilliae* και *Bacillus lentimorbus* έχουν από καιρό αναγνωρισθεί ως σημαντικές πηγές φυσικών βιοεντομοκτόνων (El Bendary, 2006; Schallmey, et al., 2004). Με μεγάλη διαφορά η μεγαλύτερη και ευρύτερα χρησιμοποιούμενη ποικιλία είναι το *Bacillus thuringiensis*, το οποίο παράγει το ζιζανιοκτόνο δ-ενδοτοξίνη (ή πρωτεΐνη CRY) κατά τη διαδικασία της σπορίωσης. Το είδος αυτό είναι εξοπλισμένο με ένα ισχυρό οπλοστάσιο εξαιρετικά ειδικών φυτοφαρμάκων που ποικίλλουν ευρέως στην ειδικότητα στόχου από στέλεχος σε στέλεχος. Οι πρωτεΐνες CRY ταξινομούνται σύμφωνα με την αλληλουχία αμινοξέων τους, αλλά οι ταξινομήσεις συχνά αντιστοιχούν στη σειρά εντόμων έναντι της οποίας είναι αποτελεσματική η τοξίνη. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες CRY1 του *Bacillus thuringiensis kurstaki* είναι τοξικές κυρίως για είδη λεπιδόπτερων, οι πρωτεΐνες CRY3 του *Bacillus thuringiensis tenebrionis* είναι τοξικές για ορισμένα κολεόπτερα και οι πρωτεΐνες CRY4 του *Bacillus thuringiensis israelensis* είναι τοξικές για τα κουνούπια και τις μαύρες μύγες (Schnepf, et al., 1998). Τελικά, τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτές τις πολύ διαφορετικές τοξίνες συναντώνται σε μια ποικιλία γεωργικών φυτών, όπως το καλαμπόκι, ο καπνός και το φασόλι σόγιας, γεγονός το οποίο επεκτείνει περαιτέρω τη χρησιμότητα αυτών των ειδών *Bacillus* στη γεωργία (Christou, et al., 2006; Mehlo, et al., 2005).

Η χρήση του *Bacillus* ως προωθητή της ανάπτυξης των φυτών είναι ένας ανερχόμενος τομέας γεωργικής σημασίας. Η εφαρμογή του *Bacillus subtilis* σε σπόρους φυτών έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει σημαντικά την επιβίωση και την ανθεκτικότητα των δενδρυλλίων (Cavaglieri, et al., 2005; Ugoji, et al., 2005). Επιπλέον, είδη *Bacillus* όπως το *Bacillus polymyxa*, το *Bacillus cereus* και το *Bacillus subtilis*, χρησιμοποιούνται και για τη διευκόλυνση της δημιουργίας και της αντοχής του αθλητικού χλοοτάπητα. Οι μηχανισμοί με τους οποίους ο *Bacillus* προάγει την

ανάπτυξη των φυτών δεν έχουν ακόμη τεκμηριωθεί, αλλά φαίνεται ότι η παραγωγή φυτικών ορμονών, αντιμικροβιακών παραγόντων και ενζύμων, όπως η φυτάση (Tye, et al., 2002), που αυξάνουν τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών στο γρασίδι, διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο (Gange & Hagley, 2004).

#### 1.1.5 Φαρμακευτικές ιδιότητες.

Η σημασία του *Bacillus* στον τομέα της ιατρικής επιβεβαιώθηκε για πρώτη φορά στην πρώιμη ιστορία της μικροβιολογίας με τον προσδιορισμό του *Bacillus anthracis* από τον **Louis Pasteur** και τον **Robert Koch** ως τον αιτιολογικό παράγοντα του άνθρακα στα τέλη του 1800. Ωστόσο, το γένος στο σύνολό του θεωρείται σχετικά καλοήθες όσον αφορά την ασθένεια του ανθρώπου και των ζώων σε σύγκριση με άλλα Gram-θετικά γένη, όπως ο σταφυλόκοκκος και ο στρεπτόκοκκος. Το *Bacillus cereus* και το σχετικό είδος *Bacillus weihenstephanensis* μπορεί να ευθύνονται για γαστρεντερικές ασθένειες που προκαλούνται από μολυσμένα τρόφιμα ή γαλακτοκομικά προϊόντα. Η παθογένεση απαιτεί ένα κοινό σύνολο γονιδίων εντεροτοξίνης (Phelps & McKillip, 2002). Επιπλέον, σε σπάνιες περιπτώσεις, μπορεί να υπάρχουν οι ιδανικές συνθήκες για το *Bacillus cereus* να γίνει ανθρώπινο παθογόνο σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς (Kotiranta, et al., 2000; Schoeni & Wong, 2005). Πρόσφατα, η ευαισθητοποίηση του κοινού για το *Bacillus* ενισχύθηκε από τη χρήση του *Bacillus anthracis* σε πράξεις και απειλές τρομοκρατίας μέσω βιολογικών όπλων (Zeigler & Perkins, 2009).

Παρά αυτήν την αυξημένη ευαισθητοποίηση για τον *Bacillus*, αυτό που δεν είναι τόσο γνωστό είναι τα πολυάριθμα ευεργετικά ιατρικά προϊόντα που παράγονται από αυτό το γένος. Μακράν η πιο κυρίαρχη κατηγορία προϊόντων είναι τα αντιβιοτικά. Τα περισσότερα από αυτά είναι αντιβιοτικά πεπτιδίων που συντίθενται είτε με μη ριβοσωμικές ενζυματικές διεργασίες είτε με ριβοσωμική σύνθεση γραμμικών πεπτιδίων που στη συνέχεια υφίστανται μετα-μεταφραστική τροποποίηση και πρωτεολυτική επεξεργασία (Stein, 2005). Μια άλλη σημαντική κατηγορία προϊόντων αποτελείται από ανθρώπινες πρωτεΐνες και εμβόλια, οι διαδικασίες παραγωγής των οποίων εκμεταλλεύονται τη φυσική ικανότητα του *Bacillus* να παράγει και να εκκρίνει ένζυμα

για βιομηχανικά και τρόφιμα ένζυμα. Σχεδόν όλες αυτές οι διαδικασίες έχουν αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* και *Brevibacillus brevis* (Ferreira, et al., 2005; Meima, et al., 2004). Το πλεονέκτημα του *Brevibacillus brevis* είναι ότι η παραγωγή εξωκυτταρικής πρωτεάσης είναι χαμηλή και η ετερόλογη πρωτεϊνική έκφραση είναι υψηλή. Εν ολίγοις, αν και ο αριθμός των εφαρμοζόμενων διεργασιών που χρησιμοποιούν βακίλους δεν είναι τόσο μεγάλος όσο και για άλλους, πιο γνωστούς ξενιστές παραγωγής μικροβιακών πρωτεϊνών όπως το *Escherichia coli* ή η ζύμη, υπάρχουν ωστόσο πολλά επιτυχημένα παραδείγματα, όπως η χρήση του *Bacillus megaterium* για την παραγωγή πρωτεϊνών AIDS για εμπορικά διαγνωστικά τεστ (Vary, 1994).

Οι ενώσεις που παράγονται από *Bacillus subtilis* και συναφή είδη κατηγοριοποιούνται ως GRAS, ωστόσο οι ίδιοι οι μικροοργανισμοί μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ιατρικά ως προβιοτικά. Δύο σημαντικές ανθρώπινες εφαρμογές είναι για προφυλακτική χρήση και για χρήση ως συμπληρώματα υγιεινής διατροφής. Βασικά είδη που βρέθηκαν σε αυτά τα παρασκευάσματα είναι τα *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus clausii*, μη παθογενή στελέχη *Bacillus cereus* και άλλα σπορογόνα από την ομάδα *Bacillus sensu lato*. Στην Ευρώπη, τα προβιοτικά του *Bacillus* χρησιμοποιούνται προστατευτικά έναντι των γαστρεντερικών παθήσεων, ενώ στη Νοτιοανατολική Ασία χρησιμοποιούνται ως συμπλήρωμα της θεραπείας με αντιβιοτικά (Hong, et al., 2005; Sanders, et al., 2003).

Το *Bacillus subtilis* χρησιμοποιείται επίσης για τον εντοπισμό και την επικύρωση νέων αντιβακτηριακών στόχων. Η ανάλυση γονιδιώματος *in silico* και οι λειτουργικές δοκιμές έχουν χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό βασικών οδών ως πιθανούς στόχους για νέους αντιμικροβιακούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων αμινοξέων και βιοσυνθετικών οδών βιταμινών, πρωτεασών (Gerdes, et al., 2002), καθώς και ρυθμιστικών στοιχείων όπως οι ριβοδιακόπτες (Blount & Breaker, 2007). Λόγω της ανεπτυγμένης γενετικής και της ανασυνδυασμένης μηχανικής του, το *Bacillus subtilis* έχει επίσης χρησιμοποιηθεί ως ξενιστής για τον εντοπισμό νέων αντιμικροβιακών παραγόντων (Bunyarai-boonsri, et al., 2003).



## 1.2 CLOSTRIDIUM

Το γένος *Clostridium* είναι μια ετερογενής ομάδα Gram-θετικών βακτηρίων που μπορούν να παράγουν ενδοσπόρια (Ryan & Ray, 2004; Bruggemann & Gottschalk, 2009), και σήμερα αποτελείται από 181 είδη και διανέμεται ευρέως στο περιβάλλον, καθώς και στον εντερικό σωλήνα ανθρώπων και πολλών ζώων (Wells & Wilkins, 1996). Αρκετά είδη *Clostridium* είναι παθογόνα για τον άνθρωπο, τα κατοικίδια ζώα ή την άγρια πανίδα και είναι υπεύθυνα για γνωστές κλωστηριδιακές παθήσεις όπως ο τέτανος, η γάγγραινα, η αλλαντίαση, η ψευδομεμβρανώδης κολίτιδα και οι τροφικές ασθένειες (Hatheway, 1990).

Υπάρχουν πέντε κύρια είδη που είναι υπεύθυνα για την ασθένεια στον άνθρωπο:

- Το *Clostridium botulinum* είναι ένας οργανισμός που παράγει τοξίνες αλλαντίασης σε τροφές και μπορεί να προκαλέσει αλλαντίαση (Wells & Wilkins, 1996). Το μέλι μερικές φορές περιέχει σπόρια *Clostridium botulinum*, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν βρεφική αλλαντίαση σε παιδιά μέχρι ενός έτους, παραλύοντας τους αναπνευστικούς μύες τους (Tanzi & Gabay, 2002). Οι ενήλικες και τα μεγαλύτερα παιδιά μπορούν να τρώνε το μέλι με ασφάλεια, επειδή το *Clostridium* δεν ανταγωνίζεται καλά με τα άλλα ταχέως αναπτυσσόμενα βακτήρια που υπάρχουν στο γαστρεντερικό σωλήνα. Αυτή η ίδια τοξίνη χρησιμοποιείται καλλυντικά για την παράλυση των μυών του προσώπου για τη μείωση των σημείων γήρανσης, και έχει επίσης πολλές θεραπευτικές χρήσεις.
- Το *Clostridium difficile*, ένα είδος το οποίο μπορεί να αναπτυχθεί όταν άλλα βακτήρια στο έντερο σκοτώνονται κατά τη διάρκεια της αντιβιοτικής θεραπείας, οδηγώντας σε ψευδομεμβρανώδη κολίτιδα (αιτία διάρροιας που σχετίζεται με αντιβιοτικά) (Wells & Wilkins, 1996).
- Το *Clostridium perfringens*, που παλαιότερα ονομαζόταν *Clostridium welchii*, προκαλεί ένα ευρύ φάσμα συμπτωμάτων, από τροφική δηλητηρίαση έως γάγγραινα αερίου. Επίσης υπεύθυνο για την εντεροτοξαιμία στα αιγοπρόβατα (Wells & Wilkins, 1996). Το

*Clostridium perfringens* μπορεί επίσης να αντικαταστήσει τη μαγιά στην παρασκευή ψωμιού.

- Το *Clostridium tetani* είναι ο οργανισμός που προκαλεί τον τέτανο (Wells & Wilkins, 1996). Το όνομά του προέρχεται από τη λέξη "tension" (ελλ.: ένταση), που αναφέρεται στην ένταση που προκαλείται από τον τέτανο στους μύες.
- Το *Clostridium sordellii* έχει συνδεθεί με τους θανάτους πολλών γυναικών μετά τον τοκετό, καθώς και με θανατηφόρες λοιμώξεις μετά από ιατρικές αμβλώσεις.

Επιπλέον, οι διάφορες ποικιλίες του *Clostridium* μπορεί να εμπλέκονται σε μια ποικιλία ανθρώπινων μολύνσεων, όπως η χολοκυστίτιδα, η πνευμονία, η βακτηριαιμία, και τα αποστήματα, και μπορεί έτσι να απομονωθεί από διάφορα κλινικά δείγματα. Ωστόσο, πολλά από τα προϊόντα απομόνωσης μπορεί να είναι περιστασιακά μολυσματικά, ή μη παθογόνα κλωστηρίδια, και μπορεί να μην εμπλέκονται στη διαδικασία της νόσου. Επομένως, η αξιόπιστη ταυτοποίηση του είδους είναι σημαντική, ενώ επίσης πρέπει να δημιουργηθεί σύνδεση μεταξύ των απομονωμένων κλωστηριδίων και των παθολογικών αλλαγών (Keto-Timonen, et al., 2006).

Επιπλέον, τα βιομηχανικά κλωστηρίδια παράγουν βιοκαύσιμα, τα οποία χρησιμεύουν ως εναλλακτικές πηγές ενέργειας λόγω των πολύ υψηλών παγκόσμιων τιμών των συμβατικών καυσίμων. Η γενετική μηχανική αναπτύσσει επί του παρόντος νέα στελέχη αντικαθιστώντας ή τροποποιώντας τη γονιδιακή διαμόρφωση των παθογόνων στελεχών για να τα μετατρέψει σε μη παθογόνα στελέχη για βιομηχανικές χρήσεις, ενώ τα θεραπευτικά κλωστηρίδια χρησιμεύουν ως φορέας για τη θεραπεία ασθενειών, ιδίως συμπαγών όγκων (Num & Useh, 2014).

Λόγω του παγκόσμιου προβλήματος της ανθεκτικότητας των *Clostridium* στα αντιβιοτικά, που είναι μια στρατηγική επιβίωσης των μικροβιακών παθογόνων, μερικά από τα γνωστά χημειοθεραπευτικά πρωτόκολλα έχουν αποτύχει και υπάρχει η ανάγκη να εξελιχθούν νέες προσεγγίσεις θεραπείας, χρησιμοποιώντας νέους παράγοντες που έχουν ανώτερους μηχανισμούς δράσης, σε σύγκριση με συμβατικά αντιβιοτικά που καθίστανται άνευ σημασίας λόγω της ανθεκτικότητας αυτής. Πιστεύεται ότι τα φυσικά προϊόντα μπορεί να είναι αποτελεσματικές εναλλακτικές λύσεις για την επίλυση αυτού του προβλήματος, καθώς είναι

φθηνότερα, άμεσα διαθέσιμα και πιθανώς αποτελεσματικά έναντι των ποικιλιών του *Clostridium* (Num & Useh, 2014).

### 1.2.1 Βιολογία

Το *Clostridium botulinum* είναι ένας σπορογόνος μικροοργανισμός σε σχήμα ράβδου, το οποίο παράγει ωσειδή ενδοσπόρια και βρίσκεται συνήθως στο έδαφος. Είναι υποχρεωτικά αναερόβιος οργανισμός, που σημαίνει ότι το οξυγόνο είναι δηλητηριώδες για τα κύτταρα, ωστόσο ανέχεται ίχνη οξυγόνου λόγω του ενζύμου δισμουτάσης υπεροξειδίου (αγγλ.: *SOD / superoxide dismutase*), το οποίο είναι μια σημαντική αντιοξειδωτική άμυνα σε όλα σχεδόν τα κύτταρα που εκτίθενται σε οξυγόνο (Doyle, 2007). Το *Clostridium botulinum* είναι σε θέση να παράγει νευροτοξίνες μόνο κατά τη διάρκεια της σπορίωσης, κάτι το οποίο μπορεί να συμβεί μόνο σε ένα αναερόβιο περιβάλλον.

### 1.2.2 Παθολογία

Η δηλητηρίαση από αλλαντίαση μπορεί να συμβεί λόγω ακατάλληλα συντηρημένων ή κονσερβοποιημένων τροφίμων με χαμηλή περιεκτικότητα σε οξύ που δεν υποβλήθηκαν σε επεξεργασία χρησιμοποιώντας σωστούς χρόνους συντήρησης ή / και πίεση (Al-Qahtani, n.d.).

### 1.2.3 Τύποι νευροτοξίνων

Η παραγωγή νευροτοξινών είναι το κοινό χαρακτηριστικό των ποικιλιών του *Clostridium botulinum*. Οι νευροτοξίνες αυτές υποδιαιρούνται σε επτά τύπους (από Α έως Γ) και τα περισσότερα στελέχη του *Clostridium botulinum* παράγουν μόνο έναν από αυτούς τους τύπους, αλλά έχουν περιγραφεί στελέχη που παράγουν πολλούς (Hatheway & McCroskey, 1987). Μόνο οι τύποι Α, Β, Ε και F προκαλούν ασθένειες στους ανθρώπους, ενώ οι τύποι C και D προκαλούν ασθένειες σε αγελάδες, πουλιά και άλλα ζώα (Satterfield, et al., 2010). Μερικά στελέχη από

οργανισμούς που έχουν γενετικά αναγνωριστεί ως άλλα είδη *Clostridium* έχουν προκαλέσει ανθρώπινη αλλαντίαση: Το *Clostridium butyricum* παρήγαγε τοξίνη τύπου E (Aureli, et al., 1986) και το *Clostridium baratii* παρήγαγε τοξίνη τύπου F (Hall, et al., 1985; Notermans & Havellar, 1980).

### 1.3 CLOSTRIDIUM DIFFICILE

Το *Clostridium difficile* είναι ένα είδος Gram-θετικών βακτηρίων του γένους *Clostridium* που προκαλεί σοβαρή διάρροια και άλλες εντερικές ασθένειες όταν τα βακτήρια που βρίσκονται στην εντερική χλωρίδα έχουν εξαφανιστεί από αντιβιοτικά.

Το *Clostridium difficile* είναι η πιο σοβαρή αιτία διάρροιας που σχετίζεται με αντιβιοτικά (αγγλ.: AAD / *antibiotic-associated diarrhea*) και μπορεί να οδηγήσει σε ψευδομεμβρανώδη κολίτιδα, μια σοβαρή φλεγμονή του παχέος εντέρου, που συχνά προκύπτει από την εξάλειψη της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου από αντιβιοτικά (Curry, 2008).

Τα λανθάνοντα συμπτώματα της μόλυνσης από *Clostridium difficile* μιμούνται συχνά κάποια συμπτώματα που μοιάζουν με γρίπη και μπορούν επίσης να μιμηθούν το ξέσπασμα της νόσου σε ασθενείς με κολίτιδα που σχετίζεται με φλεγμονώδη νόσο του εντέρου. Ήπιες περιπτώσεις λοίμωξης από *Clostridium difficile* μπορούν συχνά να θεραπευτούν με τη διακοπή των υπεύθυνων αντιβιοτικών (Ryan & Ray, 2004), ενώ σε πιο σοβαρές περιπτώσεις, η από του στόματος χορήγηση μετρονιδαζόλης και βανκομικίνης είναι σήμερα οι θεραπείες επιλογής.

#### 1.3.1 Μικροβιολογία

Μεμονωμένα βακτήρια *Clostridium difficile* που φαίνονται μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης. Κάτω από το μικροσκόπιο, τα βακτήρια αυτά εμφανίζονται ως κύτταρα με ακανόνιστα σχήματα με διογκώσεις στις άκρες. Υπό χρώση Gram, τα κύτταρα *Clostridium difficile* είναι Gram-θετικά και παρουσιάζουν βέλτιστη ανάπτυξη στο αιματούχο άγαρ σε θερμοκρασίες ανθρώπινου σώματος απουσία οξυγόνου. Όταν βρίσκονται υπό πίεση, τα βακτήρια παράγουν σπόρια που

μπορούν να αντέξουν ακραίες καταστάσεις τις οποίες τα ενεργά βακτήρια δεν μπορούν να αντέξουν (Ryan & Ray, 2004).

### 1.3.2 Παράγοντας μολυσματικότητας

Τα παθογόνα στελέχη *Clostridium difficile* παράγουν αρκετές γνωστές τοξίνες. Οι πιο γνωστές είναι η εντεροτοξίνη (τοξίνη τύπου A) και η κυτταροτοξίνη (τοξίνη τύπου B), οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη διάρροια και τη φλεγμονή που παρατηρείται σε μολυσμένους ασθενείς (Ryan & Ray, 2004). Η κυτταροτοξίνη προκαλεί αποπολυμερισμό της ακτίνης με έναν μηχανισμό που σχετίζεται με τη μείωση της ADP-ριβοζυλίωσης των πρωτεϊνών Rho που δεσμεύουν GDP και έχουν χαμηλές μοριακές μάζες (Just, et al., 1995). Μια άλλη τοξίνη, η δυαδική τοξίνη, έχει επίσης περιγραφεί, αλλά ο ρόλος της στην ασθένεια δεν έχει ακόμη κατανοηθεί πλήρως (Barth, et al., 2004).

### 1.3.3 Πρόληψη

Η πιο αποτελεσματική μέθοδος για την πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με το *Clostridium difficile* είναι η κατάλληλη αντιμικροβιακή συνταγογράφηση. Τα μέτρα ελέγχου των λοιμώξεων, όπως η χρήση γαντιών κατά τη φροντίδα των ασθενών, έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά στην πρόληψη. Αυτό λειτουργεί περιορίζοντας την εξάπλωση του *Clostridium difficile* στον χώρο θεραπείας. Επιπλέον, το πλύσιμο με σαπούνι και νερό εξαλείφει τα σπόρια από μολυσμένα χέρια, αλλά τα διαλύματα με βάση το αλκοόλ είναι αναποτελεσματικά (Roehr, 2007). Έχει αποδειχθεί ότι το υποχλωριώδες νάτριο σκοτώνει τα σπόρια και αποτρέπει τη μετάδοση μεταξύ των ασθενών (Savidge, et al., 2011).

Η θεραπεία με διάφορα στοματικά συμπληρώματα που περιέχουν ζωντανά βακτήρια έχει μελετηθεί σε προσπάθειες για την πρόληψη των λοιμώξεων που σχετίζονται με το *Clostridium difficile*. Μια τυχαίοποιημένη ελεγχόμενη δοκιμή στην οποία χρησιμοποιήθηκε ένα προβιοτικό

διάλυμα που περιείχε *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus* και *Streptococcus salivarius thermophiles*, αναφέρθηκε ότι είχε κάποια αποτελεσματικότητα (Hickson, et al., 2007).

## 1.4 CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

Το *Clostridium perfringens* (παλαιότερα γνωστό ως *Clostridium welchii*) είναι ένα Gram-θετικό, αναερόβιο, σπορογόνο βακτήριο σε σχήμα ράβδου, του γένους *Clostridium* (Ryan & Ray, 2004). Υπάρχει πάντα στη φύση και μπορεί να βρεθεί ως ένα φυσιολογικό συστατικό της βλάστησης που αποσυντίθεται, του θαλάσσιου ιζήματος, του εντερικού σωλήνα των ανθρώπων και άλλων σπονδυλωτών, εντόμων και εδάφους.

Το *Clostridium perfringens* είναι η τρίτη πιο συχνή αιτία τροφικής δηλητηρίασης στο Ηνωμένο Βασίλειο και τις Ηνωμένες Πολιτείες (Warrell, et al., 2003), αν και μερικές φορές μπορεί να μην προκαλέσει βλάβη μετά την κατάποση (Juckett, et al., 2008). Λοιμώξεις που οφείλονται σε αυτό έχουν εμφανίσει στοιχεία νέκρωσης ιστών, βακτηραιμίας, εμφυσματικής χολοκυστίτιδας και αεριογόνου γάγγραινας (η οποία είναι επίσης γνωστή ως κλωστηριδιακή μυονέκρωση). Η τοξίνη που εμπλέκεται στην αεριογόνο γάγγραινα είναι γνωστή ως α-τοξίνη, η οποία εισέρχεται στη μεμβράνη του πλάσματος των κυττάρων, προκαλώντας κενά που διαταράσσουν τη φυσιολογική κυτταρική λειτουργία. Το *Clostridium perfringens* μπορεί να συμμετέχει σε πολυμικροβιακές αναερόβιες μολύνσεις (Brook, 2007), ενώ συναντάται επίσης συχνά σε λοιμώξεις ως συστατικό της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας (Wells & Wilkins, 1996). Σε αυτήν την περίπτωση, ο ρόλος του στην ασθένεια είναι μικρός.

### 1.4.1 Τροφική δηλητηρίαση

Στο Ηνωμένο Βασίλειο και τις Ηνωμένες Πολιτείες, τα βακτήρια *Clostridium perfringens* είναι η τρίτη συχνότερη αιτία ασθένειας που προκαλείται από τα τρόφιμα, με το κακά

παρασκευασμένο κρέας και τα πουλερικά να είναι οι κύριοι υπαίτιοι για τη διατήρηση του βακτηρίου (Warrell, et al., 2003). Η εντεροτοξίνη που μεσολαβεί στην ασθένεια είναι θερμοσταθερή (απενεργοποιημένη στους 74°C) και μπορεί να ανιχνευθεί σε μολυσμένα τρόφιμα, εάν δεν θερμανθούν σωστά, και περιττώματα (Murray, et al., 2009). Ο χρόνος επώασης είναι μεταξύ 6 και 24 (συνήθως 10 - 12) ωρών μετά την κατάποση μολυσμένων τροφίμων, και τα συμπτώματα συνήθως περιλαμβάνουν κράμπες στην κοιλιακή χώρα και διάρροια, με τον εμετό και τον πυρετός να θεωρούνται ασυνήθιστα. Πολύ σπάνιες, θανατηφόρες περιπτώσεις κλωστηριδιακής νεκρωτικής εντερίτιδας είναι γνωστό ότι περιλαμβάνουν νευροτοξίνες τύπου C, οι οποίες παράγουν μια ισχυρά ελκώδη β-τοξίνη.

Παρά τους πιθανούς κινδύνους του, το *Clostridium perfringens* χρησιμοποιείται ως παράγοντας διόγκωσης στο ψωμί. Η διαδικασία ψησίματος πιστεύεται ότι μειώνει τη βακτηριακή μόλυνση, αποκλείοντας τις αρνητικές επιπτώσεις (Juckett, et al., 2008).

#### 1.4.2 Μόλυνση

Το *Clostridium perfringens* είναι ο πιο κοινός βακτηριακός παράγοντας για την αεριογόνο γάγγραινα, η οποία είναι η νέκρωση, η σήψη των ιστών και η παραγωγή αερίου, και προκαλείται κυρίως από την α-τοξίνη *Clostridium perfringens*. Τα αέρια σχηματίζουν φυσαλίδες στους μύες, καθώς επίσης και τη χαρακτηριστική μυρωδιά στον αποσυντιθέμενο ιστό. Μετά από ταχεία και καταστροφική τοπική εξάπλωση (η οποία μπορεί να διαρκέσει ώρες), η συστηματική εξάπλωση βακτηρίων και βακτηριακών τοξινών μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο. Το *Clostridium perfringens* αναπτύσσεται εύκολα σε πλάκες αιματούχου άγαρ σε αναερόβιες συνθήκες και συχνά παράγει μια ζώνη αιμόλυσης (Al-Qahtani, n.d.).

#### 1.4.3 Χαρακτηριστικά αποικιών

Σε πλάκες αιματούχου άγαρ, το *Clostridium perfringens* που αναπτύσσεται αναερόβια παράγει μία β-αιμολυτική, επίπεδη, τραχιά και ημιδιαφανή αποικία με ακανόνιστα περιθώρια. Ένα

διακριτικό χαρακτηριστικό του μικροοργανισμού αυτού είναι μια ζώνη διπλής β-αιμόλυσης. Οι πλάκες άγαρ που υποβάλλονται σε τεστ Nagler, και οι οποίες περιέχουν 5% - 10% κρόκο αυγού, χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση στελεχών που παράγουν α-τοξίνη, μια διάχυτη λεκιθινάση που αλληλεπιδρά με τα λιπίδια στον κρόκο αυγού για να παράγει ένα χαρακτηριστικό ίζημα γύρω από τις αποικίες. Το μισό της πλάκας εμβολιάζεται με αντιτοξίνη για να δράσει ως αποδεικτικό στοιχείο στην ταυτοποίηση (Al-Qahtani, n.d.).

## 1.5 CLOSTRIDIUM TETANI

Το *Clostridium tetani* είναι ένα αναερόβιο βακτήριο σε σχήμα ράβδου του γένους *Clostridium*. Όπως και άλλα είδη, είναι Gram-θετικό και συναντάται ως σπόρια στο έδαφος ή στο γαστρεντερικό σωλήνα των ζώων (Ryan & Ray, 2004). Το *Clostridium tetani* παράγει μια ισχυρή βιολογική τοξίνη, την τετανοσπασμίνη, και αποτελεί τον κύριο λόγο εμφάνισης του τετάνου, μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από οδυνηρούς μυϊκούς σπασμούς που μπορούν να οδηγήσουν σε αναπνευστική ανεπάρκεια και, έως και στο 40% των περιπτώσεων, σε θάνατο (Al-Qahtani, n.d.).

### 1.5.1 Χαρακτηριστικά

Το *Clostridium tetani* είναι ένας υποχρεωτικά αναεροβικός οργανισμός, ο οποίος είναι Gram-θετικός σε φρέσκες καλλιέργειες και μπορεί να είναι και Gram-αρνητικός σε ήδη ανεπτυγμένες καλλιέργειες (Ryan & Ray, 2004). Κατά τη διάρκεια της βλαστικής ανάπτυξης, ο οργανισμός δεν μπορεί να επιβιώσει παρουσία οξυγόνου και είναι ευαίσθητος στη θερμότητα. Καθώς το βακτήριο ωριμάζει, αναπτύσσει ένα τελικό σπόριο, το οποίο δίνει στον οργανισμό τη χαρακτηριστική του εμφάνιση. Τα σπόρια *Clostridium tetani* είναι εξαιρετικά ανθεκτικά στη θερμότητα και στα περισσότερα αντισηπτικά (Madigan & Martinko, 2005), και επιπλέον κατανέμονται ευρέως σε εδάφη που έχουν υποστεί λίπανση με κοπριά. Τέλος, μπορούν επίσης να βρεθούν στο ανθρώπινο δέρμα και σε νοθευμένη ηρωίνη (Atkinson, et al., 2006).

### 1.5.2 Τοξικότητα



Το *Clostridium tetani* εισέρχεται συνήθως σε ξενιστές μέσω τραυμάτων στο δέρμα και στη συνέχεια αναπαράγεται. Μόλις διαπιστωθεί λοίμωξη, το βακτήριο αυτό παράγει δύο εξωτοξίνες, την τετανολυσίνη και την τετανοσπασμίνη. Έχουν αναγνωριστεί έντεκα στελέχη του *Clostridium tetani*, τα οποία διαφέρουν κυρίως στα μαστιγικά αντιγόνα και στην ικανότητά τους να παράγουν τετανοσπασμίνη. Τα γονίδια για την παραγωγή τοξινών κωδικοποιούνται σε ένα πλασμίδιο που υπάρχει σε όλα τα τοξικογενή στελέχη, και τέλος, όλα τα στελέχη που είναι ικανά να παράγουν τοξίνες παράγουν τις ίδιες ακριβώς (Todar, 2005).

Η τετανοσπασμίνη είναι μια νευροτοξίνη που προκαλεί τις κλινικές εκδηλώσεις του τετάνου. Η τοξίνη του τετάνου παράγεται σε ζωντανά βακτήρια και απελευθερώνεται όταν λύονται τα βακτήρια, όπως κατά τη διάρκεια της βλάστησης των σπορίων ή της βλαστικής ανάπτυξης. Απαιτείται ελάχιστη βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη φυτικών κυττάρων για την παραγωγή τοξινών (Todar, 2005).

### 1.5.3 Δράση τοξινών

Η τετανοσπασμίνη που απελευθερώνεται στην πληγή απορροφάται στην κυκλοφορία και φτάνει στα άκρα των κινητικών νευρώνων σε όλο το σώμα. Η τοξίνη δρα σε διάφορες περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των τερματικών κυστιδίων των νευρώνων, του νωτιαίου μυελού και του εγκεφάλου, και εντός του νευρικού συστήματος (Atkinson, et al., 2006).

Οι κλινικές εκδηλώσεις του τετάνου προκαλούνται όταν η τοξίνη του μπλοκάρει τις ανασταλτικές παρορμήσεις, παρεμβαίνοντας στην απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών, συμπεριλαμβανομένης της γλυκίνης και του γ-αμινοβουτυρικού οξέος. Αυτοί οι ανασταλτικοί νευροδιαβιβαστές αναστέλλουν τους α-κινητικούς νευρώνες. Με μειωμένη αναστολή, ο ρυθμός ανάπαυσης του α-κινητικού νευρώνα αυξάνεται, προκαλώντας ακαμψία, μυϊκή συστολή και σπασμούς (Al-Qahtani, n.d.).

## 1.6 DESULFOTOMACULUM

Το είδος *Desulfotomaculum* είναι μια ετερογενής ομάδα υποχρεωτικά αναερόβιων σπορογόνων βακτηρίων που μειώνουν τις θειικές ενώσεις (Campbell & Postgate, 1965; Kuever & Rainey, 2009) και των οποίων το γένος είναι το *Desulfotomaculum nigrificans* (Visser, et al., 2014). Λόγω της μεγάλης φυλογενετικής απόκλισης, τα είδη του γένους *Desulfotomaculum* έχουν ταξινομηθεί σε έξι υποσυστήματα, που χαρακτηρίζονται ως υποσυστήματα *Desulfotomaculum* Ia – If (Stackebrandt, et al., 1997; Watanabe, et al., 2017). Επιπλέον, ένας κλάδος που αποτελείται από αυτές τις ομάδες περιλαμβάνει επίσης τα γένη *Cryptanaerobacter*, *Desulfurispora*, *Pelotomaculum*, *Sporotomaculum* και *Desulfococcus* (Watanabe, et al., 2017; Kaksonen, et al., 2007), υποδεικνύοντας ότι το γένος *Desulfotomaculum* δεν είναι μονοφυτικό. Προηγούμενες φυλογενετικές μελέτες έχουν δείξει την ανάγκη επαναταξινόμησης ορισμένων μελών του γένους *Desulfotomaculum* (Watanabe, et al., 2018).

### 1.6.1 ΣΠΟΡΙΩΣΗ

Μπορεί να υποτεθεί ότι η παρουσία των περισσότερων μικροοργανισμών που κατοικούν στη βαθιά υποεπιφάνεια είναι το αποτέλεσμα ενός σταδιακού θαψίματος των οργανισμών της επιφάνειας με το πέρασμα των γεωλογικών χρόνων. Κατά τη διάρκεια αυτής της μακροπρόθεσμης διαδικασίας, οι φυσικοχημικές συνθήκες αλλάζουν σταδιακά ανάλογα με τους γεωλογικούς περιορισμούς (τύπος βράχου, βάθος, πίεση κλπ.) και η οργανική ύλη υποβαθμίζεται ή μεταμορφώνεται μέσω βιολογικών ή αβιοτικών διεργασιών (Añillo, et al., 2013). Ο σχηματισμός σπορίων είναι πιθανώς ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά των κλωστηριδίων που μειώνουν τις θειικές ενώσεις ή τα ζυμωτικά κλωστηρίδια που τα βοηθούν να επιβιώσουν σε παροδικές περιόδους στέρησης θρεπτικών ουσιών, δυσμενών θερμοκρασιών ή οξειδοαναγωγικών συνθηκών κατά το θάψιμο, και κατά συνέπεια επιτρέποντας τον αποικισμό σε βαθιά επιφάνεια. Αυτές οι περίοδοι επιβίωσης θα μπορούσαν να είναι εξαιρετικά μεγάλες, καθώς είναι καλά τεκμηριωμένο ότι τα βακτήρια που σχηματίζουν ενδοσπόρια, όπως το *Desulfotomaculum*, παραμένουν βιώσιμα σε μια ευρεία ποικιλία περιβαλλόντων που δεν είναι ευνοϊκά για ανάπτυξη πιθανώς κατά τη διάρκεια χιλιάδων ή εκατομμυρίων ετών (Cano &

Borucki, 1995; Vreeland, et al., 2000; Nealson & Ford, 1980). Ωστόσο, ακόμη και αν μπορούν να βρεθούν μεγάλες ποσότητες σπόρων (107 ενδοσπόρια ανά cm<sup>3</sup>) σε δείγματα ηλικίας αρκετών εκατομμυρίων ετών (Lomstein & Jørgensen, 2012), είναι εύλογα τα ερωτήματα για την πιθανότητα ενεργοποίησης σπόρων και βλάστησης χωρίς δραστηριότητα συντήρησης DNA για πολύ μεγάλες περιόδους (Lindahl, 1993; Johnson, et al., 2007).

Η σπορίωση θα μπορούσε περιοδικά να είναι απαραίτητη για να ξεπεραστεί ο υπερβολικός περιορισμός ενέργειας λόγω της πλήρους εξάντλησης της τοπικής παροχής θρεπτικών ουσιών (Fredrickson & Balkwill, 2006), ή για τη διευκόλυνση της παθητικής διασποράς (Isaksen, et al., 1994; Jørgensen & Boetius, 2007). Στο τέλος της ιζηματογενούς διαδικασίας, μπορούν να επιτευχθούν ακραίες καταστάσεις όπως στην περίπτωση του σπορογόνου *Candidatus Desulfotomaculum audaxviator*, το οποίο έγινε το μοναδικό αυτόνομο βακτηριακό είδος στο βαθύ περιβάλλον (Chivian, et al., 2008). Η ανίχνευση του *Desulfotomaculum* στα ιζήματα της Βόρειας Θάλασσας επίσης δείχνει πώς ο σχηματισμός σπορίων θα μπορούσε να είναι ένα πλεονέκτημα για τη διάδοση μικροοργανισμών που προέρχονται από τη βαθιά υποεπιφάνεια σε επιφανειακά περιβάλλοντα, τα οποία μπορεί τελικά να επιστρέψουν σε ρηχά ιζήματα (Añillo, et al., 2013).

### 1.6.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

Αξίζει να σημειωθεί ότι πολλά είδη *Desulfotomaculum* που έχουν απομονωθεί από περιβάλλοντα κάτω από την επιφάνεια είναι αυτοτροφικοί μικροοργανισμοί. Αυτή η μεταβολική ικανότητα τους επιτρέπει να επωφεληθούν από την αναγνωρισμένη πανταχού παρούσα πηγή υδρογόνου στη βαθιά υποεπιφάνεια (Pedersen, 1997; Lin, et al., 2005). Από την άποψη αυτή, η απελευθέρωση οξικού άλατος που προκύπτει από αυτή τη μεταβολική διαδικασία ειδικότερα στη βαθιά βιόσφαιρα, μπορεί να είναι ευεργετική για τη συνολική μικροβιακή κοινότητα, με ιδιαίτερη έμφαση για τα ακόλουθα:

- ✓ Ακετοκλαστικά μεθανογενή αρχαία που έχουν ανακτηθεί από τη βαθιά βιόσφαιρα.

- ✓ Άλλα υδρογονοτροφικά ή υδροξυγονοξειδωτικά μεθανογενή αρχαία που κατοικούν σε υποεπιφανειακά οικοσυστήματα και απαιτούν πηγή οργανικού άνθρακα για την ανάπτυξή τους.

Έχει αποδειχθεί πολλές φορές στη βαθιά βιόσφαιρα ότι οι μειωτές θεικών ενώσεων συνυπάρχουν με ομοακετογόνα βακτήρια και μεθανογενή αρχαία. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για τα ολιγοτροφικά οικοσυστήματα (π.χ. γρανιτικούς υδροφορείς) (Pedersen, 1997), αλλά και σε πλούσια σε οργανικές ενώσεις οικοσυστήματα (π.χ. δεξαμενές πετρελαίου) (Magot, et al., 2000; Ollivier & Alazard, 2010), όπου αυτές οι τρεις προκαρυωτικές ομάδες έχουν ανακτηθεί πολλές φορές με μοριακές προσεγγίσεις. Στα προηγούμενα οικοσυστήματα, το υδρογόνο που ανακτήθηκε από βιολογικές (ζυμωτικές διεργασίες) ή αβιοτικές διεργασίες (π.χ. ραδιόλυση, ορυκτές αντιδράσεις, ηφαιστειακή δραστηριότητα) έχει αναγνωριστεί ότι οδηγεί σε μια ενδο-επίγεια βιόσφαιρα (Pedersen, 1997), ενώ τα υδρογονοτροφικά αυτοτροφικά βακτήρια μαζί με μεθανογενή αρχαία υποτίθεται ότι διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο για την παροχή οργανικού υλικού στη βαθιά βιόσφαιρα (π.χ. οξικό για ομοακετογόνα, μεθάνιο για μεθανογόνα και βιομάζα). Αυτό καθιστά τα *in situ* βιοενεργητικά συστήματα ανεξάρτητα από οποιαδήποτε φωτοσυνθετική δραστηριότητα (Añillo, et al., 2013).

Εκτός από τη μείωση θεικών ενώσεων, πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη ότι το *Desulfotomaculum* μπορεί επίσης να χρησιμοποιεί διάφορες άλλες ενώσεις θείου ή και μέταλλα ως τερματικούς δέκτες ηλεκτρονίων (Tebo & Obratzsova, 1998) επιβεβαιώνοντας έτσι τη γεωμικροβιολογική τους σημασία στη βαθιά βιόσφαιρα, όπου τα μέταλλα και τα μεταλλοειδή είναι ιδιαίτερα διαδεδομένα. Ωστόσο, τα δεδομένα σε αυτό το σημείο είναι λιγοστά και αξίζουν περισσότερες έρευνες.

Έχει αναφερθεί ότι τα είδη *Desulfotomaculum* όχι μόνο χρησιμοποιούν υδρογόνο ως δότη ηλεκτρονίων, αλλά και ένα ευρύ φάσμα οργανικών ενώσεων (π.χ. σάκχαρα, αρωματικές ενώσεις, λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας, οργανικά οξέα) που μπορεί να είναι επίσης διαθέσιμα σε μικρότερο βαθμό σε ορισμένα βαθιά περιβάλλοντα πλούσια σε οργανικές ύλες (Añillo, et al., 2013).

## 1.7 SPOROLACTOBACILLUS

Το γένος *Sporolactobacillus* ορίστηκε από τους Kitahara & Suzuki (1963) για να χαρακτηρίσει ένα είδος βακτηρίων που είναι σπορογόνα, ομοζυμωτικά και αρνητικά στην καταλάση, και επιπλέον παράγουν γαλακτικό οξύ: το *Sporolactobacillus inulinus*, το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Lactobacillaceae*. Αργότερα, το γένος *Sporolactobacillus* μεταφέρθηκε στην οικογένεια *Bacillaceae* από τους Kitahara & Toyota (1972). Πιο πρόσφατα, στο Εγχειρίδιο της Συστηματικής Βακτηριολογίας του Bergey, όλα τα μέλη που εκπροσωπούν το είδος *Sporolactobacillus* ομαδοποιήθηκαν στην οικογένεια *Sporolactobacillaceae* (Garrity & Holt, 2001). Μια σύγκριση των φυσιολογικών χαρακτηριστικών των ειδών στο γένος *Sporolactobacillus* και ενός σπορογόνου μικροοργανισμού της ομάδας *Bacillus*, του *Bacillus coagulans*, αποκάλυψε ότι τα μέλη του γένους *Sporolactobacillus* στερούνται δραστηριότητας καταλάσης και απαιτούν υδατάνθρακες για ανάπτυξη (Yanagida, et al., 1987).

Έχουν αναφερθεί έξι είδη στο γένος *Sporolactobacillus*, τα οποία προέρχονται από περιορισμένες πηγές απομόνωσης. Το *Sporolactobacillus inulinus* απομονώθηκε από ζωτροφές κοτόπουλου (Kitahara & Suzuki, 1963) και τα άλλα είδη, δηλαδή το *Sporolactobacillus kofuensis*, το *Sporolactobacillus lactosus*, το *Sporolactobacillus laevolacticus*, το *Sporolactobacillus nakayamae* και το *Sporolactobacillus terrae*, απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα ή το έδαφος γύρω από τις ρίζες μιας ποικιλίας άγριων φυτών που συλλέχθηκαν στην Ιαπωνία και τη Νοτιοανατολική Ασία (Nakayama & Yanoshi, 1967; Yanagida, et al., 1987). Το *Sporolactobacillus laevolacticus* αναταξινομήθηκε από τους *Bacillus laevolacticus* από τους Hatayama et al. (2006). Ορισμένα στοιχεία δείχνουν ότι το είδος *Sporolactobacillus* μπορεί να είναι χρήσιμο ως προβιοτικό, ενώ το *Sporolactobacillus sp. L2407* παρουσίασε ανταγωνιστική δράση εναντίον

ειδών *Bacillus* (Holzapfel & Botha, 1988), και το *Sporolactobacillus inulinus* BCRC 14647 φάνηκε να αναστέλλει την ανάπτυξη του *Salmonella enteritidis* BCRC 10744 (Huang, et al., 2007).

## 1.8 SPOROSARCINA

Το γένος *Sporosarcina*, το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Bacillaceae*, προτάθηκε από τους Κλυγκερ & van Niel (1936) για να φιλοξενήσει βακτήρια που έχουν σφαιρικά ή ωοειδή κύτταρα και περιέχουν την μενακινόνη ΜΚ-7 ως την κύρια μενακινόνη τους. Πρόσφατα, το είδος *Sporosarcina antarctica*, απομονωμένο από δείγματα εδάφους στην Ανταρκτική, αναφέρθηκε από τους Yu et al. (2008), και έτσι το γένος *Sporosarcina* περιέχει τώρα δέκα αναγνωρισμένα είδη (Tominaga, et al., 2009):

- ❖ *Sporosarcina ureae*
- ❖ *Sporosarcina globispora*
- ❖ *Sporosarcina psychrophila*
- ❖ *Sporosarcina pasteurii*
- ❖ *Sporosarcina aquimarina*
- ❖ *Sporosarcina macmurdoensis*
- ❖ *Sporosarcina koreensis*
- ❖ *Sporosarcina soli*
- ❖ *Sporosarcina saromensis*
- ❖ *Sporosarcina antarctica*

Τα μέλη του γένους *Sporosarcina* είναι Gram-θετικά ή Gram-μεταβλητά βακτήρια σε σχήμα σφαίρας ή ράβδου, τα οποία σχηματίζουν ενδοσπόρια (An, et al., 2007).

Σπορογόνα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Sporosarcina* όπως το *Sporosarcina pasteurii*, το *Sporosarcina globispora* και το *Sporosarcina psychrophila* εκτιμάται ότι διαθέτουν διάφορα προβιοτικά χαρακτηριστικά, όπως ο σχηματισμός βιοφίλμ, η εντερική πρόσφυση, η ανοχή στο οξύ και τη χολή, η ευαισθησία στα αντιβιοτικά και αντιπαθογόνος δράση. Αυτό εξασφαλίζει τη βακτηριακή βιωσιμότητα υπό γαστρεντερικές συνθήκες και επιτρέπει τον αποτελεσματικό αποικισμό του εντερικού αυλού (in vitro) (Priyodip & Balaji, 2019).

## 2. Μικροχλωρίδα μικροοργανισμών που ευδοκμεί σε διάφορους τύπους τροφίμων:

Τα σπορογόνα βακτήρια αποτελούν συμπαντικό κίνδυνο που εγκυμονεί σε μονάδες παραγωγής θερμικώς επεξεργασμένων τροφίμων. Τα σπόρια παρουσιάζουν αντίσταση τόσο σε χημικά μέσα όπως τα απολυμαντικά όσο και σε φυσικές μεταβολές όπως αυτή της θερμοκρασίας κατά την παραγωγική διαδικασία τροφίμων. Τα σπόρια ευημερούν σε διάφορα στάδια του παραγωγικού κύκλου των τροφίμων με αποτέλεσμα ένας αριθμός αυτών να καταφέρνει να βλαστήσει και να αναπτυχθεί στο παραγόμενο προϊόν κάτω από κατάλληλες συνθήκες όπως ο χρόνος και η ένταση θερμικής επεξεργασίας, η διαθεσιμότητα σε θρεπτικά συστατικά καθώς και οι φυσικές και οι χημικές ιδιότητες του τροφίμου.

Οι δυο βασικότερες κατηγορίες σπορογόνων βακτηριδίων είναι αυτή των ραβδόμορφων αερόβιων βακτηριδίων του γένους *Bacillus* και αυτή των αναερόβιων βακτηριδίων του γένους *Clostridium*. Η εξέλιξη στην μοριακή κατανομή ανάλογα με το είδος του κάθε βακτηριακού γένους έχει οδηγήσει σε επανεξέταση της αλλοίωσης των τροφίμων με βάση την ποικιλομορφία της χλωρίδας των βακτηριδίων. Η βακτηριακή μόλυνση των τροφίμων διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες, με πιο πρόσφατη προσθήκη αυτή που περιλαμβάνει όλα τα θερμοανθεκτικά βακτήρια. Τα μέλη του είδους *Bacillus* που προκαλούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα ανήκουν στα γένη *Bacillus*, *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Alicyclobacillus*, και *Paenibacillus* όμως έχουν σημειωθεί μολύνσεις που προκάλεσαν βακτήρια του γένους *Clostridium* και *Desulfotomaculum*. Τα περισσότερα γένη που ευθύνονται για την οξίνιση “flat sour” των τροφίμων εκτός από κάποιες εξαιρέσεις, ανήκουν στο γένος *Bacillus* και τα συγγενικά του είδη. Ειδικότερα ως κύρια είδη παθογόνων βακτηρίων έχουν αναγνωριστεί το *Bacillus cereus* και το *Clostridium botulinum* του γένους *Bacillus* και *Clostridium* αντίστοιχα.

Η κατηγορία των θερμοφίλων αναερόβιων βακτηρίων περιλαμβάνει κυρίως τα θερμοφιλά αναερόβια βακτήρια που αναφέρθηκε προηγουμένως ότι εντάσσονται στο γένος των Κλοστρίδιων ωστόσο, μπορεί να ανήκουν και σε άλλα γένη όπως το *Acetogenium* το *Thermobacter*, *Moorella* (γνωστά ως είδη του *Clostridium*), *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium*, *Caldanaerobacter*, *Caldanaerobius* και *Gelria*.

### 2.1 Αναερόβια βακτήρια σε κατεψυγμένα κρέατα συσκευασμένα υπό κενό

Ο McBride 1911, και αργότερα οι Sturges και Drake το 1926, αναγνώρισαν το *Clostridium* ως το κύριο γένος που ευθύνεται για την αλλοίωση του ψυγμένου κρέατος που ονομάζεται «blown pack» και συγκεκριμένα, το είδος *Clostridium putrefaciens*. Στις αρχές της δεκαετίας του ενενήντα εξελίχθηκαν νέες μέθοδοι για την ταυτοποίηση μικροοργανισμών με αποτέλεσμα να



βρεθούν νέα είδη που ευθύνονται για την μόλυνση του κατεψυγμένου κρέατος σε συσκευασία υπό κενό, όπως τα *Clostridium estertheticum*, *Clostridium algidicarnis*, *Clostridium frigidicarnis*, *Clostridium gasigenes*, *Clostridium algidixylanolyticum*, *Clostridium frigoris* και *Clostridium bowmanii*. Ωστόσο τα κύρια φαινόμενα που παρατηρούνται στα μολυσμένα κρεατοσκευάσματα είναι η ανεξέλεγκτη παραγωγή αερίου με αποτέλεσμα την διόγκωση της πλαστικής συσκευασίας, έντονη μυρωδιά και υποβάθμιση του χρώματος και της υφής του κρέατος. Σύμφωνα με μελέτη που έγινε από τον Clemens κ.α. (2010) ακόμη και ένα σπόριο του *C. estertheticum* ανά προϊόν είναι ικανό να προκαλέσει αλλοίωση σε βοδινό και αρνίσιο κρέας κατά την διάρκεια της αποθήκευσης. Η κατάταξη των ειδών γίνεται με βάση την βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης, με τα ψυχρότροφα να είναι βέλτιστη στους 12 °C και ελάχιστη κοντά στους 37 °C, ενώ για τα ψυχρόφιλα η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι περίπου στους 8-12 °C, ενώ δεν αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες άνω των 30 °C. Επίσης η μόλυνση που προκαλείται από το *C. gasigenes* ευνοείται σε θερμοκρασίες από -1 έως -2 °C. Αν και τα περισσότερα είδη των προαναφερθέντων μικροοργανισμών συνήθως ταυτοποιούνται ξεχωριστά είναι αρκετές οι περιπτώσεις που εμφανίζονται στο ίδιο δείγμα και άλλα είδη μικροοργανισμών και έτσι δημιουργείται η υπόνοια συνεργατικής δράσης μεταξύ τους. Ο συνδυασμός ψυχρότροφων και αναερόβιων χαρακτηριστικών καθιστά αυτά τα είδη αρκετά δύσκολα στο να απομονωθούν και έτσι οι νεότερες μελέτες σκοπεύουν στην δημιουργία νέων τεχνικών απομόνωσης. Στο εργαστήριο CTCPA πρόσφατα βρέθηκε ότι ο *C. Algidicarnis* είναι υπεύθυνος για την αλλοίωση του παστεριωμένου "φουά γκρά" (συκώτι πάπιας). Τα προϊόντα αρκετών βιομηχανιών κρέατος το διάστημα 2011-2012 είχαν υποστεί αλλοιώσεις όπως την δημιουργία ιδιάζουσας μυρωδιάς και την έντονη παραγωγή αερίου σύμφωνα με προσωπικά τους δεδομένα. Την μόλυνση αυτή προκάλεσε η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *C. bowmanii* στα προϊόντα τους.

Οι αναζήτηση νέων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών απασχόλησε αρκετούς ερευνητές. Μια ομάδα ερευνητών με επικεφαλή τον Broda κ.α. (2002) διαπίστωσε ότι τα σωματίδια του εδάφους σε δέρματα σφαγίων, καθώς και τα κόπρανα, πρέπει να παρακολουθούνται με ιδιαίτερη προσοχή μέσω τακτικών ελέγχων υγιεινής με σκοπό την μείωση της μόλυνσης του σφαγίου από *C. gasigenes* ή *C. Estertheticum*.

Ο Moschonas κ.α. (2009) με την ομάδα του σύλλεξε 1680 δείγματα που απομονώθηκαν από σφάγια βόειου κρέατος κατά τη διάρκεια ενός έτους και παρακολούθησε συγκεκριμένα τους μικροοργανισμούς *C. estertheticum* και *C. Gasigenes*. Το 38% των δειγμάτων σφαγίων βρέθηκαν θετικά ενώ το 10-14% των δειγμάτων εδάφους περιείχε και τα δυο είδη μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα η Silva et al. (2011) αναλύοντας δείγματα από χαλασμένα και συμμορφούμενα κρέατα βόειου καθώς και δείγματα από τον χώρο του σφαγείου και από τμήματα δέρματος αναγνώρισε μόνο τα *C. gasigenes* και *C. Algidicarnis*. Επίσης βάση δοκιμών πλύσης της επιφάνειας του κρέατος με ζεστό και κρύο νερό από την ομάδα επιστημών Adam κ.α. (2013) προέκυψε ότι ο εντοπισμός του *Clostridium* spp. στις επιφάνειες κρέατος προκαλείται από διασταυρούμενη μόλυνση. Η διάρκεια ζωής των δειγμάτων που είχαν υποστεί έκπλυση αυξήθηκε κατά 12 με 13 ημέρες σε αντίθεση με τα κρέατα που δεν είχαν υποστεί πλύσιμο.

Παράλληλα βρέθηκε ότι τα περιττώματα αποτελούν φορέα μόλυνσης καθώς περιέχουν σημαντική ποσότητα ψυχρότροφων κλωστριδίων όπως *C. estertheticum* *C. gasigenes*.

## 2.2 Χλωρίδα που σχηματίζει σπόρια σε γαλακτοκομικά προϊόντα

### 2.2.1 Φρέσκο γάλα: βασική πηγή μικροοργανισμών

Σύμφωνα με νεότερες μελέτες που έγιναν σχετικά με την αλλοίωση του φρέσκου γάλακτος όσο αφορά τα τελικά προϊόντα ή την γραμμή παραγωγής και επεξεργασίας γαλακτοκομικών προϊόντων, ο κίνδυνος δημιουργίας σπορίων είναι αυξημένος. Είτε πρόκειται για ψυγμένα, είτε αποθηκευμένα σε χώρους ελεγχόμενης θερμοκρασίας προϊόντα είτε προϊόντα που περιέχουν ζυμωμένο γάλα, τα βακτήρια είναι ικανά να δημιουργήσουν σποριακές δομές. Συγκεκριμένα σε μικροβιακό έλεγχο που έγινε σε φρέσκο γάλα, βρέθηκαν περισσότερα από 5000 σπόρια ανά ml γάλακτος. Συγκεκριμένα το βακτήριο *B. Cereus* ευδόκιμη στα ψυγμένα γαλακτοκομικά προϊόντα και είναι συχνά υπεύθυνο για την αλλοίωση των οργανολιπτικών τους και επιπλέον για την πρόκληση τροφολιμόξεων στους καταναλωτές.

Την ίδια χρονιά ο Lucking κ.α. μελέτησε τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς στο γάλα όσο και το περιβάλλον παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων. Συγκεκριμένα ανιχνεύτηκαν 43 διαφορετικά είδη από τα οποία το 75% προήλθε από μολυσμένα προϊόντα και το 25% από το περιβάλλον επεξεργασίας. Η πλειοψηφία των ειδών ανήκε στις ομάδες των *B.subtilis* και *B.amyloliquefaciens* καθώς και είδη όπως *Bacillus smithii* και *Geobacillus pallidus* ανάλογα με τον μεσόφιλο ή θερμοφιλο χαρακτήρα του κάθε είδους και την αντοχή του σε υψηλή θερμοκρασία (80 °C) για χρονικό διάστημα 10 λεπτών (HHRS). Το ανθεκτικότερο σπόριο που ανιχνεύτηκε ήταν από το είδος *Geobacillus stearothermophilus* με αντοχή σε θερμική επεξεργασία στους 100 °C για 10 λεπτά. Τα προϊόντα που αναλύθηκαν είχαν διαφορετική σύσταση καθώς επίσης διαφέραν και στον τρόπο παραγωγής τους. Έτσι εξηγείται η ποικιλομορφία των ειδών που ανιχνεύθηκαν καθώς επίσης αναφέρθηκε από τους ερευνητές ότι παρατήρησαν εποχιακές διακυμάνσεις σε μεσοφιλικά ή ψυχοφιλικά σπόρια που μολύνουν το παστεριωμένο γάλα. Η χειμώνας αποτελεί την πιο ευνοϊκή εποχή για την ανάπτυξη των μεσόφιλων μικροοργανισμών σε αντίθεση με το καλοκαίρι και το φθινόπωρο που ευνοείται ο πολλαπλασιασμός του ψυχροφιλικού Βάκιλλου. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών σχετίζεται και με την διατροφή των βοοειδών είτε με φρέσκο χορτάρι ή σανό. Συγκεκριμένα ο Muir κ.α. (1986) συνέδεσε απευθείας την μόλυνση των εργοστασίων επεξεργασίας γαλακτοκομικών προϊόντων με την μικροβιακή χλωρίδα που περιέχεται στην τροφή των ζώων που προορίζονται για γαλακτοκομική εκμετάλλευση. Εκτός από την αερόβια χλωρίδα, σημαντικές αλλοιώσεις μπορούν να προκαλέσουν και αναερόβια γένη όπως το *Clostridium spp.* που έχει καταστεί υπεύθυνο για την αλλοίωση του τυριού.

Στην περίπτωση αλλοίωσης και εμφάνισης πριζήματος στην επιφάνεια του τυριού, μέletes έδειξαν ότι αναερόβιοι μικροοργανισμοί έχουν άμεση επίδραση στην ποιότητα του γάλακτος ανάλογα και με την περιεχόμενη χλωρίδα στην τροφή του ζώου που κατά συνέπεια προκαλούν αλλοιώσεις στο τελικό προϊόν.

Σύμφωνα με τους Dasgupta και Hull (1989), τα είδη βουτυρικού κλοστρίδιου παρατηρούνται στο γάλα καθ' όλη την διάρκεια του έτους. Ωστόσο, το φθινόπωρο και τον χειμώνα ήταν οι περίοδοι κατά τις οποίες περισσότερο από το 50% των δειγμάτων περιείχε τουλάχιστον 1 σπόριο ανά 5 ml γάλακτος. Η υψηλή τιμή συσχετίστηκε με την αυξημένη συχνότητα της εποχιακής αλλοίωσης του γκούντα ή του ελβετικού τυριού από το *Clostridium tyrobutyricum*.

Μια νεότερη μελέτη έδειξε ότι η θερινή περίοδος είναι η πιο ευνοϊκή για μόλυνση του γάλακτος με αναερόβια βακτήρια που σχηματίζουν σπόρια, και κατά συνέπεια για την αλλοίωση του τυριού Manchego. Συγκεκριμένα τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το 97% των δειγμάτων ήταν μολυσμένα, με μέσο όρο 14,5 σπόρια ανά ml για διάστημα μιας σεζόν.

Η ποικιλομορφία των μικροοργανισμών που απαντώνται στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι ευρεία και αυτό οφείλεται στον μεγάλο αριθμό γαλακτοκομικών προϊόντων που παράγονται σήμερα καθώς και στις επιμέρους επεξεργασίες που υφίστανται. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα ανάλογα με την μέθοδο επεξεργασίας τους χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες:

- α) ψυγμένα προϊόντα όπως το παστεριωμένο γάλα,
- β) αποστειρωμένο γάλα,
- γ) γάλα σε σκόνη που συντηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και
- δ) προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως τα τυριά.

### 2.2.2 Παστεριωμένο γάλα: ψυγμένο γάλα

Η διαδικασία της παστερίωσης πραγματοποιείται σε υψηλή θερμοκρασία και για σύντομο χρονικό διάστημα (HTST) 72 °C για 15 s (καταστροφή του *Coxiella burnetti*). Κατά την παστερίωση δεν καταστρέφονται σπόρια μεσόφιλων ειδών που μπορούν να αναπτυχθούν κατά την αποθήκευση. Το αποτέλεσμα της επεξεργασίας αυτής ή παρόμοιας θερμικής επεξεργασίας είναι η παράταση της διάρκειας ζωής του γάλακτος μεταξύ 2 έως 3 βδομάδες.

Από το 2004, αρκετοί συγγραφείς όπως οι Ivy κ.α. (2012) έδειξαν την υπεροχή, μεταξύ των ψυχρόφιλων αερόβιων σπορίων του γένους *Raenibacillus* (> 50%) στο γένος *Bacillus* (> 30%) σε φρέσκο και παστεριωμένο γάλα. Η εμφάνιση των νέων ειδών οφείλεται στην εξέλιξη νέων μεθόδων ανίχνευσης που επιτρέπουν τη διαφοροποίηση των δύο γενών χρησιμοποιώντας τεχνικές φαινοτυπίας. Στο γένος *Bacillus*, τα είδη *B. licheniformis* και *B. subtilis* που παρατηρούνται στο φρέσκο γάλα εξακολουθούν να κυριαρχούν σε μεγάλο βαθμό έναντι των

μεσόφιλων ειδών, ενώ από τα ψυχρόφιλα είδη, κυριαρχεί η ομάδα *B. cereus* (με *B. cereus* ή *Bacillus weihenstephanensis* / *mycoides*). Τα γένη *Raenibacillus*, *Raenibacillus odorifer* ήταν τα κύρια είδη που εντοπίστηκαν στην μελέτη καθώς και το *Raenibacillus amylolyticus* σε ποσοστό 62% και 25% αντιστοίχως στα απομονωμένα δείγματα. Ο Ranieri και ο Boor (2009) παρατήρησαν αλλαγές στους μικροοργανισμούς κατά την διάρκεια την μικροβιολογικής ζωής του παστεριωμένου γάλακτος. Συγκεκριμένα από την πρώτη έως την 17η ημέρα αποθήκευσης του γάλακτος, ο *Bacillus* κυριαρχούσε, ωστόσο στο τέλος της διάρκειας την ζωής του κυριάρχησε ο *Raenibacillus*.

Λαμβάνοντας υπόψη όλη τη διαδικασία και τα αποτελέσματα της μελέτης που έγινε στο φρέσκο και το παστεριωμένο γάλα, η ανίχνευση της χλωρίδας που εμπεριέχεται στα δύο προϊόντα χαρακτηρίζεται από παρόμοια αλληλόμορφα είδη μικροοργανισμών με βάση την μέθοδο απομόνωσης του DNA *groB* που χρησιμοποιήθηκε και στις δύο διαδικασίες παρακολούθησης των προϊόντων. Ο Scheldeman (2005) ερεύνησε την ποικιλομορφία των αερόβιων HRS μικροοργανισμών σε 17 Βέλγικες γαλακτοκομικές φάρμες, καταφέροντας να ανιχνεύσει τελικά 7 γένη σε 700 δείγματα απομόνωσης. Ο *B. licheniformis* και ο *G. pallidus* ήταν τα κυρίαρχα είδη, λόγω της υψηλής αντοχής τους στη θερμική επεξεργασία.

### 2.2.3 Αποστειρωμένο γάλα : μικροβιακή σταθερότητα σε συνθήκες περιβάλλοντος.

Η διαδικασία αποστείρωσης του γάλακτος πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 140 °C για 4 δευτερόλεπτα και ονομάζεται θέρμανση σε υπερύψηλη θερμοκρασία (UHT). Η υπεύθυνη χλωρίδα μικροοργανισμών για την μόλυνση του αποστειρωμένου γάλακτος διαφέρει από εκείνη του παστεριωμένου γάλακτος λόγω της υψηλότερης θερμικής επεξεργασίας που υποβάλλεται το γάλα. Οι ερευνητές Id και Schaal απομόνωσαν κυρίως αερόβια σπόρια στο αποστειρωμένο γάλα ενώ τα αναερόβια σπόρια ήταν ελάχιστα. Αν και οι μικροοργανισμοί *Bacillus coagulans* και *G. stearothermophilus* έχουν ανιχνευθεί σε αυτόν τον τύπο προϊόντων, οι ερευνητές έχουν επικεντρωθεί στην ταυτοποίηση του *Bacillus sporothermodurans* τα τελευταία έτη. Η παρουσία του *G. stearothermophilus* είναι αναμενόμενη μετά από επεξεργασία UHT, καθώς αποτελεί ένα ανθεκτικό στην θερμοκρασία σπόριο, όμως η ανίχνευση των σπορίων του είδους *Bacillus sporothermodurans* εξέπληξε τους ερευνητές. Ο Scheldeman (2006) επιβεβαίωσε ότι αυτό το είδος ανήκει στην ομάδα HRS, με τιμή D στους 140 °C έως 5 δευτερόλεπτα. Ακριβής αναγνώριση της προέλευσης αυτού του είδους δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί, διότι εμφανίζεται μόνο στο τελικό προϊόν, δηλαδή σε γάλα UHT. Η μείωση της εμφάνισης αυτών των σπορίων απαιτεί επιλεκτική θερμική επεξεργασία διότι είναι ικανά να αναπτυχθούν και να προκαλέσουν μόλυνση στο τρόφιμο χωρίς να επηρεάζονται από τον ανταγωνισμό με άλλες χλωρίδες.

#### 2.2.4 Αφυδατωμένο γάλα: γάλα σε σκόνη

Η αερόβια χλωρίδα έχει επίσης ταυτοποιηθεί αποκλειστικά στο γάλα σε μορφή σκόνης. Το γάλα σε σκόνη θεωρείται βασικός φορέας σπορίων και όταν χρησιμοποιείται λόγω βλάστησης σπορίων σε ένα τελικό προϊόν με υψηλότερη ενεργότητα ύδατος παρατηρείται έντονη αλλοίωση του. Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 18 χώρες, οι Rueckert κ.α. (2004) βρήκαν ότι οι *G.stearothermophilus* και *Raenibacillus flavithermus* είναι οι πιο συχνά εμφανιζόμενοι μικροοργανισμοί στο γάλα σκόνης. Συγκεκριμένα έγινε ανίχνευση των δύο ειδών που αναφέρονται παραπάνω σε σκόνη γάλακτος για βρέφη στην Κίνα καθώς και το είδος *B. Licheniformis*. Αυτά τα τρία είδη αντιπροσώπευαν περισσότερο από το 80% των υπό μελέτη δειγμάτων σκόνης. Το *B. Licheniformis* εμφανίστηκε στα περισσότερα δείγματα σε λιγότερο από 1000 CFU g<sup>-1</sup> με εξαίρεση τα 10000 CFU g<sup>-1</sup> που βρέθηκαν σε λίγα δείγματα.

#### 2.2.5 Γάλα που έχει υποστεί ζύμωση: τυριά

Οι αλλοιώσεις στα τυριά προκαλούνται μόνο από αναερόβια βακτήρια που σχηματίζουν σπόρια και ευθύνονται για την έντονη παραγωγή αερίου. Όλα τα είδη του *Clostridium* στην φυλογενετική του ομάδα μπορούν να είναι υπεύθυνα για την καθυστερημένη διόγκωση των τυριών καθώς επίσης προκαλούν ρηγμάτωση στα σκληρά τυριά όπως Comte, Emmental, Beaufort και Gouda κ.λπ. Τα φαινόμενα αλλοίωσης προκύπτουν από την διάσπαση του γαλακτικού οξέος από την βουτυρική ζύμωση των βακτηρίων και παράγεται CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub> μαζί με βουτυρικό οξύ το οποίο προσδίδει μια ανεπιθύμητη γεύση ταγγού. Ως εκ τούτου, η ανάλυση των πτητικών συστατικών όπως το βουτυρικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση μη φυσιολογικής ζύμωσης κατά την παρασκευή τυριού. Κατά καιρούς έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες για τον χαρακτηρισμό της αλλοιωγόνου χλωρίδας που μολύνουν τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Ωστόσο, μόνο τέσσερα είδη είναι συχνά υπεύθυνα για την μόλυνση των ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων. Αυτά είναι τα *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium sporogenes* και το *C. tyrobutyricum*. Επίσης το *Clostridium cochlearium* έχει ανιχνευθεί σε ελάχιστες περιπτώσεις. Αυτά τα είδη μπορούν να επιβιώσουν κατά την παστερίωση του γάλακτος μέσω της ιδιότητάς τους να σχηματίζουν σπόρια, και όταν οι συνθήκες γίνουν ευνοϊκές αναπτύσσονται στο προϊόν, προκαλώντας αλλοιώσεις στα τυριά. Αλλοιώσεις μπορεί να προκαλέσει και μια μικρή ποσότητα σπόρων (200 σπόρια ανά λίτρο γάλακτος), αλλά συχνότερα η αλλοίωση οφείλεται σε μεγαλύτερες ποσότητες της τάξης των 400-1000 σπορίων ανά λίτρο γάλακτος. Τέλος έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι βασισμένες στη μοριακή βιολογία με στόχο την ταχύτερη ανίχνευση μικροοργανισμών σε βιομηχανικές γραμμές ή σε τελικά προϊόντα για τα είδη που εμπλέκονται συχνότερα σε αλλοίωση (*C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* και *C. tyrobutyricum*).

## 2.3 Κονσερβοποιημένα τρόφιμα: οι πιο ανθεκτικοί μικροοργανισμοί στη θερμότητα

Η κονσερβοποίηση αποτελεί μια διαδικασία που χρησιμοποιείται για την παραγωγή μιας ευρείας γκάμας τελικών προϊόντων με βάση το pH τους. Ο πρώτος τύπος προϊόντων περιλαμβάνει τα προϊόντα με ουδέτερο pH (4,6 διεθνές ή 4,5 σε ορισμένες χώρες της Ευρώπης). Στις περιπτώσεις υψηλότερου pH λαμβάνονται υπόψη τα κονσερβοποιημένα προϊόντα με μη όξινο χαρακτήρα και ο κίνδυνος της αλλαντίασης δεν ελέγχεται εκτός και αν το γάλα έχει υποστεί επεξεργασία αποστείρωσης σε θερμοκρασία άνω των 100 °C και ο χρόνος αποστείρωσης  $F_0$  να είναι τουλάχιστον 3 λεπτά σε θερμοκρασία αναφοράς 121,1 °C και για τιμή Z (θερμοκρασία που προκαλεί δεκαπλασιασμό της τιμής D) ίση με 10 °C όπως στις περισσότερες κονσερβοποιημένες τροφές. Το χρονικό διάστημα  $F_0$  αντιπροσωπεύει τον ελάχιστο χρόνο θερμικής επεξεργασίας που απαιτείται για την ελάττωση του πληθυσμού των σπορίων του *C. botulinum* κατά 12 λογαριθμικούς κύκλους (12D). Για κατώτερες τιμές pH τα κονσερβοποιημένα τρόφιμα ταξινομούνται σε όξινα και επαρκώς παστεριωμένα τρόφιμα. Επίσης για την αδρανοποίηση του *C. Botulinum* απαιτείται θερμοκρασία παστερίωσης στους 93,3 °C (τιμή z *C. Botulinum* 8,89 °C). Κατά την παστερίωση τα σπόρια δεν καταστρέφονται πλήρως, όμως σε συνδιασμό με την δημιουργία όξινων συθηκών επιτυγχάνεται η αδρανοποίησή τους και κατά συνέπεια αδυνατούν να βλαστίσουν και να αναπτυχθούν. Τα κονσερβοποιημένα τρόφιμα με pH 3,8 ανήκουν σε άλλη κατηγορία στην οποία η χλωρίδα που παρουσιάζεται είναι αρκετά ανθεκτική σε όξινες συνθήκες καταφέροντας να βλαστάνουν και να αναπτύσσονται. Για τιμές pH μικρότερες του 3,8 δηλαδή, σε αρκετά όξινες συνθήκες μόνο τα οξύφιλα σπόρια μπορούν να προκαλέσουν μόλυνση.

### 2.3.1 Όξινα κονσερβοποιημένα τρόφιμα

Οι χυμοί φρούτων και τα συμπυκνώματα ανήκουν στις έντονα όξινες κονσερβοποιημένες τροφές. Αυτός ο τύπος τροφίμων έχει συνήθως τιμές pH που κυμαίνονται από 3,5 και σε στην περίπτωση φρούτων όπως το φραγκοστάφυλο φτάνει έως 2,5. Ο μικροοργανισμός που μπορεί να αναπτύξει σπόρια σε τόσο όξινες συνθήκες είναι ο οξίφιλος *Alicyclobacillus*. Το γένος αυτό ανιχνεύθηκε από τους Wisotzkey κ.α. το 1992 και ταυτίστηκε με τις αλλοιώσεις που παρατηρούνται στα όξινα κονσερβοποιημένα τρόφιμα. Αργότερα εντοπίστηκε ο *Alicyclobacillus* spp. και συσχετίστηκε με την αλλοίωση του όξινου κονσερβοποιημένου χυμού και των συμπυκνωμάτων. Ακόμη και μερικά στελέχη του *Alicyclobacillus* έχουν μεγάλη ικανότητα μόλυνσης επειδή παράγουν μεγάλες ποσότητες γουαϊακόλης η οποία ακόμη και σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση (2 ppb) επηρεάζει σημαντικά την οσμή του τροφίμου.

Μια έρευνα που έγινε σε χαλασμένο χυμό μήλου με σκοπό τον εντοπισμό του μικροοργανισμού που προξένησε την αλλοίωση, εμφάνισε ότι το 35% του χαλασμένου χυμού είχε προσβληθεί από το γένος *Alicyclobacillus*, ωστόσο οι ερευνητές εντόπισαν μια εποχική παραλλαγή στην αλλοίωση του χυμού, με αιχμή κατά την διάρκεια των εποχών της άνοιξη και του καλοκαιριού. Σε χυμό πορτοκαλιού, 11 από τα 75 δείγματα μολύνθηκαν από το ίδιο γένος. Σε άλλες παρόμοιες μελέτες, το 6,1% των συμπυκνωμάτων από τροπικά φρούτα περιείχαν *Alicyclobacillus*, το 81% *Alicyclobacillus acidoterrestris* και το 19% *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Το είδος *A. Acidoterrestris* βρέθηκε σε μεγαλύτερες ποσότητες από ότι το *A. Acidocaldarius* σε συμπυκνώματα φρούτων που είχαν υποστεί πλύση με νερό με σκοπό την απομάκρυνση χρώματος.

### 2.3.2 Μετρίως όξινα κονσερβοποιημένα τρόφιμα

Σε τροφές με τιμή pH μεταξύ των τιμών 3,8 και 4,5 δεν υπάρχουν αρκετά είδη μικροοργανισμών που μπορούν να προκαλέσουν μόλυνση. Τέτοια τρόφιμα συνήθως περιλαμβάνουν κονσερβοποιημένα φρούτα, όπως ροδάκινα ή αχλάδια σε σιρόπι και ντομάτες. Ωστόσο σε αυτόν τον τύπο προϊόντων παλαιότερα ερευνητές όπως ο Townsend (1939) απομόνωσε το είδος *Clostridium pasteurianum* ή ο Deligaris κ.α. (1996) που απομόνωσε διαφορετικά είδη κλωστρίδιων από το νερό που χρησιμοποιούταν σε γραμμή παραγωγής κονσερβοποιημένου ροδάκινου. Αν και τα είδη *C. Sporogenes* και *C. beijerinckii* έχουν ταυτοποιηθεί σε αυτά τα προϊόντα, το 84% αυτών είχε μολυνθεί μόνο από το *C. Beijerinckii*. Η μόλυνση των ειδών *C. Pasteurianum* αποτελεί τον μεγαλύτερο κίνδυνο διότι έχουν την ιδιότητα να αναπτύσσονται σε τιμές pH 3,8 - 3,9. Η ιδιότητα αυτή επιβεβαιώθηκε πρόσφατα από τους Bocchi και Previdi (2004) οι οποίοι απομόνωσαν τρία είδη κλωστρίδιων σε διάφορα κονσερβοποιημένα τρόφιμα όπως, το *C. pasteurianum* (από ροδάκινα και αχλάδια), το *C. tyrobutyricum* από ντομάτες και το *C. Beijerinckii* από οξινισμένα μανιτάρια. Ωστόσο, μόνο το *C. pasteurianum* έδειξε την ικανότητα βλάστησης σε τιμές pH κάτω από 4,2. Η χαμηλότερη τιμή pH που παρατηρήθηκε από αυτήν την ομάδα ήταν 3,5 σε πουρέ ροδάκινου καθώς και σε χυμό πορτοκαλιού και μήλου. Παράλληλα με βάση τα αποτελέσματα από μελέτες που ασχολούνται με το περιβάλλον παραγωγής τέτοιου τύπου προϊόντων, κρίνεται επιτακτική η ανάγκη να ληφθεί υπόψη η παρουσία του *C. pasteurianum* σε κονσερβες τροφίμων με pH μεταξύ 3,7 και 4,2. Ερευνητές έχουν εντοπίσει στελέχη του *C. pasteurianum* σε ισχυρά όξινα διαλύματα και συγκεκριμένα οι Everis και Betts (2001) εντόπισαν στα προϊόντα χαμηλής οξύτητας με τιμή pH 4,3 περιορισμένη ανάπτυξη των γενών *Raenibacillus polymyxa* και *C. Tyrobutyricum*. Το είδος *Bacillus coagulans* έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε τιμές pH 4,2 – 4,3 και ανιχνεύεται κυρίως σε αλλοιωμένα κονσερβοποιημένα τρόφιμα μέτριας οξύτητας όπως παστεριωμένες ντομάτες ή «ρατατούιλ» (Γαλλική συνταγή λαχανικών). Στο παρελθόν διάφοροι επιστήμονες είχαν εντοπίσει γένη του *Bacillus* σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων δίνοντας τους ο καθένας την δική του ονομασία, π.χ

*Bacillus dextralacticus*, *Bacillus thermoacidificans* και *Lactobacillus cereale*. Σήμερα επικρατεί η ονομασία *Lactobacillus sporogenes* για το είδος *B. coagulans* το οποίο είναι γνωστό ως προβιοτικό στον τομέα των πρόσθετων συστατικών στα τρόφιμα. Τέλος το *B. Coagulans* δεν σχετίζεται με την αλλοίωση των κονσερβοποιημένων τροφίμων γιατί με την ρύθμιση του pH ή με θερμική επεξεργασία, αναστέλλεται πλήρως η δράση του.

### 2.2.3 Κονσερβοποιημένα τρόφιμα χαμηλής οξύτητας

Οι Pirone και La Pietra ανέλυσαν 1800 δείγματα αλλοιωμένων κονσερβοποιημένων τροφίμων την περίοδο 1991 έως το 2001 . Το 20% των περιπτώσεων που η αλλοίωση ήταν μικροβιακής φύσης οφειλόταν σε ανεπαρκής θερμική επεξεργασία. Τα μεσόφιλα είδη που ανιχνεύτηκαν περιορίστηκαν κυρίως στα γένη *Bacillus* και *Clostridium*. Κατά την επώαση των κονσερβών σε υψηλή θερμοκρασία, οι μικροοργανισμοί που προκαλούν συνήθως αλλοίωση είναι οι *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *G. Stearothermophilus* και περιστασιακά το *Desulfotomaculum nigrificans*. Σε μια δεκαετής μελέτη με επικεφαλή τον André κ.α. (Γαλλία 2013) παρατηρήθηκε ότι το 70% των βακτηρίων που είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση κονσερβοποιημένων μη σταθερών τροφίμων (μαγειρεμένα γεύματα, λαχανικά) μετά από επώαση στους 55 °C καταλαμβάνουν τα είδη *Moorella thermoacetica* (36%) και *G. stearothermophilus* (34%). Το *Moorella* είναι ένα αναερόβιο γένος που παράγει σπόρια και χαρακτηρίζεται από την ανθεκτικότητα του στη θερμότητα. Η ανάπτυξή του στις κονσέρβες τροφίμων προκαλεί οξίνιση και μερικές φορές πρήξιμο. Αυτό το γένος έχει επίσης ταυτοποιηθεί σε κονσέρβες «shiruko» και καφέ. Ο *G. stearothermophilus* έχει συσχετιστεί επίσης με την πρόκληση αλλοιώσεων σε κονσερβοποιημένα τρόφιμα σε αρκετές μελέτες από την δεκαετία του 1920. Σε ποσοστό 10% από μολυσμένα δείγματα που βρίσκονταν σε θερμοκρασία 55 °C, ανιχνεύτηκε το *Thermoanaerobacterium* και τα γένη του *Bacillus* με διαφορετικά είδη όπως (*T. thermosaccharolyticum*, *B. coagulans*, *B. smithii* και *B. licheniformis*). Τα υπόλοιπα γένη που βρέθηκαν αντιπροσώπευαν το 5% των δειγμάτων που αναλύθηκαν. Γένη όπως *Caldanaerobius*, *Gelria*, *Anoxybacillus*, *Raenibacillus*, *Thermoanaerobacter* και το Κλωστρίδιο δεν εντοπίστηκαν στις κονσέρβες ή στα τρόφιμα όπως ήταν αναμενόμενο. Αντίθετα σε άλλες μελέτες όπως αυτή της ερευνητικής ομάδας του Presland κ.α. (2004) εντοπίστηκε διαφορετική χλωρίδα μικροοργανισμών που προκάλεσαν αλλοίωση στις κονσέρβες με κύρια είδη τα *Geobacillus*, *Bacillus* και *Moorella*. Ο Dotzauer κ.α. (2002) αναγνώρισε σε κονσέρβες το *Thermoanaerobacterium* και το *Thermoanaerobacter*, χωρίς όμως να γίνει ταυτοποίηση του *Moorella*. Με βάση την νεότερη μελέτη που έγινε από τους André κ.α. (2013), αν και το *Desulfotomaculum* είχε συσχετιστεί από παλαιότερες μελέτες με την αλλοίωση κονσερβοποιημένων τροφίμων όπως τα «shiruko» και λαχανικών, σε αυτή την έρευνα δεν βρέθηκαν στελέχη του. Δεδομένου ότι για την σταθεροποίηση των κονσερβοποιημένων τροφίμων χρησιμοποιούνται αρκετά έντονες θερμικές επεξεργασίες, η πιο πιθανή μικροβιακή χλωρίδα που ευθύνεται για την αλλοίωση του συγκεκριμένου τύπου τροφίμων είναι τα



θερμόφιλα είδη. Στη βιομηχανία τροφίμων, το *M. thermoacetica* είναι το πιο θερμοανθεκτικό είδος, με τιμές D στους 121 °C για 30 λεπτά. Η τιμή D στους 121 °C για το *G. stearothermophilus* κυμαίνεται μεταξύ 1 έως 6 λεπτά.

Τα τελευταία πέντε χρόνια, οι ερευνητές έχουν αναπτύξει απλούστερες μεθόδους ανίχνευσης χρησιμοποιώντας PCR ή ακόμα πιο περίπλοκες όπως αυτές χρησιμοποιούν μικροσυστοιχίες *micro-arrays*. Παραδόξως, μέχρι στιγμής έχει ανιχνευτεί μόνο ένα πλήρες αλληλουχικό γονιδίωμα για τον *G.stearothermophilus*, παρά την ισχυρή αλλοιωγόνο δράση του και τον μεγάλο αριθμό των ερευνών που αναφέρονται σε αυτό (3671 αναφορές στο Pubmed). Δύο πρόσφατες μελέτες που διεξάχθηκαν σε γραμμές παραγωγής κονσερβοποιημένων πράσινων φασολιών και μπιζελιών χρησιμοποίησαν ως δείκτη το είδος *G. Stearothermophilus* και εντόπισαν ότι το στάδιο της λεύκανσης κατά την παραγωγική διαδικασία προκαλούσε αύξηση των σπορίων του. Επίσης λίγα δεδομένα είναι διαθέσιμα για την αλλοίωση κονσερβοποιημένων τροφίμων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή μετά από επώαση σε μεσόφιλες συνθήκες, καθώς τα αίτια μπορεί να ποικίλουν (π.χ. ανεπαρκής θερμική επεξεργασία ή επιμόλυνση μετά την θερμική επεξεργασία λόγω διαρροής της συσκευασίας). Σε μερικές μεμονωμένες μελέτες λαμβάνοντας υπόψη όλους τους τύπους αλλοίωσης, ο Richardson (1972) διαπίστωσε ότι το 64% των μικροβιακών αλλοιώσεων προήλθε από την επιμόλυνση λόγω ελαττωματικών συσκευασιών. Σε κάθε άλλη περίπτωση η υποβάθμιση του προϊόντος οφειλόταν σε ανεπαρκή αποστείρωση. Ωστόσο, από το 1922, ο *C. botulinum*, αποτελεί μικροοργανισμό αναφοράς για πολλά κονσερβοποιημένα τρόφιμα με την 12 log CFU ανα ml (12D) ως ελάχιστη απαιτούμενη θερμική επεξεργασία. Ο κανόνας 12D αποτελεί διαδικασία ελέγχου για την αλλαντίαση και πρόκειται για μια διαδικασία που έχει επανειλημμένος αναλυθεί σε αρκετές μελέτες που αναφέρονται στην αναγέννηση των σπορίων. Τέλος υπάρχουν και οργανισμοί που έχουν αντοχή σε υψηλότερες θερμικές επεξεργασίες οι οποίες χρησιμοποιούνται ως αναφορές για τον προσδιορισμό και την αξιολόγηση της σταθερότητας των κονσερβοποιημένων τροφίμων.

### 3. Αρχιτεκτονική και μορφολογία των *Clostridium sporogenes* – στρατηγική σχηματισμού σπορίων σπορογόνων βακτηρίων.

Βακτήρια όπως αυτά που προκαλούν νόσους όπως η αλλαντίαση και την νόσο του άνθρακα επιβιώνουν σε δυσμενής συνθήκες μετατρέποντας τα στελέχη τους σε ανθεκτικές δομές που ονομάζονται σπόρια. Τα σπόρια αποτελούνται από προστατευτικά πρωτεϊνούχα στρώματα που βοηθούν στην προσκόλληση και την στοχοθέτηση τους. Οι δομές που παρέχουν στα διάφορα είδη κοινές ιδιότητες προσαρμογής είναι σε μεγάλο βαθμό αμετάβλητες και οι εμπλεκόμενες πρωτεΐνες που βρίσκονται σε διαφορετική διάταξη ανάλογα με το είδος του βακτηρίου. Η βασικότερη πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην διαμόρφωση των ανθεκτικών στελεχών έχει βρεθεί ότι είναι η *CsxA*, πλούσια σε κυστεΐνη με βασικό χαρακτηριστικό της να αυτοσυναρμολογείται με την μορφή δισδιάστατου πλέγματος που περιβάλλει τα σπορία διαφόρων ειδών όπως των

κλωστρίδιων. Ακόμη και πρωτεΐνες που δεν είναι πλούσιες σε κυστεΐνη μπορούν να αυτοσυναρμολογήσουν εξαιρετικά παρόμοιες προστατευτικές στιβάδες και να υιοθετήσουν παρόμοια στρατηγική σχηματισμού ανθεκτικών δομών.

Τα σπόρια που σχηματίζονται από βακτήρια των γενών *Clostridium* και *Bacillus* παρέχουν μοναδικά και αποτελεσματικά μέσα επιβίωσης σε συνθήκες περιβαλλοντικού στρες. Επίσης αποτελούν τον μολυσματικό παράγοντα σε παθογόνα όπως ο *Bacillus Anthracis*, ο *Clostridium botulinum* και το *Clostridium difficile*. Τα αναερόβια κλωστρίδια είναι κατάλληλα για να επιβιώσουν παρουσία ατμοσφαιρικού αέρα. Παρά την αρχή της εξελικτικής απόκλισης των γενών *Clostridium* και *Bacillus*, ορισμένα από τα γονίδια τους καθίστανται υπεύθυνα για την ρύθμιση και τη μορφογένεση κατά την σπορίωση. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την σύνθεση των εξωτερικών στρωμάτων των σπορίων διατηρούνται πολύ λιγότερο. Τα στρώματα αυτά περιλαμβάνουν ένα σύνθετο φιλμ πρωτεΐνης και σε ορισμένα είδη, όπως τα παθογόνα *B. anthracis* και *C. botulinum* έχει παρατηρηθεί ένα διακριτό και ασυνήθιστα παραμορφώσιμο εξωσπόριο που περιβάλλει το σπόριο. Επιπλέον τα εξωτερικά στρώματα πρωτεΐνης προσδίδουν μεγάλη αντοχή στη χημική και ενζυμική προσβολή των σπορίων. Ο γενετικός έλεγχος και ο ρόλος των βασικών μορφογενετικών πρωτεϊνών στο πλέγμα της εξωτερικής στιβάδας των σπορίων μελετάται πιο εύκολα στο *B. subtilis* σε αντίθεση με άλλα είδη και ιδιαίτερα στο γένος Κλωστρίδιων.

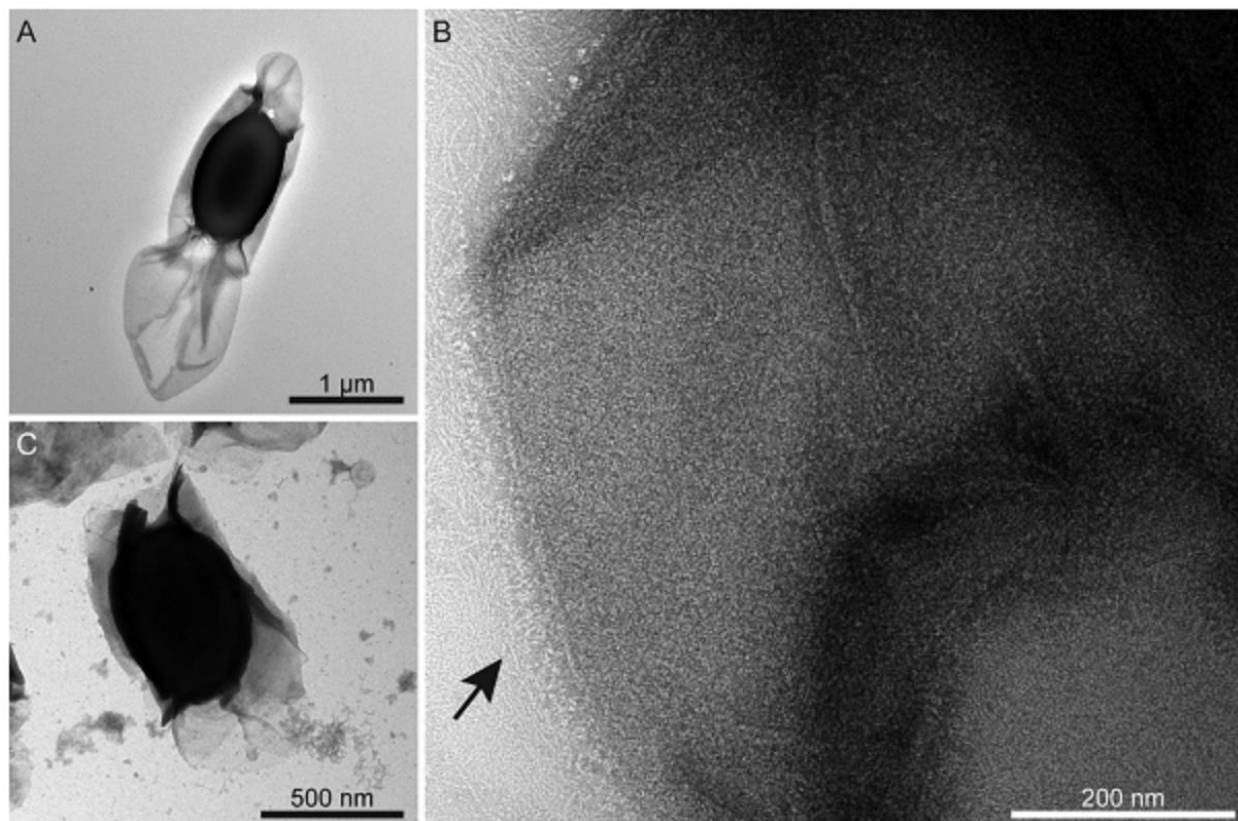
Το εξωσπόριο καθορίζει τη διεπαφή μεταξύ του σπορίου και του περιβάλλοντός του. Όταν το σπόριο δρα ως μολυσματικός παράγοντας, είναι το πρώτο σημείο επαφής μεταξύ του σπορίου και του υποστρώματος στο οποίο θα εκβλαστήσει. Έχει βρεθεί ότι το *B. anthracis*, παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της βλάστησης των σπορίων καθώς και στην προστασία αλλά και την αναστολή του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι φυσικές και δομικές ιδιότητες του εξωσπορίου μελετήθηκαν εκτενώς στην ομάδα των σπορίων *B. Cereus* – *B. anthracis*, όπου παρατηρήθηκε ένα λεπτό, συνεχές και εξαγωνικά κρυσταλλικό πρωτεϊνούχο στρώμα (γνωστό ως βασικό στρώμα) του οποίου το πλέγμα σχηματίζεται από πλούσιες σε κυστεΐνη πρωτεΐνες ExsY και CotY. Επίσης στην εξωτερική του επιφάνεια διαθέτει ένα "τριχώδες στρώμα" που αποτελείται από BclA, το οποίο διαθέτει ένα εσωτερικό κολλαγόνο με επαναλήψιμη δομή (CLR) που σχετίζεται με το βασικό στρώμα μέσω των Πρωτεϊνών ExsFA / BxpB.

Για το γένος των κλωστρίδιων δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως οι αντίστοιχες ιδιότητες του, με εξαίρεση το είδος *Clostridium difficile*, στο οποίο έχουν εντοπιστεί πολλές πρωτεΐνες που σχετίζονται με την επικάλυψη των σπορίων και την συναρμολόγηση του εξωσπορίου. Αντίστοιχα η δομή αλλά και η θέση του εξωσπορίου του γένους *Clostridium botulinum* δεν έχει γίνει κατανοητή από τους ερευνητές μέχρι σήμερα. Ωστόσο κρίνεται απαραίτητη η διεξαγωγή νέων μελετών στο γένος *Clostridium botulinum* διότι η τοξίνη που παράγει, είναι υπεύθυνη για την πρόκληση επικίνδυνων νοσημάτων όπως η αλλαντίαση και η νευροπαραλυτική νόσο που επηρεάζει τον άνθρωπο και άλλα θηλαστικά πουλιά. Μεταξύ της ομάδας των εξαιρετικά παθογόνων προτεολυτικών στελεχών *C. Botulinum*, το γένος *Clostridium sporogenes* δεν αποτελεί παθογόνο, γεγονός που το καθιστά χρήσιμο ως πειραματικό υποκατάστατο. Κατά

συνέπεια το *C. sporogenes* έχει θεωρηθεί από τους μελετητές ως ένας εύκολος στόχος για την ανίχνευση της δομής και της λειτουργίας των σπορίων του γένους κλωστρίδιων. Η μορφολογία του εξωσπόριου του *C. Sporogenes* μοιάζει αρκετά με το εξωσπόριο του *B. Cereus* και έχει βρεθεί ότι αποτελείται από μια εξαγωνικά συμμετρική κυσταλλική βασική στιβάδα, η οποία περιβάλλεται από ένα τριχώδες στρώμα. Ωστόσο δεν γνωρίζουμε λεπτομέρειες για την μοριακή αρχιτεκτονική του εξωσπόριου. Οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το εξωσπόριο του *C. sporogenes* περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων, μια πρωτεΐνη πλούσια σε κυστεΐνη ειδική για το κλωστρίδιο (*CsxA*), η οποία εντοπίστηκε σε υψηλού μοριακού βάρους υλικό, μαζί με μια πρωτεΐνη τύπου *BclA* που πιθανών να σχετίζεται με το τριχώδες στρώμα κατ' αντιστοιχία με το *B. Cereus*.

Με την χρήση σύγχρονων μεθόδων όπως η κυσταλλογραφία ηλεκτρονίων και μικροσκοπίων ατομική δύναμης (AFM) έχουμε καταφέρει να προσδιορίσουμε την τρισδιάστατη (3D) μορφή ενός εξωσπορίου του γένους *Clostridium*. Η πρωτότυπη πρωτεΐνη *CsxA* πλούσια σε κυστεΐνη έχει αναγνωριστεί ως το βασικότερο δομικό συστατικό της βασικής στιβάδας σειράς. Σαν αποτέλεσμα έχουμε την πρώτη λεπτομερή εικόνα των σπορίων στελεχών του *C. Botulinum* της ομάδας I και κωδικοποιούνται ως *CsxA* και παρέχει πληροφορίες για μελλοντική έρευνα σπορίων του γένους *Clostridium*. Το ανασυνδυασμένο *CsxA* μπορεί να αυτοσυναρμολογηθεί σε κρυσταλλικές συστοιχίες πανομοιότυπες με αυτές της δομής του εξωσπόριου. Έτσι, οι μη επεξεργασμένες πρωτεΐνες πλούσιες σε κυστεΐνη από διαφορετικά είδη που σχηματίζουν σπόρια μπορούν να συναρμολογηθούν και να σχηματίζουν εξαιρετικά παρόμοιες δομές στιβάδων. Τέλος έχει διευκρινιστεί ότι οι πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα γονιδιώματα ενός ευρύτερου φάσματος σχηματισμού σπορίων, είναι πλούσιες σε κυστεΐνη και μπορούν να υιοθετήσουν παρόμοια στρατηγική μοριακών πλακιδίων για τη δημιουργία δομών σπορίων.

*Δομή σπορίου του γένους Clostridium*

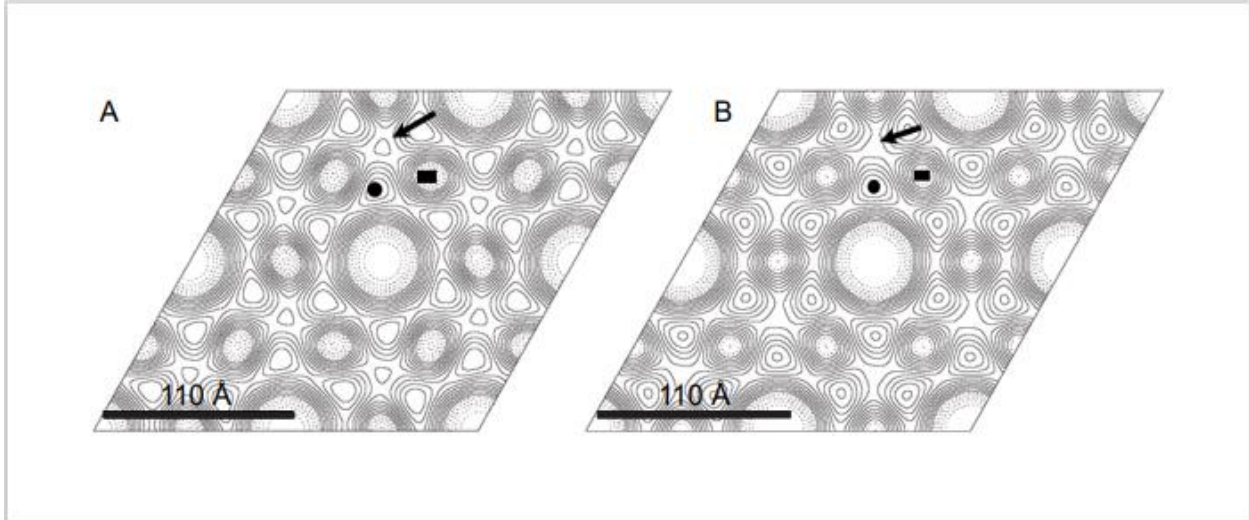


**Εικόνα 1** Το σπόριο του *C. sporogenes* περιβάλλεται από ένα εξωσπόριο κρυσταλλικής δομής. Στην εικόνα (A) απεικονίζεται η ηλεκτρονική μικρογραφία μετάδοσης ενός αρνητικά χρωματισμένου σπορίου με μωρμηκικό ουρανύλιο. Το λεπτό στρώμα του εξωσπορίου φαίνεται να περιβάλλει τον πυκνό πυρήνα του σπορίου και συχνά εκτείνεται προς έναν πόλο. Η εικόνα (B) είναι μια εικόνα μεγάλης μεγέθυνσης στην οποία απεικονίζεται μια περιοχή του εξωσπορίου και γίνεται αντιληπτό το «τριχώδες στρώμα» από το οποίο περιβάλλεται (βέλος). Τέλος στην εικόνα (Γ) παρατηρούμε ένα μεταλλαγμένο σπόριο του οποίου ο πυρήνας είναι τυλιγμένος από σπασμένα φύλλα υλικού CsxΑ που έχουν υποστεί αφαίρεση στην πάνω αριστερή γωνία της εικόνας.

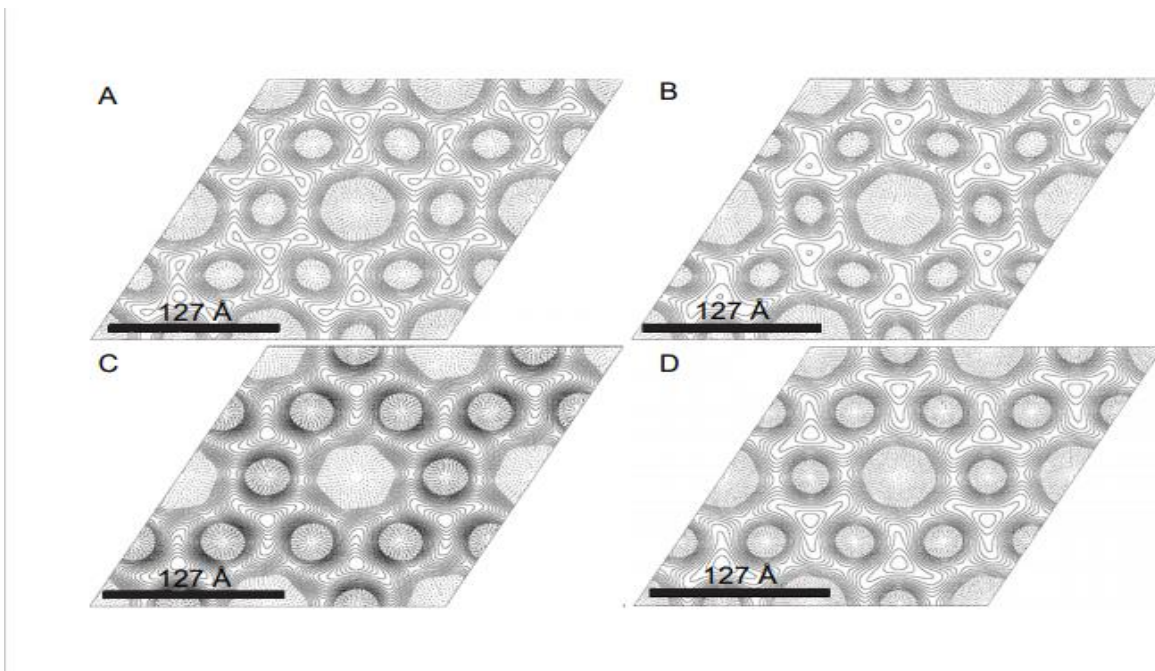
### 3.1 Σχηματισμός εξωσπορίου του *C. sporogenes* και άλλων Κλωστρίδιων

Το εξωσπόριο του *C. sporogenes* και άλλων κλωστρίδιων σχηματίζεται από ένα εξαγωνικά συμμετρικό δισδιάστατο πλέγμα που περιβάλλει το σπόριο. Μέσω της ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας (EM) έχει προσδιοριστεί ότι το εξωσπόριο που περιβάλλει τον πυρήνα των σπορίων διαθέτει πυκνό φορτίο ηλεκτρονίων προσανατολισμένο προς έναν πόλο που εμφανίζεται στην εικόνα 1A. Στις άλλες ηλεκτρονιακές περιοχές, το εξωσπόριο εμφανίζεται ως ένα λεπτό δισδιάστατο κρυσταλλικό στρώμα, που σχετίζεται κυρίως με το τριχώδες στρώμα καθώς και με άλλες υποφύσεις που παρατηρούμε στην εικόνα 1B. Το πλάτος και οι φάσεις μετασχηματισμού Fourier έχουν υπολογιστεί κατά μέσο όρο από πέντε εικόνες υψηλής μεγέθυνσης του αρνητικά χρωματισμένου εξωσπορίου. Οι παράμετροι μονάδας κυψελίδας είναι  $a = b = 110 \pm 5 \text{ \AA}$  και  $\gamma = 120 \pm 3^\circ$  και οι φάσεις έχουν συμμετρία  $\rho 6$ . Ο χάρτης προβολής (βλ. Εικ. S1A) αποκαλύπτει έναν πυκνό χρωματισμένο πυρήνα που περιβάλλεται από δακτύλιο 6 κηλίδων χωρίς τις πυκνότητες (μαύρο κύκλο), και είναι χρωματισμένος με σκούρα απόχρωση

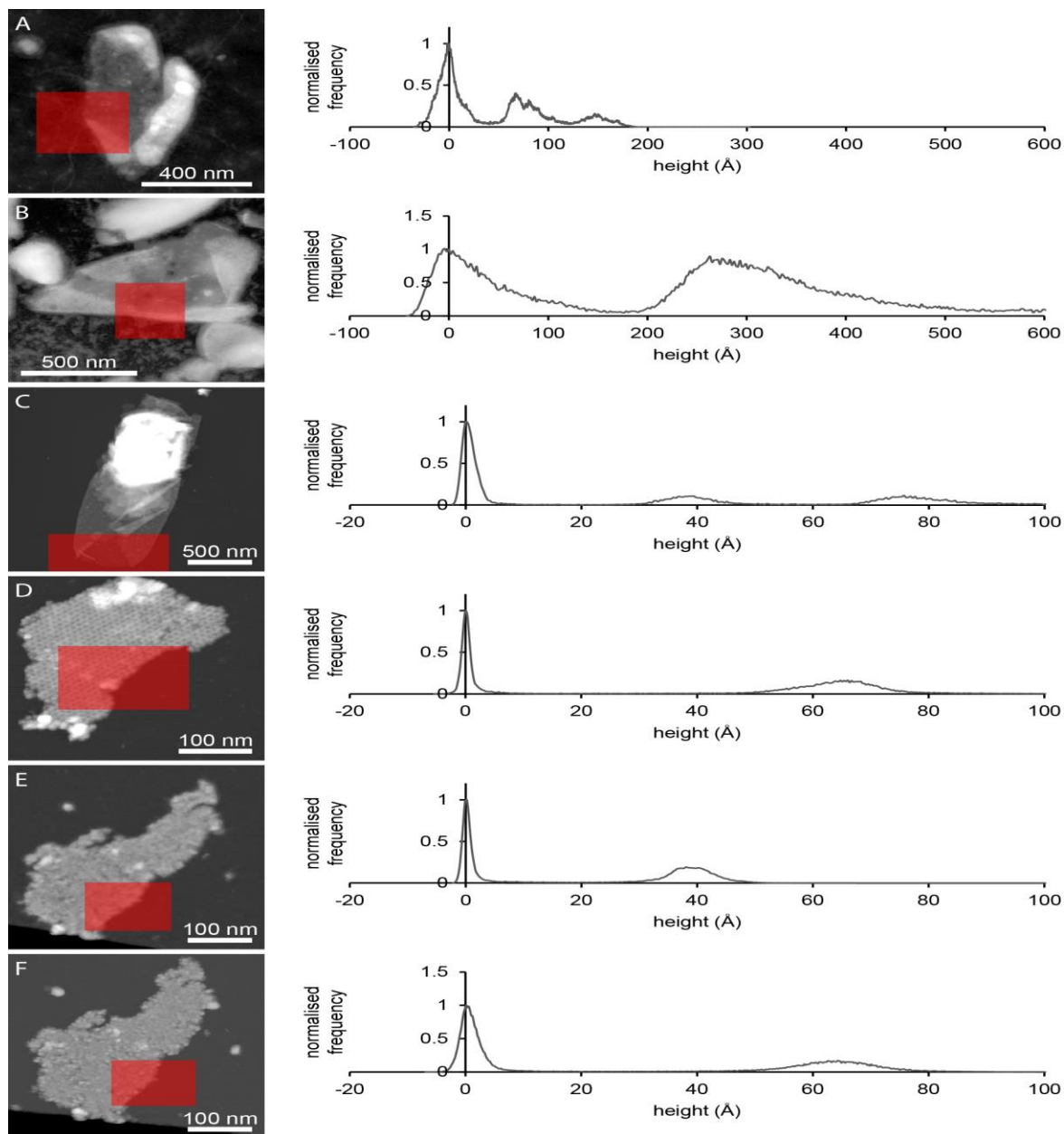
(μαύρο ορθογώνιο). Κάθε δακτύλιος συνδέεται με δύο γειτονικούς δακτύλιους μέσω ενός τριμερικού συνδετήρα (βλ. Εικ. S1A βέλος). Επίσης έχουν προσδιοριστεί οι χάρτες προβολής από τα εξωσπόρια των *C. acetobutylicum*, *C. tyrobutyricum*, *C. runiceum* και *C. pasturianum* (Εικ. S2) και μοιάζουν ιδιαίτερα με την κατανομή πυκνότητας του *C. sporogenes* (Εικ. S1A).



**Εικόνα S1** Χάρτες προβολής εξωσπορίων του γένους *C. sporogenes* και ανασυνδυασμένων κρυστάλλων CsxA με εξαγωνική συμμετρία. (A) Χάρτης προβολής αρνητικά χρωματισμένου εξωσπορίου *C. Sporogenes* με ανάλυση 20-Å. Τα συμπαγή περιγράμματα αντιπροσωπεύουν περιοχές πυκνότητας χωρίς λεκέ που αντιστοιχούν σε περιοχές υψηλότερης πυκνότητας πρωτεΐνης. (B) Χάρτης προβολής αρνητικά χρωματισμένου κρυστάλλου CsxA με ανάλυση ~20-Å. Ο μαύρος κύκλος υποδηλώνει πυκνότητα χωρίς χρώμα και το μαύρο ορθογώνιο υποδεικνύει έναν περιφερειακό πόρο ενώ το βέλος δείχνει έναν τριπλό σύνδεσμο. Copyright © 2020 Janganan et al.

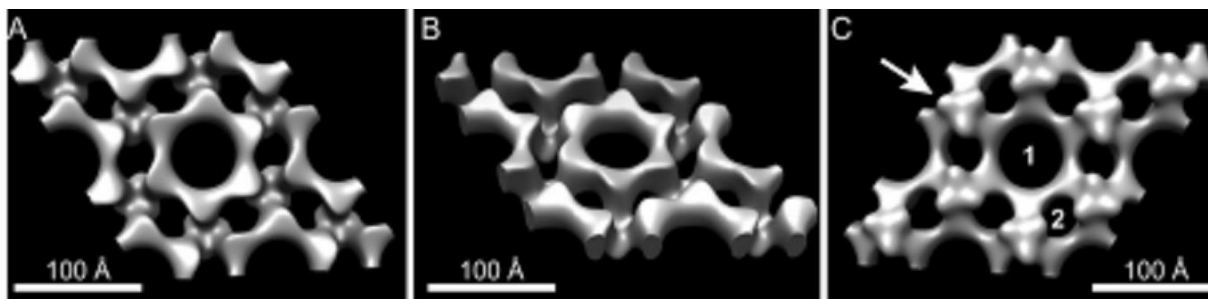


**Εικόνα S2** Χάρτης προβολής του εξωσπόριου τεσσάρων ειδών του γένους *Clostridium* με παρόμοια δομή με αυτήν του *C. sporogenes*. Για λεπτομέρειες, ανατρέξτε στην εικόνα S1. (A) *C. acetobutylicum* NCIB 8052. (B) *C. tyrobutyricum* NCDO 1756. (C) *C. puniceum*. (Δ) *C. pasteurianum* NCDO 1845. Copyright © 2020 Janganan et al.



**Εικόνα S3** AFM μετρήσεις πάχους κρυστάλλων εξωσπόριου και CsxA σε αέρα και υγρό. (Αριστερή στήλη) Εικόνες ύψους με κόκκινη σκιά που υποδηλώνουν τις υπο ανάλυση επιλεγμένες περιοχές για ανάλυση. (Δεξιά στήλη) Διαγράμματα ύψους που υπολογίζονται για τις κόκκινες σκιασμένες περιοχές. Τα διαγράμματα έχουν μετατοπιστεί κατά μήκος του άξονα ψ έτσι ώστε η τιμή τροχιάς της κορυφής που αντιστοιχεί στο υπόστρωμα υποβάθρου να είναι το μηδενικό ύψος. (A) Εγγενής εξωσπόριο στον αέρα (κλίμακα του γκρι 32,5 nm). (B) Εγγενές εξώσπορο στο νερό (κλίμακα του γκρι 177 nm). (C) κρύσταλλος CsxA (εσωτερική πλευρά προς τα πάνω) στον αέρα (κλίμακα του γκρι 60 nm). (D) Κρυστάλλος CsxA (εσωτερική πλευρά προς τα πάνω) σε νερό (κλίμακα του γκρι 15,6 nm). (E) κρύσταλλος CsxA (εξωτερική πλευρά προς τα πάνω) στον αέρα (κλίμακα του γκρι 11 nm). (F) CsxA κρύσταλλος (εξωτερική πλευρά προς τα πάνω) σε νερό (κλίμακα του γκρι 21,8 nm). Copyright © 2020 Janganan et al.

Η τρισδιάστατη (3D) αναδιαμόρφωση του εξωσπορίου του *Clostridium sporogenes* αποκαλύπτει την εμφάνιση ενός ημιδιαπερατού πλέγματος πρωτεϊνών. Συνολικά 61 εικόνες αρνητικά χρωματισμένες απεικονίζουν το εξωσπόριο από άθικτα σπόρια που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία δέκα ξεχωριστών σειρών κλίσης 55 °. (Τα στατιστικά στοιχεία 3D δίνονται στον Πίνακα S1). Στην εικόνα 2, η βασική επαναλαμβανόμενη μονάδα εμφανίζεται με την μορφή “γρاناζιού” και με δπλάσια συμμετρία συνδέεται με παρακείμενους δακτυλίους μέσω μιας μικρής τριπλής συμμετρικής γέφυρας (βέλος Εικ. 2C). Η εσωτερική διάμετρος του δακτυλίου είναι 55 Å. Η εξωτερική διάμετρος του δακτυλίου στο ευρύτερο σημείο του είναι περίπου 85 Å και το βάθος του 30 Å, παρόμοιο με το πάχος του βασικού στρώματος που καθορίζεται από την μέθοδο AFM (βλέπε παρακάτω). Εξίσου ενδιαφέρον έχει η εμφάνιση δευτερευόντων πόρων (με την ένδειξη “1” και “2” αντίστοιχα στο σχήμα 2C), οι οποίοι διαπερνούν πλήρως το στρώμα. Τέλος η πυκνότητα που αποκαλύφθηκε σε αυτήν την αναδόμηση προκύπτει μόνο από δομές που έχουν κρυσταλλική τάξη και τυχόν αλλοιωμένα χαρακτηριστικά, όπως επιφανειακές υποφύσεις (δεν εμφανίζονται στην εικόνα).



**Εικόνα 2** Απεικόνιση τρισδιάστατης αναδόμησης του εξωσπορίου η οποία αποκαλύπτει ένα εξαγωνικό μονοστρωματικό πλέγμα πρωτεϊνης που αποτελείται από διαπερατούς πόρους. Η κάτοψη της επιφάνειας του επίπεδου στρώματος του εξωσπορίου αποδίδεται έτσι ώστε να περικλείει έναν όγκο που ταιριάζει περίπου με αυτόν που φαίνεται στο Σχ. 5A. (A και C). Στην εικόνα (B) προβάλλεται η επιφάνεια του εξωσπορίου στραμμένη κατά 40 ° ως προς το επίπεδο. Επίσης το βέλος στην εικόνα (C) την τριπλή σύνδεση του εξαγωνικού στρώματος. Οι αριθμοί 1 και 2 υποδηλώνουν τους κεντρικούς και τους περιφερειακούς πόρους αντίστοιχα. Τέλος η επιφάνεια που εμφανίζεται στην εικόνα (A) αντιστοιχεί στην πιθανή ύπαρξη εξωτερικής επιφάνειας του εξωσπορίου σε ανάλυση 25 Å.

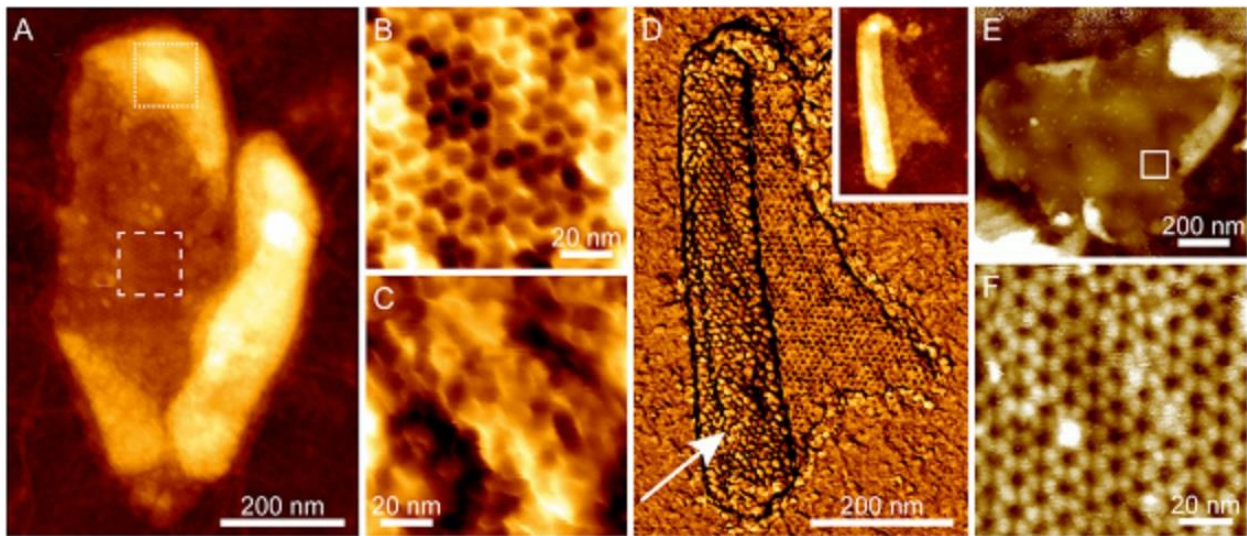
### 3.2 Αποκάλυψη της εσωτερικής και εξωτερικής όψης του εξωσπορίου με μικροσκόπιο ατομικής δύναμης (AFM).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η επιφάνεια του εξωσπορίου του *C. Sporogenes* καλύπτεται σε μεγάλο βαθμό από ένα τριχώδες στρώμα (Εικ 1B), διαθέτοντας διάφορους τύπους υποφύσεων. Για τον προσδιορισμό της εξωτερικής όψης (Εικ. 2) στην οποία προσκολλάτε το τριχώδες στρώμα, χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο AFM με σκοπό την απεικόνιση των απέναντι επιφανειών του εξωσπορίου. Στην εικόνα 3A απεικονίζονται θραύσματα εξωσπορίου με πάχος 70 Å και 140 Å, (βλέπε επίσης Εικ. S3A) τα οποία αντιστοιχούν σε μεμονωμένα στρώματα και σε

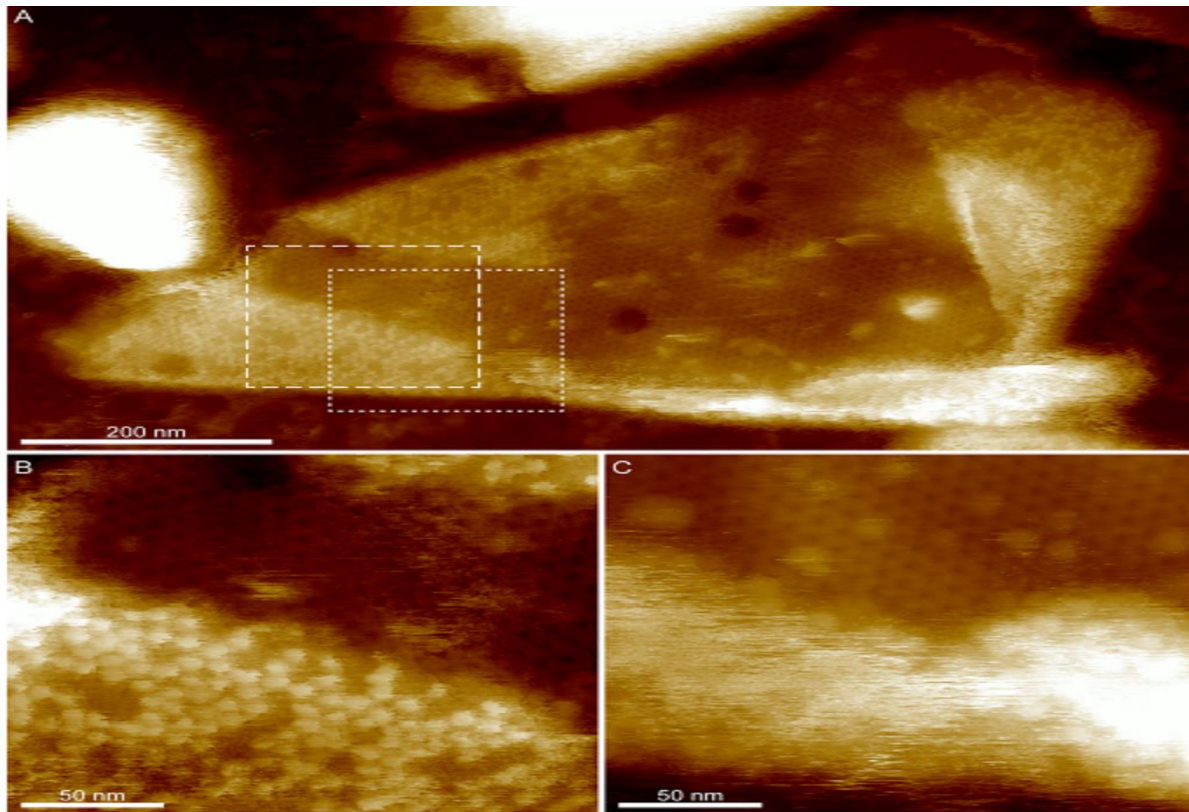


διπλά αναδιπλωμένα στρώματα εξωσπορίων. Επίσης μελετήθηκαν οι συνθήκες σύνδεσης μεταξύ θραυσμάτων του εξωσπορίου και προσδιορίστηκε ότι σε pH 4 η πλειονότητα των θραυσμάτων παρουσιάζουν εξαγωνική δομή πλέγματος που μοιάζει με κηρήθρα με μοναδιαίους άξονες 105 Å (αναφέρεται ως «κυψελωτό πλέγμα») (Εικ. 3B). Τα μεμονωμένα στρώματα εξωσπορίου φαίνεται να συνδέονται με την πλευρά του τριχώδους στρώματος προσανατολισμένη προς τα κάτω, και την εσωτερική επιφάνεια του βασικού στρώματος εκτεθειμένη στο άκρο απεικόνισης. Τέλος μερικά θραύσματα φάνηκε να έχουν διπλωμένες περιοχές (πάχους 2 στρωμάτων) με αλλοιωμένη επιφάνεια (Εικ. 3C). Ωστόσο περιστασιακά εμφανίστηκαν εξαγωνικές δομές με πλέγμα  $a = b = 98 \pm 5 \text{ \AA}$  (Εικ. 3D, λευκό βέλος). Αυτές οι περιοχές αντιπροσωπεύουν την εξωτερική επιφάνεια του εξωσπορίου, με την κρυσταλλική δομή του βασικού στρώματος να καλύπτεται σε μεγάλο βαθμό από τριχώδης επιφάνεια.

### Δομή σπόριου γένους Clostridium



**Εικόνα 3** Η μικροσκόπηση ατομικής δύναμης έχει αποκαλύψει εσωτερικές και εξωτερικές επιφάνειες του εξωσπορίου. Στην εικόνα (A) απεικονίζεται ένα τεμάχιο εξωσπορίου στον αέρα. Η κεντρική περιοχή αποτελείται από μονό στρώμα πάχους (περίπου 70 Å). Οι φωτεινότερες περιφερειακές περιοχές (πάνω τμήμα της εικόνας) έχουν περίπου το διπλάσιο πάχος από την κεντρική περιοχή, υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για τα πτυσσόμενα περύγια του εξωσπορίου των οποίων οι αντίθετη επιφάνεια είναι εκτεθειμένη στο άκρο της απεικόνισης σε κλίμακα χρώματος, 40 nm. Στην εικόνα (B) εμφανίζεται σε υψηλότερη μεγέθυνση η περιοχή που συμβολίζεται με το διακεκομμένο κουτί στην εικόνα (A), και γίνεται ευκρινέστερο ένα εξαγωνικό πλέγμα κυψελωτού τύπου με μονάδα μέτρησης κυττάρων  $150 \pm 3 \text{ \AA}$ , και θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει την εσωτερική επιφάνεια του βασικού στρώματος. Κλίμακα χρώματος 3 nm. Στην εικόνα (C) προβάλλεται σε υψηλή μεγέθυνση η περιοχή που απεικονίζεται με διακεκομμένο κουτί στην εικόνα (A). Σε αυτή την περιοχή προβάλλεται μια παραμορφωμένη δομή που θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει το τριχώδες στρώμα που περιβάλλει το εξωσπόριο. Κλίμακα χρώματος 5 nm. Στην εικόνα (D) εμφανίζετε ένα διαφορετικό τμήμα του εξωσπορίου στον αέρα, που διαθέτει διπλωμένη δομή. Σε κλίμακα χρώματος 30 nm (κύρια εικόνα), εμφανίζεται το ίδιο πλέγμα με δομή κηρήθρας καθώς και ένα τμήμα εξαγωνικής δομής με παρόμοιο μέγεθος μονάδας κυψελίδας ( $98 \pm 5 \text{ \AA}$ ) στην περιοχή διπλής στρώσης. Κλίμακα χρώματος, 10 nm. Στην εικόνα (E) παρατηρούμε ένα τμήμα του εξωσπορίου που απεικονίζεται στο νερό. Η κεντρική περιοχή του έχει πάχος ενός στρώματος (περίπου 30 nm στο νερό, και αυτό οφείλεται στην διαστολή που υφίσταται το τριχώδες στρώμα). Επίσης γίνονται ορατές στις άκρες του στρώματος, κάποιες μικρές διπλωμένες περιοχές. Κλίμακα χρώματος 80 nm. Παράλληλα στην εικόνα (F) με υψηλότερη μεγέθυνση της περιοχής που εμφανίζεται στην εικόνα (E), γίνεται αντιληπτό ένα εξαγωνικό πλέγμα με μέτρηση μονάδας κυψελίδας  $104 \pm 3 \text{ \AA}$ , και η μέτρηση αφορά την εσωτερική επιφάνεια του βασικού στρώματος. Κλίμακα χρώματος, 6 nm.



**Εικόνα 4** Απεικόνιση ενυδατωμένου εξωσπορίου με χρήση AFM στην οποία αποκαλύπτεται το υποκείμενο κρυσταλλικό πλέγμα καθώς και μια αλλοιωμένη επιφάνεια. Στην εικόνα (A) παρατηρούμε τμήματα του εξωσπορίου με ελεύθερο πλάτος 2 nm και σχετικό σημείο ρύθμισης 50% (υψηλή δύναμη). Το πλέγμα με δομή κηρήθρας γίνεται ορατό ως στρώμα στο κεντρικό τμήμα του εξωσπορίου. Στην εικόνα (B) εμφανίζεται σε μεγέθυνση η περιοχή που βρίσκεται στο διακεκομμένο κουτί της εικόνας (A) σε συνθήκες υψηλής δύναμης. Το πλέγμα τύπου κηρήθρα είναι ορατό στο πάνω μισό της εικόνας ενώ, στο κάτω μισό της εικόνας είναι ορατό ένα πλέγμα στίξης στην αναδυσπλούμενη περιοχή. Η διαφορά ύψους μεταξύ του κάτω μισού και του άνω μισού της εικόνας είναι 75 έως 130 Å. Στην εικόνα (C) παρατηρούμε σε μεγέθυνση την περιοχή που εμφανίζεται στην εικόνα (B) από το διακεκομμένο κουτί της εικόνας (A) με χρήση χαμηλότερης δύναμης (ελεύθερο πλάτος 1 nm, σημείο ρύθμισης 90%). Το πλέγμα τύπου κηρήθρας παραμένει ορατό στο άνω μισό της εικόνας και στο κάτω μισό εμφανίζεται το διπλωμένο τμήμα του εξωσπορίου με σχετική αλλοίωση. Η διαφορά ύψους μεταξύ του κάτω και του άνω μισού είναι 200 έως 450 Å.

Επιπλέον με την χρήση της μεθόδου απεικόνισης στο νερό, βρέθηκαν στελέχη με δομή που μοιάζει με κηρήθρα, αντίστοιχη με αυτές που απεικονίστηκαν με άλλες μεθόδους που αναφέρθηκαν προηγουμένως με την μόνη διαφορά ότι εντοπίστηκαν έντονες προεξοχές στις τριπλές κορυφές κάθε εξαγώνου (Εικ. 3E και F). Το φαινομενικό πάχος του εξωσπορίου στην απεικόνιση με νερό κυμένεται περίπου από 200 έως 500 Å (Εικ. S3B). Η αύξηση του πάχους του ενυδατωμένου εξωσπορίου οφείλεται σε μεγάλο βαθμό από την διόγκωση του τριχώδους στρώματος το οποίο όταν ενυδατωθεί αυξάνεται κατά 5 έως 10 φορές, ενώ το βασικό στρώμα του εξωσπορίου αποκτά περίπου το διπλάσιο πάχος (Εικ. S3). Επίσης οι αλλοιωμένες περιοχές παρατηρήθηκαν με την μορφή διπλωμένων θαυσμάτων και με την ενυδάτωση εμφανίστηκε ένα δικτυωτό πλέγμα με διαστάσεις μονάδας κυψέλης παρόμοιες με εκείνες που παρατηρήθηκαν

στα ξηρά θραύσματα (Εικ. 4). Ωστόσο σε υψηλότερες δυνάμεις με την μέθοδο απεικόνισης AFM, θα ήταν εφικτό να απεικονιστούν με μεγαλύτερη λεπτομέρεια τα νημάτια του τριχώδους στρώματος που περιβάλλει το εξωσπόριο.

### 3.3 Τρισδιάστατη δομή της αυτοσυναρμολογημένης και ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης CsxA αντίστοιχη αυτής που υπάρχει στην φυσική συστοιχία του εξωσπορίου.

Η πρωτεΐνη CsxA βρίσκεται αποκλειστικά στο υλικό πολύ υψηλού μοριακού βάρους που εξάγεται από το εξωσπόριο του *C. sporogenes*, υποδηλώνοντας την συμβολή της στην δόμηση του βασικού στρώματος. Επιπλέον οι πρωτεΐνες των στελεχών της ομάδας *I. C. botulinum* είναι πολύ παρόμοιες, με τις ταυτότητες των αμινοξέων σε ποσοστό που κυμαίνονται από 77% (στέλεχος A3 Loch Maree) έως 100% (στέλεχος Prevot 594). Επομένως τα δεδομένα που γνωρίζουμε για την πρωτεΐνη ενδέχεται να ισχύουν ευρύτερα για όλη την ομάδα.

Two-sided plane group	Phase residual vs other spots (90° random)	No. of comparisons	Target residual based on statistics taking Friedel wt into account
$p2$	31.8*	57	37.5
$p3$	13.9*	82	25.7
$p312$	49.1	173	26.3
$p321$	40.0	178	26.6
$p6$	17.5*	221	28.7
$p622$	46.2	408	27.3

**Πίνακας S1** CsxA crystals adopt 6-fold symmetry. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν τα υπολείμματα εσωτερικής φάσης που προσδιορίζονται μετά την επιβολή όλων των πιθανών ομάδων επιπέδου δύο όψεων που υπολογίζονται από μία από τις μικρογραφίες κατεψυγμένων ενυδατωμένων κρυστάλλων CsxA. Τα υπολείμματα εσωτερικής φάσης προσδιορίστηκαν από σημεία της ανάλυσης IQ1 έως IQ5 έως 7-Å. Οι τιμές που σημειώνονται με αστερίσκο (\*) είναι καλοί υποψήφιοι για τη συμμετρία, καθώς το πειραματικό υπόλοιπο φάσης ήταν κοντά ή και καλύτερο από αυτό που αναμενόταν με βάση την αναλογία σήματος και θορύβου.

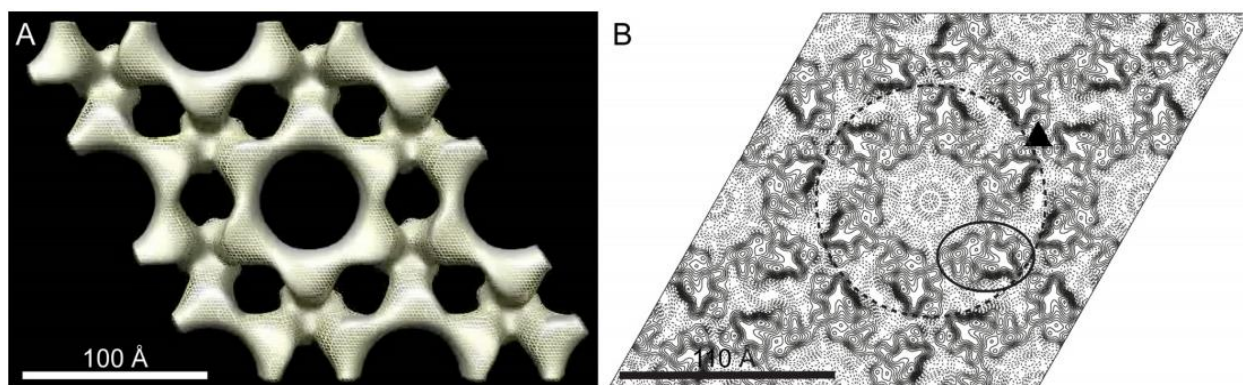
Επίσης έχει διαμορφοθεί ένας χάρτης προβολής αρνητικά χρωματισμένων κρυστάλλων CsxA με μέσο όρο 5 εικόνες (Εικ. S1B). Οι παράμετροι του κυττάρου μονάδας ( $a = b = 111 \pm 2 \text{ \AA}$  και  $\gamma = 120,3^\circ \pm 0,4^\circ$ , με  $p6$  συμμετρία προκύπτουν από κρυομικροσκοπήση ηλεκτρονίου [CryoEM] Πίνακας S1]) και η εικόνα της δομής είναι πανομοιότυπη με εκείνη του φυσικού εξωσπορίου (Εικ. S1). Επίσης λήφθηκαν 66 εικόνες από 11 σειρές κλίσης δυσδιάστατων (2D) κρυστάλλων CsxA με αρνητική χρώση και υπολογίστηκε μια 3D ανακατασκευή χρησιμοποιώντας τη μέθοδο που αναφέρθηκε για την ανάλυση του μητρικού εξωσπορίου (φαίνεται λεπτομερέστερα στην (Εικ. 5A). δείτε επίσης τον Πίνακα S1). Δεδομένου ότι οι δομές ταυτίζονται μεταξύ τους, επιβεβαιώνεται ότι το γονίδιο CsxA αποτελεί βασικό συστατικό για την δόμηση του πυρήνα της πρωτεΐνης του πλέγματος της βασικής στιβάδας του εξωσπορίου.

### 3.4 Ηλεκτρονική κρυοσκοπία (CryoEM) ανασυνδυασμένων κρυστάλλων CsxA (εμφάνιση δακτύλιου έξι υποομάδων πρωτεΐνης σε ανάλυση 9 – Å).

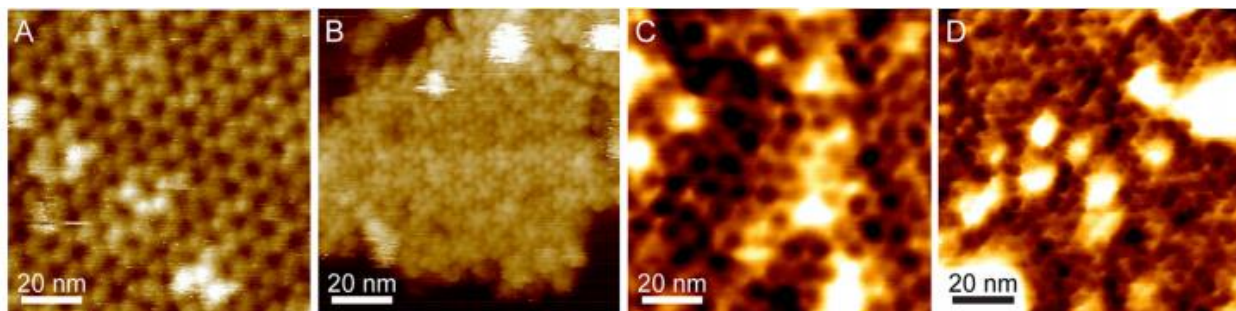
Οι κρύσταλλοι CsxA 2D ταξινομήθηκαν καλύτερα σε σχέση με τους κρυστάλλους που παρατηρήθηκαν σε φυσικό εξωσπόριο και ήταν πιο επιρρεπή σε ανάλυση υψηλότερου δυναμικού. Οι διαστάσεις μονάδας κυψελίδων σε υαλώδη πάγο ήταν  $b$  103-2 Å και 120-2°. Η ανάλυση των φάσεων Fourier υψηλής ανάλυσης έδειξε συμμετρία  $\rho_6$ , με αποτέλεσμα να γίνει ξεκάθαρα αντιληπτή η εξαμερής φύση του πλέγματος πρωτεΐνης (Πίνακας 1). Επίσης υπολογίστηκε ένας χάρτης προβολής από τα μέσα πλάτη και τις φάσεις από 14 εικόνες με την σημαντικότερη μέτρηση φάσης να είναι αυτή στην ανάλυση 9-Å (Πίνακας S2). Ο χάρτης προβολής (Εικ. 5B) αποκαλύπτει έναν 6-πλάσιο συμμετρικό δακτύλιο πρωτεϊνικής πυκνότητας με εξωτερική διάμετρο 115 Å. Ο δακτύλιος αυτός περικλείει έναν λιγότερο πυκνό πρωτεϊνικό πυρήνα που εμφανίζεται στο κέντρο της (Εικ. 5B). Περιγράφεται ως ένα περίβλημα μιας υπομονάδας και είναι αξιοσημείωτο ότι τα πλησιέστερα σημεία επαφής μεταξύ των υπομονάδων βρίσκονται εντός του εξαμερούς δακτυλίου και είναι κοντά στους τριπλούς άξονες συμμετρίας που συνδέουν τους δακτύλιους, κάτι που επιβεβαιώνεται και με την χαμηλότερη 3D ανάλυση κατασκευής (Εικ. 2).

Resolution shell (Å)	Number of independent reflections	Mean value of phase error against symmetry imposed phase of 0° or 180° (45° is expected for random phases)	Standard error (°)
200-15	25	11.0	4.0
15-12	14	31.9	6.9
12-10	13	25.3	4.4
10-9	18	25.9	5.9

**Πίνακας S2** Phase residuals in resolution shells for  $\rho_6$  averaged Fourier terms of frozen hydrated CsxA crystals



**Εικόνα 5** Η τρισδιάστατη δομή του ανασυνδυσμένου κρυστάλλου CsxA είναι συγκρίσιμη με αυτή του φυσικού εξωσφύρου. (A) Η πυκνότητα CsxA είναι μεγαλύτερη από αυτή του φυσικού εξωσφύρου. Οι επιφάνειες αποδίδονται σε ένα όριο πυκνότητας περίπου ισοδύναμο με αυτό που αναμένεται για ένα μονομερές 33-kDa. Το συμπαγές γκρι αντιπροσωπεύει το φυσικό εξωσώριο και το κίτρινο πλέγμα αντιπροσωπεύει το ανασυνδυσμένο CsxA. (B) Χάρτης προβολής υαλώδους κρυστάλλου CsxA με πάγο σε ανάλυση 9-Å. Ο χάρτης έχει περίγραμμα με 0,2 μέση τετραγωνική ρίζα (RMS) απόκλιση από τη μέση πυκνότητα. Τα στερεά περιγράμματα αντιπροσωπεύουν την πυκνότητα που είναι μεγαλύτερη από την μέση πυκνότητα. Τα διακεκομμένα περιγράμματα αντιπροσωπεύουν πυκνότητα που είναι χαμηλότερη από την μέση πυκνότητα. Η επαναλαμβανόμενη μονάδα είναι ένας εξαμερικός δακτύλιος (διακεκομμένος κύκλος) πυκνότητας πρωτεΐνης που περικλείει μια λιγότερο πυκνή κοιλότητα. Το τρίγωνο σηματοδοτεί τον άξονα της τριπλής συμμετρίας όπου εμφανίζονται οι συνδεδεμένοι δακτύλιοι. Τέλος περιγράφεται η πυκνότητα για μια ενδεχόμενη υπομονάδα.

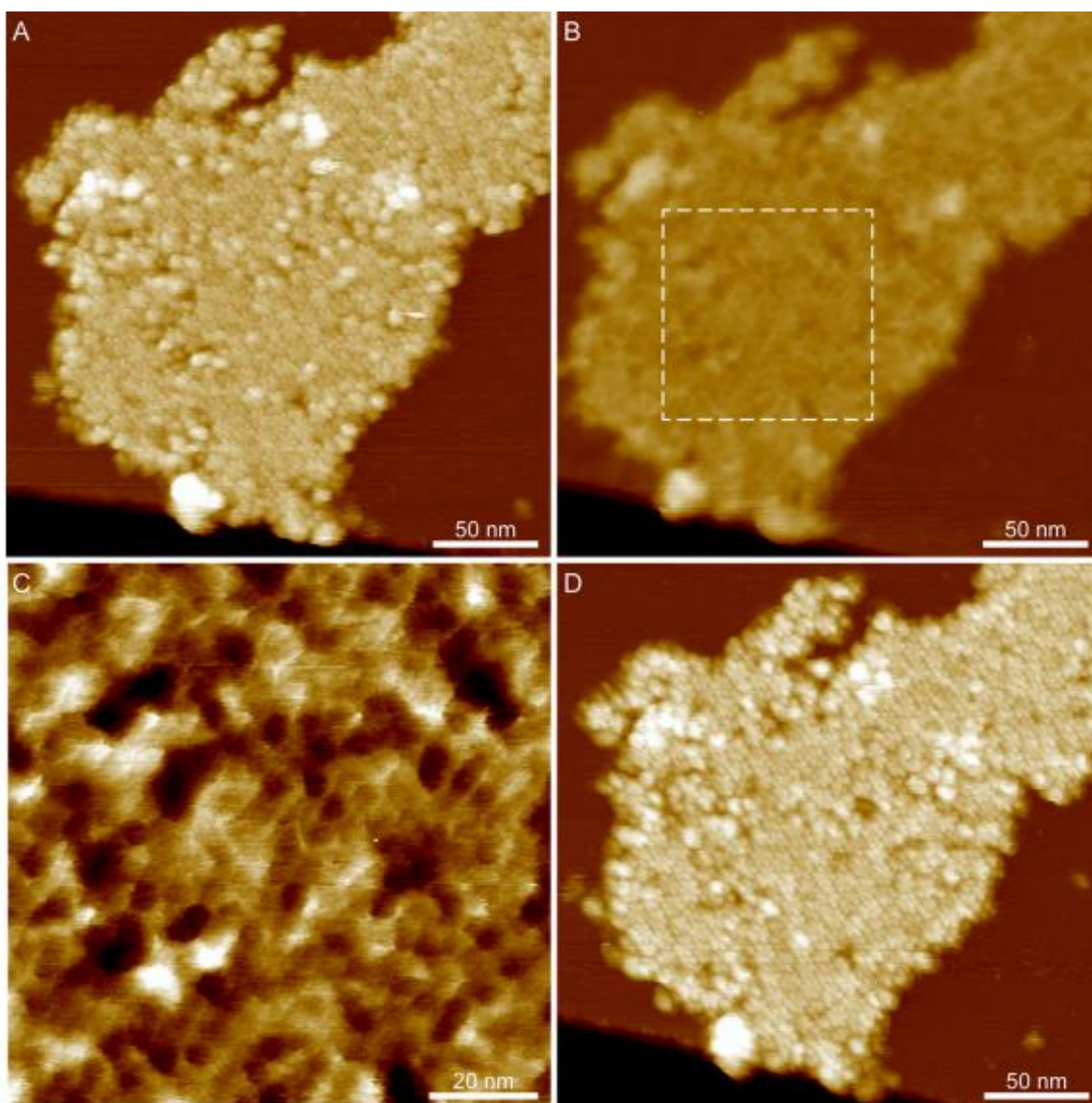


**Εικόνα 6** AFM ανασυνδυσασμένων κρυστάλλων CsxA που αποκαλύπτουν την εξωτερική επιφάνεια του βασικού στρώματος του εξωσπόριου και μια διαμορφωτική αλλαγή ανάλογα με την ενυδάτωση. (Α) Υψηλής ανάλυσης εικόνα 2D του ανασυνδυσασμένου κρυσταλλικού θραύσματος CsxA που λαμβάνεται σε νερό, δείχνοντας ένα πλέγμα που μοιάζει με κηρήθρα με μέτρηση κυψελίδας 103-8 Å. Χρώμα κλίμακας, 6 nm. (Β) Υψηλής ανάλυσης εικόνα 2D του ανασυνδυσασμένου κρυσταλλικού θραύσματος CsxA που λαμβάνεται σε νερό, δείχνοντας ένα εξαγωνικό πλέγμα δομών τύπου λουλουδιού με μέτρηση κυτταρικής μονάδας 100-6 Å. Χρώμα κλίμακας, 15 nm. (C) Υψηλής ανάλυσης εικόνα 2D ενός ανασυνδυσασμένου κρυσταλλικού θραύσματος CsxA που λαμβάνεται στον αέρα, δείχνοντας ένα δικτυωτό πλέγμα με κηρήθρα με μέτρηση μονάδας κυττάρου 102-2 Å. Χρώμα κλίμακας, 2,5 nm. (D) Υψηλής ανάλυσης εικόνα 2D ενός ανασυνδυσασμένου κρυσταλλικού θραύσματος CsxA που λαμβάνεται στον αέρα, δείχνοντας ένα πλέγμα με φαινομενική απόσταση 50-4 Å. Χρώμα κλίμακας, 2,5 nm.

### 3.5 Το AFM των κρυστάλλων CsxA αποκαλύπτει μια αναστρέψιμη αλλαγή διαμόρφωσης κατά την ενυδάτωση.

Έχει παρατηρηθεί ότι οι 2D κρύσταλλοι CsxA στερούνται την εξωτερική δομή που διαθέτουν τα φυσικά εξωσπόρια επιτρέποντας την απεικόνιση των δύο επιφανειών του βασικού στρώματος με την μέθοδο AFM. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν δυο ξεχωριστές επιφανειακές δομές ενυδατωμένων κρυστάλλων CsxA, με κοινή παράμετρο μονάδας κυψελίδας 110 Å στο AFM. Σε μια από τις επιφάνειες εμφανίστηκε ένα κυψελωτό πλέγμα από λάκκους (Εικ. 6A) παρόμοιο με αυτό που είχε παρατηρηθεί στο φυσικό εξωσπόριο (Εικ. 3F), και έτσι επιβεβαιώνεται η πραγματική όψη της εσωτερικής επιφάνειας του βασικού στρώματος. Ωστόσο η εξωτερική επιφάνεια εμφανίστηκε υπό την μορφή πλέγματος εξαμερών συγκροτημάτων με λοβούς που μοιάζουν με πέταλα (Εικ. 6B). Όταν τα δείγματα ξηράνθηκαν με αέρα, παρατηρήθηκε ότι η διάταξη του κηλιδωτού πλέγματος που μοιάζει με κηρήθρα ήταν ελάχιστα διαφορετική (110 Å) και οι τριπλοί σύνδεσμοι ήταν λιγότερο έντονοι όπως φαίνεται στο αφυδατωμένο φυσικό εξωσπόριο (Εικ. 3B βλέπε επίσης το εικ. 6C). Αντίθετα η πρόσοψη «πέταλο», του πλέγματος αποτελούταν από μια σειρά λάκκων με φαινομενική απόσταση 50 Å (Εικ. 6D). Επιπλέον, ο μετασχηματισμός Fourier εμφάνισε αδύναμα σημεία πρώτης τάξης, κάτι που υποδηλώνει ότι η

πραγματική παράμετρος μονάδας κυψέλης είναι 110 Å. Το συνολικό πάχος των κρυσταλλικών στρωμάτων μειώθηκε από 65 Å στο νερό σε 40 Å στον αέρα, ανεξάρτητα από την επιφάνεια που απεικονίστηκε με την μέθοδο AFM (Εικ. S3C έως F). Επίσης ένας κύκλος αφυδάτωσης ακολουθούμενος από επανυδάτωση του πετάλου στην δοκιμή έδειξε ότι η δομικές αλλαγές που συμβαίνουν είναι αναστρέψιμες (Εικ. 7). Ο μηχανισμός και οι λειτουργικές επιπτώσεις αυτής της αλλαγής δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Ωστόσο, συμπεραίνεται ότι στο φυσικό εξωσπόριο, τόσο οι ενυδατωμένες όσο και οι αφυδατωμένες δομές της βασικής στιβάδας είναι πιθανό να αντιπροσωπεύουν τις εν ζωή καταστάσεις, που αντικατοπτρίζουν τα διαφορετικά περιβάλλοντα που θα εξελιχθούν τα σπόρια, είτε ως ξηρά είτε σε έδαφος κορεσμένο σε νερό ή σε επιφάνειες και περιβάλλοντα εντός μολυσμένων ξενιστών ή αρπακτικών.



**Εικόνα 7** AFM υψηλής ανάλυσης εικόνες που δείχνουν μια διαμορφωτική αλλαγή μεταξύ υγρών και ξηρών συνθηκών. (Α) Ένας ανασυνδυασμένος κρύσταλλος CsxA 2D που απεικονίζεται σε νερό με εξαγωνικό πλέγμα σε συστοιχία με παράμετρο πλέγματος 110 Å. Χρώμα κλίμακας, 22 nm. (Β) Το ίδιο θραύσμα CsxA που φαίνεται στον πίνακα Α μετά την ξήρανση, απεικονίζεται στον αέρα. Οι συστοιχίες που μοιάζουν με λουλούδια δεν είναι πλέον ορατές και υπάρχει ένα εξαγωνικό πλέγμα πόρων, με φαινομενική απόσταση 50 Å. Χρώμα κλίμακας, 22 nm. (C) Μεγεθυμένη εικόνα της περιοχής που υποδεικνύεται από το διακεκομμένο κουτί στον πίνακα Β. Κλίμακα χρώματος, 2 nm. (D) Το ίδιο στέλεχος απεικονίστηκε στο νερό μετά την ενυδάτωση. Οι συστοιχίες που μοιάζουν με λουλούδια έγιναν ξανά ορατές, υποδηλώνοντας ότι η αλλαγή διαμόρφωσης ήταν αναστρέψιμη. Χρώμα κλίμακας, 22 nm.

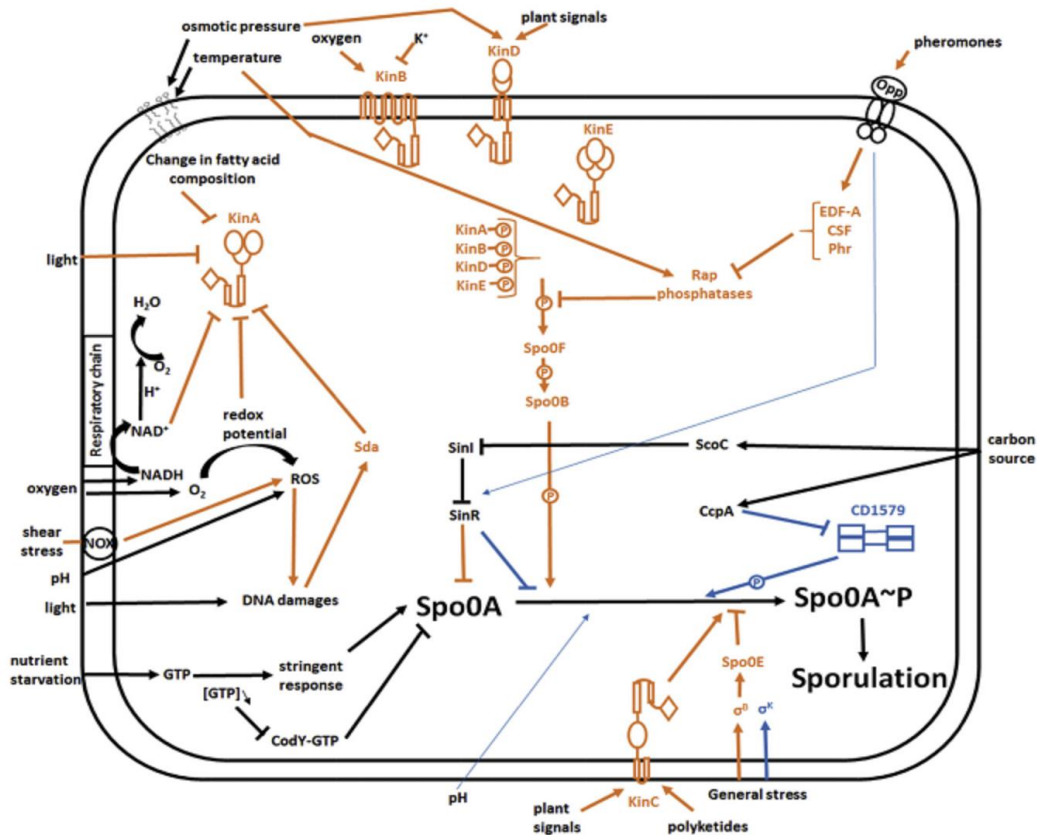
## 4. Μηχανισμός σπορίωσης

### 4.1 Πρόκληση σπορίωσης

Η έλλειψη θρεπτικών συστατικών στα βακτήρια μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία ανθεκτικών δομών. Επίσης οι δυσμενείς συνθήκες προκαλούν την δημιουργία σπορίων ώστε να καταφέρουν τα βακτήρια να επιβιώσουν ως φυσικά κύτταρα. Η ενεργοποίηση και η ρύθμιση του μηχανισμού σπορίωσης γίνεται από τον κύριο ρυθμιστή Spro0A με φωσφορυλίωση και στην συνέχεια ο ενεργοποιημένος ρυθμιστής Spro0A ~ P ξεκινά τη διαδικασία σπορίωσης. Ωστόσο, η διαδικασία της σπορίωσης απαιτεί ενέργεια η οποία προσδίδεται στο σύστημα από τα τελευταία αποθέματα θρεπτικών συστατικών που απομένουν στο βακτήριο ώστε να γίνει πλήρης σπορίωση. Τα θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και κατά συνέπεια για την μετατροπή των βακτηρίων σε ανθεκτικές δομές είναι κυρίως αμινοξέα, πηγές άνθρακα ή ακόμη και μέταλλα. Η έλλειψη θρεπτικών ουσιών χαρακτηρίζεται από την μείωση της εσωτερικής συγκέντρωσης αμινοξέων της διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAAs), την μείωση των αποθεμάτων τριφωσφορικής γουανωσίνης (GTP) η οποία αποτελεί δείκτη διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών καθώς και από την μετατροπή της (GTP) σε ένα μόριο σηματοδότησης (alarmone guanosine ) ή σε τετραφωσφορικό ή πενταφωσφορικό (p) ppGpp, που εμπλέκεται στην μείωση της βακτηριακής απόκρισης (Εικόνα 8). Το CodY είναι ένας ρυθμιστής που ανιχνεύει και δεσμεύει τα BCAA και την GTP. Οι δεσμευτικές μορφές του CodY καταστέλλουν τα γονίδια



για την πρόωρη σποριοποίηση, συμπεριλαμβανομένου του κύριου ρυθμιστή της σπορίωσης Spro0A. Κατά συνέπεια, η μείωση των επιπέδων GTP επιτρέπει τη μεταγραφή των γονιδίων των σπορίων. Η ενεργοποίηση της σπορίωσης από την έλλειψη των θρεπτικών συστατικών εξαρτάται από τη φύση της στέρησης άνθρακα. Για παράδειγμα, η σποριοποίηση του *C. perfringens* καταστέλλεται σε υψηλές συγκεντρώσεις (> 15 mM) λακτόζης, μαννόζης και σακχαρόζης, αλλά δεν επηρεάζεται από την παρουσία της γαλακτόζης και της φρουκτόζης. Αντίθετα, η γλυκόζη διεγείρει την σπορίωση του *Clostridium acetobutylicum*, ενώ για τον *Bacillus thuringiensis*, η σπορίωση γίνεται πιο αποτελεσματική υπο την παρουσία γλυκόζης (70% σπορίωση) σε σχέση με την λακτόζης (30% σπορίωση). Η σπορίωση μπορεί είτε να προκαλείται είτε να αναστέλλεται από τον μεταβολισμό του άνθρακα. Για παράδειγμα, ο καταβολικός έλεγχος της πρωτεΐνης A (CcpA) είναι ένας ρυθμιστής που ανιχνεύει τη διαθεσιμότητα σε πηγές άνθρακα και ελέγχει γονίδια που εμπλέκονται στην πρόσληψη ζάχαρης κατά τον μεταβολισμό των αμινοξέων και την ζύμωση τους. Παράλληλα μπορεί να αναστέλλει ή να ενεργοποιεί την διαδικασία σπορίωση ανάλογα με το είδος του *Clostridium*. Ωστόσο είναι απαραίτητος ρυθμιστής για την αποτελεσματική σπορίωση του *C. perfringens*, ενώ αποτελεί ανασταλτικός παράγοντας για την σπορίωση του *Clostridium difficile* διότι μειώνει την απόκριση της κινάσης ιστιδίνης του αισθητήρα CD1579 (Εικ. 8). Η πρωτεΐνη ScoC είναι επίσης ένας καταβολικά εξαρτώμενος παράγοντας της σπορίωσης στο *Bacillus subtilis*. Στην παρουσία πηγών άνθρακα, η ScoC αναστέλλει την παραγωγή ολιγοπεπτιδικής περμεάσης (Opp) και κατά συνέπεια, την είσοδο των φερομονών μέσω της Opp. Η ScoC αναστέλλει επίσης την μεταγραφή του *sinI*, ενός ανταγωνιστή του *sinR* που επηρεάζει αρνητικά την παραγωγή του κύριου ρυθμιστή της σπορίωσης Spro0A (Εικ. 8).



**Εικόνα 8.** Επιδράσεις περιβαλλοντικών παραγόντων στην αλυσίδα του μηχανισμού έναρξης sporώσεως του *Bacillus* και του *Clostridium*. Μερικά βήματα αφορούν μόνο το *Clostridium* (με μπλε χρώμα) και άλλα μόνο το *Bacillus* (με πορτοκαλί χρώμα) ενώ, ορισμένα στοιχεία είναι κοινά και για τους δύο μικροοργανισμούς (με μαύρο χρώμα). Τα βήματα ενεργοποίησης του μηχανισμού συμβολίζονται με (→), αντίθετα τα βήματα αναστολής συμβολίζονται με (⊥) τα οποία μπορεί να αφορούν είτε τη δράση του στοχευμένου μορίου είτε την παραγωγή του. Τα βέλη με το σύμβολο (⊕) αφορούν τα βήματα στα οποία γίνεται φωσφορυλίωση. Τα λεπτά μπλέ βέλη υποδηλώνουν βήματα που είναι υποθετικά ή δεν έχουν πλήρως καθοριστεί για την sporώση των κλωστρίδιων. Ένα πλήθος από διαμορφωτές sporίων μας παρέχει πληροφορίες για τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα που μπορούν να επηρεάσουν την sporώση των γενών *Clostridium* και *Bacillus*. Έχουν εντοπιστεί πέντε αισθητήρες κινάσης, που ονομάζονται KinA έως KinE και έχουν εντοπιστεί στο γένος *B. Subtilis*. Ο κύριος αισθητήρας κινάσης (KinA) διαθέτει τρεις περιοχές PAS (A, B και C) οι οποίες ανιχνεύουν διαφορετικά ερεθίσματα, όπως την συγκέντρωση οξυγόνου μέσω του λόγου NAD<sup>+</sup>/NADH και του δυναμικού οξειδοαναγωγής (μέσω της ανίχνευσης μορίων έντονης οξειδωτικής δράσης) ή την ένταση του φωτός (μέσω της πρωτεΐνης Sda η οποία αντιδρά όταν υπάρχει βλάβη του DNA που προκαλείται από το φως). Η πρωτεΐνη KinB δεν λαμβάνει χώρα στις περιοχές PAS και αντιδρά σε αερόβιες συνθήκες και στην παρουσία υψηλής συγκέντρωσης καλίου. Ωστόσο η πρωτεΐνη KinC αντιδρά σε σύματα που προέρχονται από φυτά και πολυκετίδια. Η πρωτεΐνη KinD αντιδρά σε οσμωτικές συνθήκες καθώς και σε φυτικά σημάτα. Ο ρόλος της πρωτεΐνης KinE δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα. Επιπλέον όταν διεγείρεται κάποιος από του πέντε αισθητήρες Kin του *B. Subtilis* αυτοφωσφορυλιώνεται και στη συνέχεια φωσφορυλιώνει τον γενικό ρυθμιστή απόκρισης της sporώσεως (Spo0A) μέσω των διαδοχικών ενδιάμεσων Spo0F και Spo0B (Εικ. 1). Ο αισθητήρας KinC είναι επίσης σε θέση να φωσφορυλιώνει άμεσα το Spo0A. Η φωσφορυλίωση του Spo0A ~ P μπορεί να αντιστραφεί από ασπαρτικές φωσφατάσες όπως το Spo0E καθώς και από Rap φωσφατάσες (RapA έως RapK), οι οποίες δρουν αποφωσφορυλιώνοντας τους ενδιάμεσους Spo0F ~ P. Τα βήματα του μηχανισμού sporώσεως για τα κλωστρίδια δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητά και συμβολίζονται με λεπτά μπλέ βέλη. Συγκεκριμένα το κλωστρίδιο δεν διαθέτει πολυσυστατική φωσφορυλίωση (Spo0F και Spo0B) και συγκεκριμένα το SinR αναστέλλει τη φωσφορυλίωση Spo0A, ενώ το SinR αναστέλλει την παραγωγή του Spo0A στον Βάκιλο. Οι φερομόνες EDF-A και Phr δεν έχει διευκρινιστεί εάν υπάρχουν στο κλωστρίδιο αντίθετα έχουν εντοπιστεί στο Βάκιλο ως δείκτες της πυκνότητας των κυττάρων. Τέλος στο είδος *C. difficile* το κυτσοσολικό HK CD1579 αποκρίνεται σε πηγές άνθρακα μέσω του ρυθμιστή CcpA.

## 4.2 Πυκνότητα κυττάρων

Η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων μέσω σημάτων ανίχνευσης επιτρέπει την ανίχνευση επαρκών θρεπτικών στοιχείων ανά κύτταρο ώστε να διατηρηθεί το επίπεδο ενέργειας που απαιτείται για ολόκληρη την διαδικασία της σπορίωσης. Έτσι εξηγείται το γεγονός ότι ο μηχανισμός ανίχνευσης κάθε κυττάρου ρυθμίζεται ανάλογα με την έλλειψη των θρεπτικών συστατικών και το αντίστροφο. Σε αντίθεση με την έλλειψη των θρεπτικών ουσιών, η οποία σηματοδοτεί την παραγωγή του SproA, η ανιχνευσιμότητα των κυττάρων προκαλεί την ενεργοποίηση του SproA με τη φωσφορυλίωσή του (Εικ. 8).

Συγκεκριμένα η ενεργοποίηση του SproA είναι το αποτέλεσμα φωσφορυλίωσης που ξεκίνησε από τις κινάσες ιστιδίνης (HK) KinA, B, D και E στο *B. subtilis*. Αυτές οι πρωτεΐνες επιτρέπουν στο κύτταρο να ανιχνεύει τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Μόλις τα κύτταρα διεγερθούν, αυτόματα ξεκινάει η αυτοφωσφολίωση τους και τερματίζεται η φωσφορυλίωση του SproA μέσω της φωσφορυλίωσης του SproF και του SproB στο *B. Subtilis* (Εικ. 8). Η φωσφορυλίωση του SproA ~ P μπορεί να αντιστραφεί σε ασπαρτικές φωσφατάσες όπως το SproE και τις Rap φωσφατάσες (RapA σε RapK), οι οποίες δρουν αποφωσφορυλιώνοντας το ενδιάμεσο SproF ~ P. Τα βακτηριακά κύτταρα παράγουν πεπτιδικές φερομόνες όπως τα Phr πεπτίδια και εξωκυτταρικούς παράγοντες διαφοροποίησης A (EDF-A) που εκκρίνονται στο εξωκυτταρικό μέσο. Κατά την ανάπτυξη των φυτικών κυττάρων, αυξάνεται η συγκέντρωση των εξωτερικών φερομονών μέχρι να φτάσει σε συγκέντρωση στην οποία οι φερομόνες επανεισάγονται μέσα σε άλλα κύτταρα μέσω της Opp (Εικ. 8). Το EDF-A αναστέλλει τις πρωτεΐνες Rap και έτσι συμμετέχει στην αύξηση του επιπέδου SproA ~ P. Άλλες φερομόνες, όπως οι

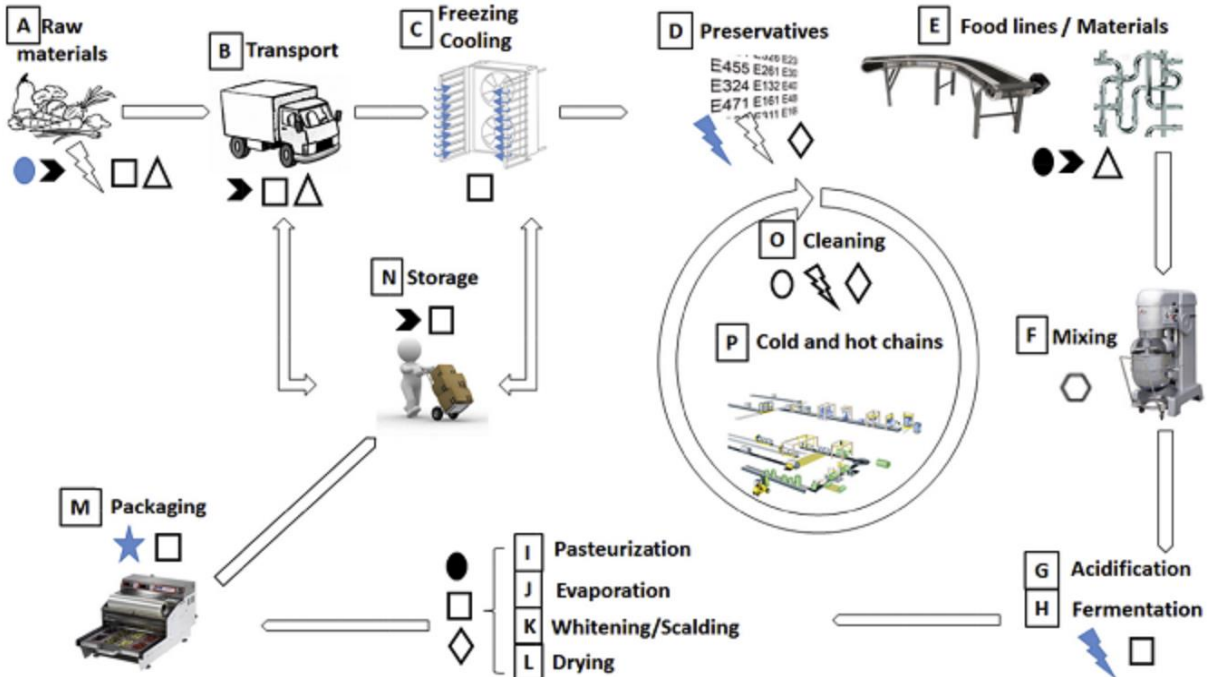
παράγοντες διέγερσης ικανοτήτων (ΠΔΙ), εμπλέκονται στην διαδικασία σπορίωσης είτε είναι διαθέσιμες σε χαμηλή είτε σε υψηλή συγκέντρωση.

## 4.3 Η εμφάνιση σπορίωσης στα βιοφίλμ

Το φαινόμενο της σπορίωσης μπορεί να συμβεί ως αντίδραση σε αποικίες μεγάλου πληθυσμού ή σε βιοφίλμ. Τα κύτταρα που μπορούν να συνυπάρχουν σε ένα βιοφίλμ μπορεί να είναι κινητικά κύτταρα, κύτταρα που παράγουν μήτρες και σποριωμένα κύτταρα. Τα σποροειδή κύτταρα προέρχονται κυρίως από κύτταρα που παράγουν μήτρα και μερικά από κινητικά κύτταρα, δείχνοντας μια ιεραρχική εμφάνιση κάθε πληθυσμού κατά τη διάρκεια του σχηματισμού ενός βιοφίλμ. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί με την ενεργοποίηση της διαδικασίας διαφοροποίησης ανάλογα με τις συγκεντρώσεις SproA ~ P: γονίδια που εμπλέκονται στο σχηματισμό βιοφίλμ και ενεργοποιούνται σε χαμηλά επίπεδα SproA ~ P, ενώ η σποριοποίηση ξεκινά αργότερα, σε υψηλότερα επίπεδα SproA ~ P. Η μετάβαση από το στάδιο παραγωγής μήτρας κατά τον σχηματισμό βιοφίλμ στο στάδιο σπορίωσης συσχετίζεται με την μετάβαση από την δράση της φωσφατάσης στην δράση της κινάσης (ιστιδίνης – κινάσης) HK KinD που αποτελεί

έναν από τους αισθητήρες που εμπλέκεται στην ανίχνευση εξωτερικών ερεθισμάτων όπως την οσμωτική πίεση (Εικ. 8). Επιπλέον μια τασιενεργός ουσία, η surfactin που το μόριο της σχετίζεται με τον σχηματισμό βιοφίλμ, μπορεί να διασπάσει μεμβράνες που οδηγούν σε απώλεια καλίου. Τα ιόντα καλίου ανιχνεύονται από έναν άλλο αισθητήρα (HK KinB), ο οποίος με την σειρά του οδηγεί σε φωσφορυλίωση του Sro0A. Τα σπόρια έχουν την τάση να σχηματίζονται πάνω από τις αποικίες ή τα βιοφίλμ, δεδομένου ότι οι απαιτήσεις τους σε οξυγόνο και η ενέργεια που απαιτείται για την παραγωγή μήτρας, προκαλεί σημαντική έλλειψη σε θρεπτικά συστατικά μέσα στο μικρο- περιβάλλον των κυττάρων. Τέλος η διεπαφή μεταξύ αέρα και τροφίμου ή των συστατικών του ευνοεί την διάδοση του αέρα και την βλάστηση των σπορίων όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες γίνονται ευνοϊκές.

Τα βιοφίλμ εντοπίζονται σε διάφορες βιομηχανίες τροφίμων όπως αυτές της γαλακτοβιομηχανίας, του κρέατος και των λαχανικών. Τα βακτήρια που σχηματίζουν σπόρια διαθέτουν ιδιότητες πρόσφυσης που τους επιτρέπουν να προσκολλώνται στην επιφάνεια των τροφίμων και να σχηματίσουν βιοφίλμ (βήμα E στο Εικ. 9). Τα βιοφίλμ του *B. Cereus* στα δημητριακά έχουν βρεθεί και σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας γαλακτοκομικών προϊόντων και σε άλλες γραμμές παστερίωσης (στάδια E και I στο Εικ. 9) καθώς και σε μονάδες επεξεργασίας γαλακτοκομικών προϊόντων όπως μονάδες τροφοδοσίας, βυτιοφόρα και σε διαχωριστές αέρα (βήματα A και B στο σχήμα 2). Κατά την μελέτη εντοπίστηκαν βιοφίλμ που αποτελούνται σε ποσοστό 0,01% έως 10% από σπόρια των ειδών *B. Cereus* και *B. Subtilis*. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι ο *B. Cereus* είναι ικανός να δημιουργεί σπόρια σε βιοφίλμ μικτής καλλιέργειας. Συνεπώς, η αποτελεσματικότητα των βημάτων καθαρισμού κατά τη διάρκεια της γραμμής παραγωγής τροφίμων καθορίζεται από την ικανότητα των σπορογόνων βακτηρίων να σχηματίζουν βιοφίλμ. Ένα άλλο ενδιαφέρον παράδειγμα είναι η ικανότητα του *B.subtilis*, να αποικίζει στις ρίζες του φυτού *Arabidopsis thaliana* και να σχηματίζει βιοφίλμ μέσω της πυροδότησης φυτικών πολυσακχαριτών που ανηχεύτηκαν (HK KinC και KinD). Έτσι εξηγείται και ο επιπολασμός του *B.subtilis* στην ριζόσφαιρα της ντομάτας.



**Εικόνα 9.** Τα βασικότερα βήματα μιας παραγωγικής διαδικασίας που ευνοείται η ανάπτυξη спорίων ανάλογα με τις συνθήκες περιβάλλοντος. Κατά την παραγωγή είναι δυνατόν διαφορετικές διεργασίες να αλληλοσυνδέονται μεταξύ τους. Οι κύριοι παράγοντες που ενδέχεται να προκαλέσουν спорίωση συμβολίζονται με κενά σύμβολα. Επίσης πιθανότητα εμφάνισης спорίων του clostridium συμβολίζονται στα βήματα με μπλε γεμισμένα σύμβολα ή με μαύρα γεμισμένα σύμβολα για πιθανή εμφάνιση спорίων των γενών clostridium και Bacillus ταυτόχρονα. Η спорίωση του clostridium ευνοείται σε συγκεκριμένες τιμές pH και συμβολίζεται με (O) αλλά και από την παρουσία θρεπτικών συστατικών ή από τον συνδυασμό των δύο παραγόντων με συμβολισμό (→). Άλλοι παράγοντες όπως το pH, τα θρεπτικά συστατικά και οι  $a_w$  συμβολίζονται με (◇), η θερμοκρασία με (□), μεταλλικά στοιχεία με (○), διακύμανση της συγκέντρωσης αερίου με (\*), τάση διάτμησης με (○), παρουσία άλλων μικροοργανισμών με (Δ).

#### 4.4 Εξωγενής παράγοντες που προκαλούν την έναρξη του φαινομένου спорίωσης. Επιδράσεις περιβαλλοντικών παραγόντων.

Γενικά, οι δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες επηρεάζουν τον μεταβολισμό των βακτηρίων, οδηγώντας τα σε αναστολή των διαδικασιών ανάπτυξης και спорίωσης. Η γενική απόκριση στο στρες των βακτηρίων καθορίζεται κυρίως από τον παράγοντα  $\sigma^B$  που ελέγχει τα εμπλεκόμενα γονίδια για την προσαρμογή του βακτήριου σε ακρέα φαινόμενα, όπως χαμηλές θερμοκρασίες. Η ρόλος του παράγοντα  $\sigma^B$  και του  $Spo0A \sim P$  σχετίζεται με την έναρξη της κυτταρικής επιβίωσης των спорίων. Συγκεκριμένα, ο  $\sigma^B$  ενεργοποιεί την παραγωγή του  $Spo0E$ , και ο ρόλος του είναι καθοριστικός για την αποφωσφορυλίωση του  $Spo0A \sim P$  σε *B. subtilis* (Εικ. 8). Από το γένος *Clostridium* μόνο το *C. Difficile* διαθέτει έναν τύπο του παράγοντα  $\sigma^B$ , ενώ το  $Spo0E$  παρουσιάζεται στα είδη *C. acetobutylicum*, *Clostridium botulinum* και *C. difficile*.

Επιπλέον, ο παράγοντας  $\sigma^K$  συνδέεται με την απόκριση και την προσαρμογή των *Clostridium spp* και *C. Botulinum ATCC3502* στο περιβαλλοντικό στρες. Η ικανότητα sporίωσης εξαρτάται από την προσαρμοστικότητα σύμφωνα με τις περιβαλλοντικές μεταβολές. Το γεγονός ότι sporίωση προκαλείται από την έλλειψη θρεπτικών συστατικών και την υψηλή πυκνότητα κυττάρων, υποδηλώνει ότι η ανάπτυξη των βακτηριδίων είναι απαραίτητη πριν από τη εκκίνηση του μηχανισμού sporίωσης. Τα βακτήρια που σχηματίζουν σπόρια εμφανίζουν πολλά οικολογικά χαρακτηριστικά που τους προσδίδουν ένα ευρύ φάσμα δυνατοτήτων sporίωσης καθώς μπορεί να είναι μεσόφιλα, ψυχρόφιλα, θερμόφιλα και οξύφιλα.

#### 4.4.1 Θερμοκρασία

Η αποτελεσματικότητα της sporίωσης επηρεάζεται έντονα από τη χαμηλή θερμοκρασία. Οι χαμηλές θερμοκρασίες προκαλούν μείωση της sporίωσης ενώ παράλληλα παρατείνουν τον χρόνο της διαδικασίας sporιοποίησης. Οι ακρέες θερμοκρασίες προκαλούν αλλαγές στη σύνθεση λιπαρών οξέων και των κυτταρικών μεμβρανών των σπόριων προκειμένου να προσαρμοστεί η ρευστότητά τους. Συγκεκριμένα, οι ψυχρές θερμοκρασίες προκαλούν παραγωγή διακλαδισμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων για την αύξηση της ρευστότητας της κυτταρικής μεμβράνης του *B. subtilis*. Η δραστηριότητα του HK KinA αναστέλλεται από ακόρεστα λιπαρά οξέα που αποτελούνται από 16-20 άτομα άνθρακα, όπως το ελαϊκό οξύ (Εικ. 8). Η απόκριση των σπορίων σε υψηλές ή χαμηλές θερμοκρασίες οδηγεί στην διαμόρφωση καθώς και την ρύθμιση της διαδικασίας της sporίωσης. Σε μοριακό επίπεδο, μόνο το 15% των γονιδίων sporίωσης ενεργοποιούνται από το ψυχρό στρες και ειδικότερα το *garA* που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία εμπλέκεται στην έναρξη sporίωσης με αποφωσφορυλίωση του  $Spo0F \sim P$  (Εικ. 8). Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση αυξημένης παραγωγής πρωτεϊνών *Spo0A* κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του *B. subtilis* στους 20 °C σε σχέση με τους 37 °C. Ωστόσο, η sporίωση ήταν λιγότερο αποτελεσματική στους 20 °C σε σύγκριση με τους 37 °C καθώς παρατηρήθηκε καθυστέρηση και χαμηλότερη τελική συγκέντρωση σπορίων. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το *Spo0A* δεν εμπλέκεται μόνο στη sporίωση, αλλά μακροπρόθεσμα και στην προσαρμογή και την επιβίωση των κυττάρων κατά το ψυχρό στρες, επιβεβαιώνοντας την σύνδεση μεταξύ της sporίωσης και της προσαρμογής στις περιβαλλοντικές συνθήκες.

Η παραγωγική διαδικασία των τροφίμων αποτελείται από στάδια που στοχεύουν στον περιορισμό της βακτηριακής ανάπτυξης, όπως η αποθήκευση σε θαλάμους ελεγχόμενης θερμοκρασίας (βήματα N και P Εικ. 9). Ωστόσο η ανάπτυξη και η sporίωση δεν περιορίζονται εντελώς ακόμη και σε αυτές τις θερμοκρασίες χάρη στον ψυχρόφιλο ή θερμόφιλο χαρακτήρα των μικροοργανισμών στόχο του κάθε βήματος της παραγωγής. Επιπλέον, οι διαδικασίες όπως η θέρμανση και η ψύξη πρέπει να εκτελούνται για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα ώστε να επιτρέπεται κατά την έναρξη η ελεγχόμενη ανάπτυξη και η sporίωση των στελεχών όπως του *C. Perfringens* (χρόνος διπλασιασμού 6-9 λεπτά μεταξύ 43 °C και 45 °C). Τέλος διεργασίες όπως

το ζεμάτισμα (βήμα Κ Εικ. 9) αναπτύσσονται θερμοκρασίες ευνοϊκές για την ανάπτυξη και σπορίωση των θερμοφίλων βακτηρίων.

#### 4.4.2 pH

Το PH αποτελεί έναν εξαιρετικά κρίσιμο παράγοντα για τον περιορισμό της ανάπτυξης των βακτηρίων και την δημιουργία σπορίων στα τρόφιμα. Συγκεκριμένα σε έρευνα που έγινε για τον συσχετισμό του πληθυσμού σπορίων του είδους *B. Subtilis* σε σχέση με το pH, βρέθηκαν  $2,5 \times 10^9$  σπορίων / mL σε τιμή pH 8 εν αντιθέσει με  $1,6 \times 10^7$  και  $1,5 \times 10^5$  σπόρια/mL που εντοπίστηκαν σε τιμές pH 10,0 και 6,0 αντίστοιχα. Επίσης η σπορίωση σε pH 8,0 εμφανίστηκε μετά από 3 ημέρες σε σχέση με την καθυστερημένη εμφάνιση σπορίων μετά από 20 μέρες για τις τιμές pH 6,0 και 10,0. Στην περίπτωση των κλοστρίδιων το pH επηρεάζει διαφορετικά τον ρυθμό σπορίωσης ανάλογα με το είδος. Για παράδειγμα το βέλτιστο pH για την σπορίωση των *Thermoanaerobacterium, thermosaccharolyticum* (πρώην *Clostridium thermosaccharolyticum*) κυμαίνεται σε τιμές 5,0 και 5,5 ενώ η μέγιστη συγκέντρωση των σπορίων του *C. perfringens* λαμβάνεται σε τιμή pH 7,0 και δεν εμφανίζεται σπορίωση σε pH 5,5. Ο τρόπος με τον οποίο επηρεάζει το χαμηλό pH στην σπορίωση δεν είναι σαφής. Πιστεύεται ότι η διαδικασία σπορίωσης επηρεάζεται μέσω της αυξημένης παραγωγής οξυγόνου των διάφορων ειδών καθώς και (Εικ. 8) από την ρύθμιση του παράγοντα  $\sigma^H$ , που εκκινεί την διαδικασία σπορίωσης. Το έδαφος και το περιβάλλον στο οποίο καλλιεργούνται φρούτα και λαχανικά εξαρτάται από τα επίπεδα οξύτητας, και κατά συνέπεια επηρεάζεται και η ανάπτυξη αλλά και ο σχηματισμός σπορίων (βήμα Α Εικ. 9). Τα περισσότερα τρόφιμα έχουν χαμηλό pH όπως για παράδειγμα τα ζυμωμένα ή οξινισμένα προϊόντα (βήμα D Εικ. 9). Επίσης η γαλακτική ζύμωση (βήμα Η Εικ. 9) μπορεί να καθυστερήσει και να προωθηθεί η σπορίωση σε μαλακά τυριά όπως το καμαμπέρ. Στη συνέχεια, η διαδικασία πλυσίματος και καθαρισμού μπορεί να οδηγήσει σε μερική μείωση του pH καθώς και σε μόλυνση των τροφίμων κατά μήκος της γραμμής παραγωγής (βήματα Ε και Ο Εικ.9).

#### 4.4.3 Ενεργότητα ύδατος

Ενας επιπλέον σημαντικός παράγοντας που εμποδίζει την βακτηριακή ανάπτυξη και την σπορίωση είναι η ενεργότητα ύδατος του τροφίμου. Ακόμη και μια μικρή μείωση της ενεργότητας ύδατος από 0,996 έως 0,985 είναι ικανή να ελαττώσει κατά τέσσερης λογαριθμικούς κύκλους την τελική συγκέντρωση των σπορίων του *B.licheniformis* AD978. Το οσμωτικό στρες επηρεάζει τα σπόρια προκαλώντας αλλαγές στη σύνθεση των λιπαρών οξέων τα οποία με την σειρά τους επηρεάζουν το HK KinA και έτσι μειώνεται αποτελεσματικότητα της σπορίωσης, όπως παρατηρήθηκε και με την επίδραση της θερμοκρασίας. Επίσης η συγκεντρωση  $Spo0A \sim P$  είναι χαμηλότερη υπό υπερωσμωτικές συνθήκες και πιο συγκεκριμένα το οσμωτικό

σοκ περιορίζει την σπορίωση του *B. subtilis* στο ασύμμετρο στάδιο διαίρεσης, μειώνοντας τα σΕ και σF κατά 50%-70% των οποίων ο ρόλος είναι καθοριστικός κατά το πρώιμο στάδιο της σπορίωσης του μητρικού κυττάρου και του αναδυόμενου πρωτοσπορίου (forespore), αντίστοιχα. Θεωρείτε επίσης ότι το HK του ενζύμου KinC του γένους *B. subtilis* ανιχνεύει τη δραστηριότητα του νερού μέσω της ανίχνευσης αυξημένου επιπέδου ιόντων καλίου, που σχηματίζονται κατά την απόκριση του βακτηρίου στο υπερωσμωτικό σοκ (Εικ. 8).

Η ρύθμιση της ενεργότητας νερού χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων για την ελάττωση της βακτηριακής ανάπτυξης με την προσθήκη διαλυτών ουσιών όπως άλατα ή σάκχαρα στα τρόφιμα (βήμα D Εικ. 9). Γενικά όσο αυξάνεται η ενεργότητα νερού στο τρόφιμο ενισχύεται το φαινόμενο της σπορίωσης. Διαδικασίες που εκτελούνται στα τρόφιμα και ενδεχομένως να ενοχοποιούνται για την παροδική αύξηση της ενεργότητας νερού, είναι το ζεμάτισμα (βήμα K Εικ.9), η επίδραση της διαδικασίας πλυσίματος στην γραμμή παραγωγής τροφίμων (βήμα O Εικ. 9) και η διαδικασία της αραίωσης ανάλογα με τον τύπο του τροφίμου (π.χ. χυμός φρούτων, σάλτσες). Αντίθετα διαδικασίες όπως η ξήρανση (βήμα L Εικ.9) συμβάλλουν στη μείωση της εργότητας του νερού και κατά συνέπεια αναστέλλεται και η βακτηριακή ανάπτυξη και η σπορίωση.

#### 4.4.4 Αερισμός

Κατά τον αερισμό παράγονται διάφορα αέρια που επηρεάζουν την σπορίωση. Λίγες μελέτες ασχολούνται με την σπορίωση σε αναερόβιο περιβάλλον, παρόλο που η σπορίωση είναι δυνατόν να συμβεί και σε αναερόβιες συνθήκες. Πράγματι, το *B. cereus* μπορεί να φτάσει σε πληθυσμό τα  $10^6$  σπόρια / ml μετά από 4 μέρες καλλιέργειας υπό αναερόβιες συνθήκες με ελάχιστο ρυθμό ανάπτυξης στους  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  και σε pH 7,4. Ωστόσο οι *B. cereus* και *B. thuringiensis* παράγουν 100 φορές λιγότερα σπόρια σε αναερόβιες συνθήκες από ό, τι σε αερόβιες συνθήκες. Επίσης, το διοξείδιο του άνθρακα ανάλογα με το είδος του βακτηρίου ευνοεί για παράδειγμα τη σπορίωση σπορίωση του *C. botulinum* ενώ, μπορεί να αποτελέσει ανασταλτικός παράγωντας κατά την σπορίωση του *Bacillus anthracis*. Η σπορίωση του είδους *bacillus* σε αναερόβιες συνθήκες επηρεάζεται από άλλους παράγοντες, όπως από την παρουσία νιτρικών που αναστέλλουν τη σπορίωση του *Raenibacillus polyγυχα* και του *Raenibacillus macerans* (και οι δύο προηγουμένως ονομαζόταν *Bacillus*) σε αερόβιο περιβάλλον, ενώ τα νιτρικά είναι απαραίτητα για την σπορίωση ενός συγκεκριμένου στελέχους του είδους *B. licheniformis*. Σε αερόβιες συνθήκες η συγκέντρωση οξυγόνου ανιχνεύεται από το HK KinA μέσω του λόγου NAD<sup>+</sup> / NADH ενώ σε αναερόβιες καταστάσεις ανιχνεύονται από το KinB στο *B. subtilis* (Εικ. 8). Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία οξυγόνου επιταχύνει τη σπορίωση και συγκεκριμένα τη λύση του μητρικού κυττάρου στο *C. perfringens*.



Το έδαφος και τα έντερα των εντόμων και των ζώων αποτελούν αναερόβια περιβάλλοντα μέσα στα οποία ευνοείται η ανάπτυξη και η sporίωση των ειδών *B. cereus* και *B. Subtilis*. Η έλλειψη οξυγόνου μπορεί να αντιμετωπιστεί με συσκευασία των τροφίμων υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα ή σε κενό, όπως συνηθίζεται για τα φρέσκα φρούτα και λαχανικά στα οποία ευδοκίμούν συγκεκριμένα είδη (βήμα N στο Εικ.9). Η παρουσία των νιτρικών αλάτων στα τρόφιμα οφείλεται στην χρήση τους ως συντηρητικά στα επεξεργασμένα κρέατα, αλλά και σε γεωργικές πρακτικές όπως η χρήση λιπασμάτων που αυξάνουν τα επίπεδα νιτρικών στα λαχανικά και το νερό.

#### 4.4.5 Ορυκτά

Η παρουσία μερικών ορυκτών επηρεάζει σημαντικά την παραγωγή sporίων. Η sporίωση του *C. botulinum* ενισχύεται από την παρουσία 1 mM  $Mn^{2+}$  και  $Zn^{2+}$ ·ενώ, η συν-παρουσία των  $Fe^{2+}$  και  $Zn^{2+}$  εμποδίζει την sporίωση του. Η φύση των μεταλλικών αλάτων έχει επίσης σημασία στη sporίωση, καθώς η παρουσία του  $CaCO_3$  επιταχύνει την sporίωση σε σχέση με το  $CaHPO_4$  και δίνει μεγαλύτερη απόδοση sporίων από ότι το  $Ca(OH)_2$  για το *Clostridium sporogenes*. Επιπλέον, η sporίωση του *B. cereus* είναι δυνατό να συμβεί μόνο σε ένα χημικά καθορισμένο και αναερόβιο περιβάλλον παρουσία  $MgCl_2$ ,  $MnCl_2$ ,  $CaCl_2$  και  $ZnCl_2$ . Τα τρόφιμα είναι γενικά πλούσια σε μέταλλα και ιχνοστοιχεία. Ο εμπλουτισμός σε μέταλλα μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια διεργασιών όπως η ξήρανση (βήμα L Εικ.9) κατά την οποία τα μέταλλα συμπυκνώνονται με εξάτμιση (βήμα J Εικ.9) ή κατά το στάδιο της πλύσης με νερό που περιέχει ασβέστιο και νιτρικά (βήμα O Εικ.9), τα οποία ενισχύσουν τη sporίωση ορισμένων στελεχών του *B.licheniformis*. Αντίθετα, διαδικασίες όπως η αργή οξίνιση των μαλακών τυριών προκαλούν μείωση στην περιεκτικότητα ασβεστίου.

#### 4.4.6 Παρουσία άλλης μικροχλωρίδας

Η παρουσία άλλης μικροχλωρίδας μπορεί να επηρεάσει έμμεσα την sporίωση. Οι γαλακτικοί εκκινητές καταναλώνουν μεγάλο μέρος των διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών. Έτσι δημιουργείται ανταγωνισμός για την αξιοποίηση των θρεπτικών συστατικών και αυτό επιδρά αρνητικά στον ρυθμό ανάπτυξης των sporίων και σχετίζεται με την ταχεία οξίνιση των τροφίμων. Για παράδειγμα, το *B. cereus* αδυνατεί να sporιωθεί παρουσία του *Lactobacillus casei* 2756. Επίσης ο μηχανισμός που λαμβάνει χώρα κατά την παραγωγή της νισίνης από το *Lactococcus lactis*, χρησιμοποιείται συνήθως ως εκκινητής για την παρασκευή τυριών. Επιπλέον η τοξίνη κανίβας επηρεάζει άμεσα τον κύκλο ζωής των βακτηρίων που σχηματίζουν σπόρια όπως το *B. cereus*.

Το μεγαλύτερο φορτίο βακτηρίων συναντάται συνήθως στις πρώτες ύλες με μεγάλη ποικιλία φυσικοχημικών χαρακτηριστικών όπως Gram + και Gram – καθώς και sporoγόνα ή μή. Έτσι,

κρίνεται απαραίτητο να εξετάσουμε τον ρόλο των άλλων μικροοργανισμών που μολύνουν τις πρώτες ύλες στην γραμμή παραγωγής τροφίμων καθώς και στα υλικά που χρησιμοποιούνται (βήματα Α και Ε Εικ. 9). Η διαδικασία ζύμωσης απαιτεί την χρήση ειδικής μικροχλωρίδας για την παραγωγή τροφίμων και οδηγεί σε οξίνιση του προϊόντος (βήμα Γ Εικ.9). Για παράδειγμα, τα βακτήρια γαλακτικού οξέος χρησιμοποιούνται ως εκκινητές και ως χλωρίδα για την ωρίμανση και την παραγωγή τυριού ή ως προστατευτική χλωρίδα στο λουκάνικο.

#### 4.4.7 Φως και διάτμηση

Λίγες μελέτες ασχολούνται με τις επιδράσεις του φωτός και του οξειδωτικού στρες κατά το φαινόμενο της σπορίωσης. Σύμφωνα με μελέτες η τελική συγκέντρωση των σπορίων του είδους *B. licheniformis* μειώνεται κατά 60% όταν εφαρμόζεται επεξεργασία με έκθεση σε υψηλής έντασης φως κατά την διάρκεια της σπορίωσης. Το φως προκαλεί αλλοίωση του DNA των σπορίων καθώς ευνοεί την παραγωγή της πρωτεΐνης Sda, που εμπλέκεται στην επισκευή του DNA και στην αναστολή της σπορίωσης με ταυτόχρονη αναστολή της αυτοφωσφορυλίωσης του ενζύμου KinA (Εικ. 8). Επίσης η κατατμητική πίεση που δέχονται τα σπόρια γίνεται αισθητή από την οξειδάση NADH (NOX) που είναι υπεύθυνη για την μετατροπή της μηχανικής πίεσης σε χημικά σήματα (ειδικό ενδοκυτταρικό οξυγόνο siROS) που προκαλεί βλάβες στο γενικό υλικό. (Εικ. 8). Ειδικότερα για την εκκίνηση της σπορίωσης είναι απαραίτητο το DNA να είναι άθικτο και αυτό γίνεται κατανοητό όταν για παράδειγμα το αντιδραστικό οξυγόνο αυξηθεί κατά 10 φορές, η σπορίωση τότε θα μειωθεί κατά 17 φορές. Σε βιομηχανικό επίπεδο το φαινόμενο της διάτμησης αντιμετωπίζεται με μηχανήματα κοπής όπως μίξερ και άλλα.

### 4.5 Συνδυασμένες επιπτώσεις περιβαλλοντικών παραγόντων σε ολόκληρη την τροφική αλυσίδα

#### 4.5.1 Υποστρώματα ζώων

Η φύση του υλικού από το οποίο κατασκευάζονται οι κλίνες των ζώων έχει επίσης αντίκτυπο στην σπορίωση καθώς είναι πιθανόν να οδηγήσει σε μόλυνση των θηλών του ζώου. Σύμφωνα με δείγματα που απομονώθηκαν από τους μαστούς ζώου που έμενε σε κλίνες κατασκευασμένες από άχυρο ή πριονίδι, βρέθηκε να έχουν υψηλότερο φορτίο σπορίων σε σχέση με άλλα ζώα που έμεναν σε κλίνες από ανόργανα υλικά όπως η άμμος. Είναι γνωστό ότι η ανάπτυξη σπορίων δεν είναι δυνατό να συμβεί χωρίς την παρουσία οργανικού υλικού. Το pH του οργανικού στρώματος αποτελεί επίσης έναν σημαντικό παράγοντα δεδομένου ότι το υλικό τύρφη με pH 3,8 εμπόδιζε την ανάπτυξη του *B. Cereus* σε αντίθεση με υλικά όπως το ψιλοκομμένο άχυρο (pH 8,0) και το

πριονίδι (pH 7,0) που δεν επηρέασαν την ανάπτυξη σπορίων. Ένας εξίσου κρίσιμος παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη σπορίων είναι η θερμοκρασία στην οποία βρίσκεται η κλίνη του ζώου. Τέλος έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία περιττωμάτων και ούρων ευνοεί την αύξηση του φορτίου σπορίων στις κλίνες, καθώς αποτελούν οργανική ύλη και αυξάνουν το pH. Ο πληθυσμός σπορίων που βρέθηκε σε κλίνες που φιλοξενούν δύο φορές την εβδομάδα αγελάδες ήταν  $4,7 \log_{10}$  σπόρια/g σε αντίθεση με πληθυσμό  $3,8 \log_{10}$  σπόρια/g που βρέθηκε σε κλίνες που λειτουργούσαν καθημερινά. Συνεπώς η σπορίωση στις κλίνες επηρεάζεται συνδιαστικά από την πρόσληψη οργανικής ύλης, το pH, και την θερμοκρασία. (Βήμα Α Εικ.9)

#### 4.5.2 Διατροφή των ζώων

Τα σπόρια που υπάρχουν στην διατροφή των αγελάδων μπορούν να επιβιώσουν κατά την πεπτική διαδικασία με αποτέλεσμα να εμφανίζονται στο γάλα μέσω της μόλυνσης των κοπράνων. Κρίνεται απαραίτητο λοιπόν να λαμβάνονται μέτρα για τον περιορισμό της σπορίωσης στο αγροτικό περιβάλλον που εκτρέφονται τα ζώα. Τα ανώτερα στρώματα ενσίρωσης περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις σπορίων (έως  $5 \log^{10}$  σπόρια / g) και αυτό οφείλεται στην ικανότητα διείσδυσης του οξυγόνου μέχρι και 20 εκατοστά από την επιφάνεια της ενσίρωσης ανάλογα με την πυκνότητα, το πορώδες της καθώς και τον ρυθμό σίτισης. Παράλληλα η ανάπτυξη ζυμών και μούχλας μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της ζύμης 374 E, (Gaugy κ.α. μικροβιολογική έρευνα σε ενσίρωση το 2017 για pH από 3,8 έως 4,4), η οποία καταναλώνει ζυμώσιμα σάκχαρα και γαλακτικό οξύ δημιουργώντας αναερόβιες συνθήκες ακριβώς κάτω από την επιφάνεια της ενσίρωσης με αποτέλεσμα να αυξάνεται σημαντικά το μικροβιακό φορτίο. Σπόρια όπως το είδους *Clostridium tyrobutyricum* αναπτύσσονται ταχύτερα σε παρόμοιες συνθήκες μικροπεριβάλλοντος.

### 5. Σύγχρονες μεθόδους ανίχνευσης και χαρακτηρισμού μικροοργανισμών

Πρόσφατα, πολλά παθογόνα που μεταδίδονται στα τρόφιμα έχουν καταστεί σημαντικά και απειλούν τη δημόσια υγεία, με διάφορες μελέτες παρακολούθησης να παρέχουν δεδομένα για την καλύτερη κατανόηση της ύπαρξης και της εξάπλωσης τους. Η εφαρμογή σύγχρονων τεχνικών για την ανίχνευση και την τυποποίηση των παθογόνων που προκαλούνται από τα τρόφιμα σε μελέτες παρακολούθησης παρέχει αξιόπιστα επιδημιολογικά δεδομένα για τον εντοπισμό της πηγής των ανθρώπινων μολύνσεων. Ένα ευρύ φάσμα μοριακών τεχνικών έχει

χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση, τον προσδιορισμό, την τυποποίηση, την ταξινόμηση και τον χαρακτηρισμό των παθογόνων μεγάλης σημασίας για τους ανθρώπους (Adzitey, et al., 2013).

Ο παραδοσιακός τρόπος ανίχνευσης και ταυτοποίησης μικροοργανισμών βασίζεται στην καλλιέργεια, την απαρίθμηση και την απομόνωση πιθανών αποικιών για περαιτέρω ανάλυση ταυτοποίησης. Εάν είναι απαραίτητο, το δείγμα τροφής πρέπει να ομογενοποιηθεί, να συμπυκνωθεί ή να εμπλουτιστεί πριν από την καλλιέργεια. Τα βακτηριακά κύτταρα μπορεί να τραυματιστούν ή να καταστούν βιώσιμα μεν αλλά μη καλλιεργήσιμα δε, λόγω παραγόντων όπως η θερμότητα, το κρύο, τα οξέα κλπ. κατά τη διάρκεια των σταδίων επεξεργασίας τροφίμων (Kell, et al., 1998). Αυτά τα βακτηριακά κύτταρα εξακολουθούν να αποτελούν απειλή στη βιομηχανία τροφίμων και ως εκ τούτου, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για τη βελτίωση των επιπέδων ανίχνευσης αυτών των τραυματισμένων κυττάρων. Ωστόσο, ακόμη και με αυτές τις μεθόδους, δεν εντοπίζονται όλα τα βακτηριακά κύτταρα, ειδικά αυτά που είναι βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα (Hakovirta, 2008).

Οι πιο σύγχρονες μέθοδοι συγκέντρωσης ή ακόμη και η επιλογή συγκεκριμένων βακτηρίων από ετερογενή ή μολυσμένα δείγματα είναι μεταξύ άλλων ο ανοσομαγνητικός διαχωρισμός με βάση υδροξείδιο μετάλλου, η μέθοδος ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης (αγγλ.: *ELISA / Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (αγγλ.: *PCR / Polymerase Chain Reaction*) κ. ά. (Gracias & McKillip, 2004).

## 5.1 Ανοσοβιολογικές μέθοδοι

### 5.1.1 Παλαιότερες μέθοδοι

Η ορολογική τυποποίηση (αγγλ.: *serological typing*) είναι μια από τις παλαιότερες ανοσοβιολογικές τεχνικές, αλλά εξακολουθεί να αποτελεί σημαντικό εργαλείο για τον εντοπισμό βακτηρίων το οποίο βασίζεται στη διαφορά, ακόμη και σε ένα είδος, αντιγονικών καθοριστών που εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια (Towner & Cockayne, 1993; van Belkum, et al., 2007). Αυτές οι επιφανειακές δομές περιλαμβάνουν τους λιποπολυσακχαρίτες, τους θυλακώδεις πολυσακχαρίτες, τις μεμβρανικές πρωτεΐνες και τα εξωκυτταρικά οργανίδια, όπως τα μαστίγια και οι κροσσοί που αντιδρούν με αντισώματα (Arbeit, 1995). Η ορολογική τυποποίηση εξακολουθεί να είναι σημαντική για Gram-αρνητικά βακτήρια, όπως το *Escherichia*

*coli* και το *Salmonella*, καθώς και ορισμένα Gram-θετικά βακτήρια, όπως αυτά του γένους *Bacillus* (Nachamkin, 2001; Jay, et al., 2005).

Ο ανοσοφθορισμός (αγγλ.: *immunofluorescence*) είναι μια άλλη παραδοσιακή τεχνική τυποποίησης που βασίζεται επίσης σε αντιγόνα που σχετίζονται με την επιφάνεια και ανιχνεύονται από αντισώματα που ανιχνεύονται απευθείας με φλουορεσκεΐνη ή ένα σχετικό συζυγές το οποίο προστίθεται για οπτικοποίηση της σύνδεσης αντιγόνου - αντισώματος (Townner & Cockayne, 1993). Οι ανοσοδοκιμασίες δεν υπήρχαν μόνο για τα αντιγόνα της επιφάνειας, αλλά και για την ανίχνευση μεταβολιτών, όπως οι τοξίνες, και έχουν περιγραφεί αναλύσεις για αλλαντίαση, χολέρα, καθώς και για εντεροτοξίνες των ειδών *Bacillus* και *Clostridium* (Notermans & Wernars, 1991).

#### 5.1.2 Νεότερες μέθοδοι

Η βασικότερη σύγχρονη μέθοδος ανίχνευσης και χαρακτηρισμού μικροοργανισμών είναι η μέθοδος **ELISA**, η οποία είναι ουσιαστικά ένας βιοχημικός προσδιορισμός που χρησιμοποιεί τον ανοσοπροσδιορισμό ενζύμου (EIA) για την ανίχνευση της παρουσίας ενός προσδέματος (κοινώς μιας πρωτεΐνης) σε ένα υγρό δείγμα χρησιμοποιώντας αντισώματα κατευθυνόμενα κατά την προς μέτρηση πρωτεΐνη. Η μέθοδος ELISA έχει χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό εργαλείο στην ιατρική, στην παθολογία των φυτών και στη βιοτεχνολογία, καθώς και σε έλεγχο ποιότητας σε διάφορες βιομηχανίες (Hornbeck, 2015).

Στην πιο απλή μορφή της ELISA, τα αντιγόνα από το δείγμα συνδέονται με μια επιφάνεια. Στη συνέχεια, ένα αντισταθμιστικό αντίσωμα εφαρμόζεται πάνω στην επιφάνεια έτσι ώστε να μπορεί να δεσμευτεί με το αντιγόνο. Αυτό το αντίσωμα συνδέεται με ένα ένζυμο και στο τελικό στάδιο προστίθεται μια ουσία που περιέχει το υπόστρωμα του ενζύμου. Η επακόλουθη αντίδραση παράγει ένα ανιχνεύσιμο σήμα, συνηθέστερα μια αλλαγή χρώματος (MyBioSource, 2019).

## *Βασικές αρχές*

Η μέθοδος ELISA επινοήθηκε ως μια εναλλακτική προσέγγιση για ραδιοανοσοδοκιμασίες κατά τις αρχές της δεκαετίας του 1970. Πρόκειται για μια δοκιμασία που βασίζεται σε πλάκες και προορίζεται για την αναγνώριση και τον ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών, αντιγόνων, πεπτιδίων, αντισωμάτων και ορμονών. Πρόκειται για μία μέθοδο διαφορετική από τις άλλες διαθέσιμες τεχνικές που βασίζονται σε αντισώματα, με τρόπο που, για παράδειγμα, σε μία πλάκα πολυστυρενίου πολλαπλών κυψελών (που θεωρείται καλή για δέσμευση πρωτεΐνης) η σύνδεση με στερεά επιφάνεια οδηγεί διαδοχικά στην ταυτοποίηση συγκεκριμένων αντιδράσεων, εξαιρουμένων των μη εξειδικευμένων, κάτι που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ποσοτικών αποτελεσμάτων. Αυτή η υποχρεωτική δέσμευση και ακινητοποίηση εξαρτημάτων που είναι μοναδική σε αυτή τη διαδικασία καθιστά τη μέθοδο ELISA αποκλειστική και εύκολα υλοποιήσιμη (MyBioSource, 2019).

Η μέθοδος ELISA έχει εφαρμοστεί τόσο σε διαγνωστικά προγράμματα όσο και σε προγράμματα ελέγχου ποιότητας σε διάφορες βιομηχανίες. Είναι γρήγορη και εύκολα υλοποιήσιμη και, επειδή είναι προδιατεθειμένη να διεξάγει έλεγχο υψηλής απόδοσης και πολυπλεξίας, έχει σημειώσει σημαντικές ανακαλύψεις στην εκτεταμένη αξιολόγηση διαφόρων ερευνών, καθώς και διαγνωστικών δοκιμασιών (Hornbeck, 2015).

Επιπλέον, διατηρεί τη θέση της σε εκτεταμένη χρήση είτε στην αρχική της μορφή είτε σε εκτεταμένες μορφές, με ορισμένες τροποποιήσεις που επιτρέπουν περισσότερες από δύο αναλύσεις σε κάθε κυψέλη, εξαιρετικά ευαίσθητα δεδομένα και απλή παραγωγή. Αυτοί οι προσδιορισμοί λειτουργούν με πολλές παρόμοιες αρχές, όπως για παράδειγμα όταν συγκρίνονται με άλλες διαθέσιμες τεχνικές ανοσοδοκιμασίας. Για να αξιοποιηθεί στο έπακρο αυτό από την άποψη της ευαισθησίας και της ακρίβειας της ανάλυσης, απαιτείται η πλάκα να επικαλύπτεται με μεγάλη φροντίδα χρησιμοποιώντας αντισώματα υψηλής συγγένειας. Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι η ELISA μπορεί να εφαρμοστεί για να εκτελεστούν άλλοι τύποι δοκιμασιών δέσμευσης - προσδεμάτων ως εναλλακτική λύση σε ανοσοδοκιμασίες. ένα σήμα εξόδου το οποίο με τη σειρά του βοηθά στην ποσοτικοποίηση (MyBioSource, 2019).

## *Διαδικασία*

Η διαδικασία αρχίζει με την επικάλυψη της πλάκας πολλαπλών κυψελών είτε με αντιγόνο / αντίσωμα που συνήθως λαμβάνει 30 λεπτά επώασης κατά τη διάρκεια της νύχτας, η οποία ακολουθείται από αντίδραση πρωτεύοντος αντισώματος για δύο ώρες μετά την παρεμπόδιση. Στη συνέχεια, η εφαρμογή του δευτερογενούς αντισώματος διεξάγεται με περαιτέρω επώαση για δύο ώρες, ενώ η προετοιμασία του υποστρώματος γίνεται γενικά ακριβώς πριν από την αντίδραση και, τέλος, γίνεται η ανάπτυξη που διαρκεί περίπου 30 λεπτά (Jayasree, et al., 2000).

Στη μέθοδο ELISA τα συστατικά ακινητοποιούνται, πράγμα που καθιστά την διαδικασία εύκολη στην εκτέλεση. Όμως, καθώς ο προσδιορισμός απαιτεί τη χρήση της επιφανειακής δέσμευσης για τον κατάλληλο διαχωρισμό, το πλύσιμο πραγματοποιείται επανειλημμένα μετά από κάθε βήμα για να εξασφαλιστεί η απομάκρυνση των μη δεσμευμένων οντοτήτων (Hornbeck, 2015). Το πλεονάζον υγρό πρέπει να απομακρυνθεί αναγκαστικά κατά τη διάρκεια της αντίδρασης με σκοπό την πρόληψη της ανεπιθύμητης αραίωσης των αντιδραστηρίων που θα προστεθούν στα επόμενα στάδια. Για την εξασφάλιση της επιθυμητής ομοιομορφίας εφαρμόζονται ξεχωριστές πλάκες ροής σε αυτή τη διαδικασία (MyBioSource, 2019).

Καθώς η ELISA ενσωματώνει αντιδράσεις πολλαπλών σταδίων, μπορεί να γίνει αρκετά περίπλοκη σε περίπτωση μέτρησης συγκεντρώσεων αναλυόμενης ουσίας σε περίπλοκα δείγματα (όπως π.χ. το αίμα), καθώς υπάρχει μια σημαντική ποσότητα αναλυτών που μπορεί να παρεμβαίνει στη μέτρηση. Εδώ, ο ρόλος του σταδίου ανίχνευσης καθίσταται σημαντικός όταν η ενίσχυση σήματος μπορεί να επιτευχθεί μέσω της χρήσης πολλών επικαλύψεων αντισωμάτων. Ένα υπόστρωμα που παράγει χρώμα, όπως η τετραμεθυλβενζιδίνη (TMB) σε χρώση, παράγει το χρώμα με βάση μια ενζυμική αντίδραση. Το υπόστρωμα μπορεί να επιλεγεί με βάση το διαθέσιμο όργανο, όπως στην περίπτωση χρωματομετρικών αντιδράσεων, όπου χρησιμοποιούνται φασματοφωτόμετρα και στην περίπτωση φθοριομετρικών ετικετών χρησιμοποιούνται φθοριόμετρα (Jayasree, et al., 2000).

## 5.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

### 5.2.1 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης είναι μια βιοχημική διαδικασία που υπάγεται στη μοριακή βιολογία, στοχεύοντας στην απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας του DNA μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του. Πρόκειται για μία διαδικασία πειραματικού σωλήνα που μπορεί να διενεργηθεί απρόσκοπτα στη μορφή του χρησιμοποιημένου DNA, καθώς και να υποστεί πλειάδα μετατροπών ώστε να χρησιμοποιούνται πολλοί διαφορετικοί τρόποι γενετικών επεμβάσεων. Η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να επιτρέψει τον *in vitro* πολλαπλασιασμό κάποιων ιδιαίτερων ψηγγμάτων γενετικού υλικού (Kadri, 2020).

#### **Στάδια αντίδρασης**

Η τεχνική PCR στηρίζεται στην επαναλαμβανόμενη κυκλική αλληλουχία τριών απλών αντιδράσεων, οι οποίες κινούνται σε διαφορετικά χρονικά επίπεδα και επίπεδα θερμότητας. Οι κύκλοι περιλαμβάνουν τις εξής διαδικασίες (Kadri, 2020):

- ✓ Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA.
- ✓ Υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία - στόχο (αγγλ.: *primer annealing*).
- ✓ Σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών μέσω της **Taq πολυμεράσης** (αγγλ.: *primer extension*).

Κατά την πρώτη διαδικασία το απομονωμένο από το δείγμα γενετικό υλικό αναδιατάσσεται, αυξάνοντας τη θερμοκρασία της αντίδρασης συνήθως μεταξύ 92 και 96°C, εξοστρακίζοντας έτσι τους πλεονάζοντες κλώνους.

Κατά τη δεύτερη διαδικασία η θερμοκρασία πέφτει στους 50 με 65°C, και έτσι οι εκκινητές κατορθώνουν να υβριδιστούν με την αλληλουχία του DNA. Οι εκκινητές (αγγλ.: *primers*) είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, μήκους 18 - 30 βάσεων, τα οποία αφορούν την αλληλουχία του DNA προς πολλαπλασιασμό. Επιπλέον αποτελούνται από μια πλειάδα ανόμοιων μεταξύ τους



μη συμπληρωματικών αλληλουχιών, γεγονός το οποίο οδηγεί στη μη επίτευξη του υβριδισμού μεταξύ τους αλλά με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA (MacKnight, 2004).

Κατά τη διάρκεια της τρίτης και τελευταίας διαδικασίας οι κλώνοι που ολοκληρώνουν το γενετικό υλικό συντίθενται σε θερμοκρασία 72°C. Η χρήση της πολυμεράσης εξασφαλίζει την επιτυχημένη εφαρμογή της διαδικασίας αυτής, καθώς εξασφαλίζει το ότι η σύνθεση του DNA να πραγματοποιηθεί με κατεύθυνση 5' προς 3'.

Η ανακάλυψη του θερμοανθεκτικού ενζύμου πολυμεράσης του βακτηριδίου **Thermus Aquaticus** (Ταq πολυμεράση) ήταν η ενέργεια η οποία προήγαγε την μέθοδο PCR στα μάτια της επιστημονικής κοινότητας. Το βακτήριο αυτό συνδράμει στην παραγωγή περίπου 33 νουκλεοτιδίων ανά δευτερόλεπτο, ενώ οι διαστάσεις του προϊόντος το οποίο υπόκειται στη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι και ο παράγοντας που καθορίζει τη χρονική διάρκεια της όλης διαδικασίας (Kadri, 2020).

Σε μια συνηθισμένη διαδικασία αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, η αέναη κυκλική διαδικασία μπορεί να εξακολουθήσει να διεξάγεται επ' αόριστον, αν και συνήθως σταματά περίπου στις 30 ή 40 φορές, δημιουργώντας εν τέλει περισσότερα από 1 δισεκατομμύριο ακριβή αντίγραφα του πρωτότυπου γενετικού υλικού.

### **Αξιολόγηση προϊόντος**

Το τελικό αποτέλεσμα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είθισται να αξιολογείται μέσω της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου, με την πρώτη μέθοδο να προτιμάται όταν πρόκειται να ακρωτηριαστεί γενετικό υλικό που ξεκινά από μικρό μήκος και καταλήγει έως και στις 20.000 βάσεις.

Το *βρωμιούχο αιθίδιο* είναι η ουσία η οποία επιτρέπει στο ανθρώπινο μάτι να παρατηρήσει το γενετικό υλικό, ενώ το η χρήση του *πολυακρυλαμιδίου* συνίσταται για την κατάτμηση μικρότερων θραυσμάτων DNA (MacKnight, 2004).

### 5.2.2 ΑΝΟΣΟΜΑΓΝΗΤΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ

Η διαδικασία του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού (αγγλ.: *IMS / immunomagnetic separation*) περιλαμβάνει κυρίως τα στάδια της ανοσοκατακράτησης και του διαχωρισμού. Σε αυτή τη διαδικασία, στο δείγμα προστίθενται κατάλληλες ποσότητες ανοσομαγνητικών σωματιδίων (αγγλ.: *IMPs / immunomagnetic particles*), που παρασκευάζονται με αποτελεσματική ακινητοποίηση συγκεκριμένων μορίων αντισωμάτων στην επιφάνεια των σωματιδίων μέσω των δραστικών ομάδων, και στη συνέχεια προστίθενται στο δείγμα πλήρως αναμειγμένα (Wang, et al., 2013). Μέσω της ειδικής αλληλεπίδρασης μεταξύ ανοσοποιητικών προσδεμάτων (όπως τα αντισώματα) και αντικειμένων - στόχων (που ονομάζονται αντιγόνα), σχηματίζονται τα σύμπλοκα «**IMPs - στόχοι**», τα οποία μπορούν να κινηθούν χρησιμοποιώντας μαγνητικά πεδία. Στη συνέχεια, το μαγνητικό πεδίο αφαιρείται και τα σύμπλοκα των «IMPs - στόχων» επαναιωρούνται σε μικρό όγκο διαλύματος, κάτι το οποίο είναι ευεργετικό για τη συγκέντρωση της ουσίας – στόχου (Chen & Park, 2018; Wang, et al., 2018). Στη συνέχεια, τα παραγόμενα δείγματα συνδυάζονται με μεθόδους δοκιμής για την αξιολόγηση της μόλυνσης των τροφίμων.

Επί του παρόντος, ο ανοσομαγνητικός διαχωρισμός έχει συνδυαστεί με πολλά είδη μεθόδων ανίχνευσης (όπως μέθοδοι ανοσολογίας, μέθοδοι με βάση το νουκλεϊκό οξύ, μέθοδοι φθορισμού και βιοαισθητήρες) για αποτελεσματική συγκέντρωση και ταχεία ανίχνευση μικροοργανισμών - στόχων σε σύντομο χρονικό διάστημα. Εμπλέκονται διάφορα παθογόνα βακτήρια που προκύπτουν από τα τρόφιμα και ορισμένα βακτήρια που καταστρέφουν τα τρόφιμα (Wang, et al., 2020).

*Συνδυασμός με μεθόδους ανοσολογίας*

Έχει αναπτυχθεί μια συνδυασμένη διαδικασία ανοσομαγνητικού διαχωρισμού και ELISA για την ανίχνευση του *Bacillus thuringiensis* σε γάλα χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, κονσερβοποιημένο χυμό φρούτων, στήθος κοτόπουλου και ρόδι. Με ομοιοπολικό δεσμό ειδικού αντισώματος σε μαγνητικά σωματίδια, σχεδόν το 100% του μικροοργανισμού σε μικτό βακτηριακό δείγμα μπορούσε να εντοπιστεί, ενώ η συγκέντρωση στα κύτταρα αυξήθηκε περίπου κατά 100 φορές. Με βάση αυτό, το όριο ανίχνευσης του συνδυασμού ανοσομαγνητικού διαχωρισμού - ELISA θα μπορούσε να αυξηθεί σε 10 κύτταρα ανά mL (Chattopadhyay, et al., 2016).

Το μονοκλωνικό αντίσωμα συζεύχθηκε με τις τροποποιημένες αμινομάδες μαγνητικών σωματιδίων για να παραχθούν ανοσομαγνητικά σωματίδια, τα οποία στη συνέχεια μπλοκάρονται από αλατόνερο ρυθμισμένο με φωσφορικά (αγγλ.: *PBS / phosphate buffered saline*) που περιέχει 0,5% καζεΐνη για τη βελτίωση της ομοιογένειας. Με βάση το τον ανοσομαγνητικό διαχωρισμό, η συγκέντρωση του *Listeria monocytogenes* βελτιώθηκε περισσότερο από 100 φορές και το όριο ανίχνευσης του βιοαισθητήρα έφτανε τα 54 κύτταρα ανά mL (Seo, et al., 2009).

Τα ανοσομαγνητικά σωματίδια παρασκευάστηκαν με συνδυασμό μαγνητικών σφαιριδίων με μονοκλωνικό αντίσωμα μέσω της αντίδρασης στρεπταβιδίνης - βιοτίνης για τον διαχωρισμό του *Listeria monocytogenes* στο κρέας. Σε συνδυασμό με την καλλιέργεια 14 ωρών και το σύστημα ανοσομαγνητικού διαχωρισμού, το επίπεδο ανίχνευσης της ELISA ήταν περίπου 10 CFU<sup>1</sup> ανά γραμμάριο, και κατά συνέπεια ολόκληρη η διαδικασία ανίχνευσης μπορεί να ολοκληρωθεί σε 15 ώρες (Shim, et al., 2008).

Επίσης έχει αναπτυχθεί και άλλη μια διαδικασία ανοσομαγνητικού διαχωρισμού και ELISA για την ανίχνευση *Alicyclobacillus* σε χυμό μήλου. Τα ανοσομαγνητικά σωματίδια δημιουργήθηκαν από προσανατολισμένη ακινητοποίηση πολυκλωνικού αντισώματος στα επεξεργασμένα με σιλάνιο μαγνητικά σωματίδια, και με τη χρήση τους μετά την ανάπτυξή τους, η ανίχνευση *Alicyclobacillus* μπορεί να ολοκληρωθεί εντός 3 ωρών με όριο ανίχνευσης τις 10<sup>3</sup> CFU / mL

---

<sup>1</sup> CFU (Colony-Forming Unit / μονάδα σχηματισμού αποικιών): Μέτρο υπολογισμού των μικροβιακών πληθυσμών.

(Wang, et al., 2013). Τα αποτελέσματα των παραπάνω ερευνών δείχνουν ότι η χρήση του συστήματος του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού μπορεί να μειώσει αποτελεσματικά τον χρόνο ανάλυσης και να βελτιώσει την ευαισθησία της ELISA τουλάχιστον κατά 100 φορές (Wang, et al., 2020).

### **Συνδυασμός με μεθόδους με βάση το νουκλεϊκό οξύ**

Οι μέθοδοι με βάση το νουκλεϊκό οξύ περιλαμβάνουν κυρίως μια σειρά διαδικασιών με συνδυασμό PCR και ισοθερμικής ενίσχυσης με μεσολάβηση βρόχου (αγγλ.: *LAMP / Isothermal mediated isothermal amplification*). Με την ανώτερη απόδοση των ανοσομαγνητικών σωματιδίων, ο συνδυασμός του συστήματος του διαχωρισμού με την PCR, την PCR σε πραγματικό χρόνο, την PCR πολλαπλής όψης ή την PCR αντίστροφης μεταγραφής έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανίχνευση πολλών ειδών μικροοργανισμών σε δείγματα τροφίμων (Wang, et al., 2020).

Κατασκευάστηκε μια διαδικασία ανοσομαγνητικού διαχωρισμού - PCR για την απομόνωση και την ανίχνευση του *Clostridium perfringens* σε σαλάτα λαχανικών, αυγό και χοιρινό κρέας. Το ειδικό αντίσωμα που ακινητοποιήθηκε σε πρωτεϊνικά τροποποιημένα μαγνητικά σωματίδια εφαρμόστηκε για την προσυμπύκνωση βακτηριακών κυττάρων. Ολόκληρη η διαδικασία ανοσομαγνητικού διαχωρισμού - PCR μπορεί να ολοκληρωθεί σε 3 ώρες με όριο ανίχνευσης τις 2 CFU / mL. Μέσω της προκατεργασίας του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού και του εμπλουτισμού, η παρεμβολή του συστήματος δειγμάτων εξαλείφθηκε σημαντικά. η ευαισθησία ανίχνευσης βελτιώθηκε και ο χρόνος ανίχνευσης μειώθηκε (Vinayaka, et al., 2019).

Σε μια άλλη μελέτη, τα επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη μαγνητικά σωματίδια λειτουργούσαν με βιοτινυλιωμένο πολυκλωνικό αντίσωμα. Ο ανεπτυγμένος ανοσομαγνητικός διαχωρισμός συνδυάστηκε με μια ανάλυση PCR που βασιζόταν σε απταμερή για να ανιχνεύσει *Salmonella typhimurium* σε γαλοπούλα. Η αποτελεσματικότητα ανοσοκαθήλωσης (αγγλ.: *CE / immunocapture efficiency*) των ανοσομαγνητικών σωματιδίων έναντι  $10^5$  CFU / mL βακτηρίων – στόχων ήταν σχεδόν 90%. Με τον διαχωρισμό και την προσυμπύκνωση του ανοσομαγνητικού

διαχωρισμού, η ευαισθησία ανίχνευσης της PCR έφτανε τα 100 CFU / mL και τα 10<sup>3</sup> CFU / mL σε καθαρή καλλιέργεια και γαλοπούλα αντίστοιχα (Wang, et al., 2017).

Προτάθηκε σύστημα ανοσομαγνητικού διαχωρισμού δύο σταδίων για συμπύκνωση *Listeria monocytogenes* και τα ληφθέντα δείγματα προσδιορίστηκαν με PCR. Σε αυτήν τη διαδικασία, τα βιοτινυλιωμένα αντισώματα δεσμεύτηκαν με βακτήρια - στόχους σε αραιωμένο γάλα, και μετά προστέθηκαν μαγνητικά σωματίδια με ένδειξη στρεπταβιδίνης στο διάλυμα με σκοπό την αλληλεπίδραση βιοτίνης και στρεπταβιδίνης. Η αποτελεσματικότητα ανοσοκαθήλωσης αυτής της ανάλυσης ήταν περισσότερο από 90%, με τη συγκέντρωση των κυττάρων να βρίσκεται κάτω από 8 × 10<sup>4</sup> CFU / mL, ενώ η ευαισθησία ανίχνευσης αυτής της προσέγγισης ήταν 80 CFU / mL στο παστεριωμένο γάλα (Luo, et al., 2017). Παρομοίως, οξειδωμένα αντισώματα ακινητοποιήθηκαν στην επιφάνεια μαγνητικών σωματιδίων επεξεργασμένων με σιλάνιο για να λάβουν ανοσομαγνητικά σωματίδια. Το κατασκευασμένο σύστημα ανοσομαγνητικού διαχωρισμού εφαρμόστηκε σε συνδυασμό με την PCR πραγματικού χρόνου για την ανίχνευση *Alicyclobacillus* σε χυμούς φρούτων. Με τη θεραπεία του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού, η παρεμβολή των συστατικών του χυμού εξαλείφθηκε και ο περιορισμός ανίχνευσης PCR ενισχύθηκε κατά μια τάξη μεγέθους (28 CFU / mL) (Cai, et al., 2015).

### **Συνδυασμός με μεθόδους φθορισμού**

Με τα χαρακτηριστικά γρήγορων, απλών, ευαίσθητων και αναπαραγώγιμων μεθόδων φθορισμού (όπως ανοσοδοκιμασία φθορισμού, φθοροχρώμιο και κβαντικές κουκίδες) χρησιμοποιούνται συνεχώς στην ανίχνευση μικροοργανισμών τροφίμων. Ο ανοσομαγνητικός διαχωρισμός σε συνδυασμό με αυτές τις μεθόδους δοκιμών έχει επιτύχει τέλεια αποτελέσματα: για παράδειγμα, μέσω των αλληλεπιδράσεων βιοτίνης / αβιδίνης μεταξύ μονοκλωνικού αντισώματος και μαγνητικών αντισωμάτων, αναπτύχθηκε μια νέα δοκιμασία ανοσομαγνητικού διαχωρισμού - φθορισμού για την απομόνωση *Escherichia coli O157: H7* με αποτελεσματικότητα ανοσοκαθήλωσης άνω του 98%. Αυτή η καθιερωμένη διαδικασία μπορεί να ολοκληρωθεί σε 3 ώρες με όριο ανίχνευσης τις 10 CFU / mL (Wang, et al., 2020). Σε σύγκριση με την υπάρχουσα

δοκιμασία που απαιτούσε καλλιέργεια 24 ωρών για προκατεργασία, η επικαιρότητα ανίχνευσης βελτιώθηκε σημαντικά (Zhu, et al., 2011).

Τα μονοκλωνικά αντισώματα ακινητοποιήθηκαν σε σφαιρίδια με χαρακτηριστική αμίνη για την προεπεξεργασία και τον έλεγχο σπορογόνων μικροοργανισμών σε σπανάκι, κοτόπουλο χωρίς κόκαλα και γάλα με 2% λιπαρά αντίστοιχα. Με βάση τον εμπλουτισμό του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού και την υψηλή ευαισθησία της φθορομετρικής ανοσολογικής μεθόδου, λιγότερο από 5 CFU / mL βακτηρίων - στόχων θα μπορούσαν να προσδιοριστούν εντός 2 ωρών. Η αναλυτική ευαισθησία αυτής της ανάλυσης ήταν περίπου 10<sup>4</sup> φορές χαμηλότερη από αυτήν των συμβατικών ανοσοπροσδιορισμών, όπως η ELISA (10<sup>5</sup> - 10<sup>6</sup> κύτταρα / mL) (Cho, et al., 2014).

Η ενισχυμένη με βιοτίνη μέθοδος ανοσομαγνητικού διαχωρισμού συνδυάστηκε με κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση *Listeria monocytogenes*. Χρησιμοποιώντας την καθιερωμένη διαδικασία IMS, το 89% των βακτηρίων - στόχων θα μπορούσαν να απομονωθούν και τα όρια ανίχνευσης ήταν 3,5 × 10<sup>2</sup> CFU / mL και 3,5 × 10<sup>2</sup> CFU / g σε δείγματα μαρουλιού (Li, et al., 2018).

### **Συνδυασμός με βιοαισθητήρες**

Ως αναλυτική συσκευή, ο βιοαισθητήρας μπορεί να μετατρέψει τη βιολογική απόκριση σε ηλεκτρικό σήμα. Υπάρχουν δύο βασικά στοιχεία σε αυτήν τη διαδικασία: η ειδική αναγνώριση των αντικειμένων - στόχων και ο μετασχηματισμός της αναγνώρισης που οδηγεί σε μετρήσιμα και ευαίσθητα ηλεκτρικά σήματα (Umesha & Manukumar, 2018).

Για παράδειγμα, αναπτύχθηκε ένας βιοαισθητήρας αντίστασης για δοκιμή κυττάρων *Listeria monocytogenes*. Τα πολυκλωνικά αντισώματα και τα τροποποιημένα με ουρεάση νανοσωματίδια χρυσού εφαρμόστηκαν για ανοσοκαθήλωση βακτηρίων. Τα παραγόμενα σύμπλοκα επαναιωρήθηκαν με την ουρία, η οποία θα καταλυόταν σε ιόντα αμμωνίου και ανθρακικά ιόντα. Το όριο ανίχνευσης αυτής της δοκιμασίας ήταν 1,6 × 10<sup>3</sup> CFU / mL (Wang, et al., 2017). Ο ανοσομαγνητικός διαχωρισμός σε συνδυασμό με έναν φθορίζοντα βιοαισθητήρα

βασισμένο σε κβαντικές κουκίδες (αγγλ.: *QD / quantum dots*) χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του *Escherichia coli O157: H7*, και το όριο ανίχνευσης αυτού του προτεινόμενου βιοαισθητήρα ήταν 14 CFU / mL. Σε σύγκριση με τη συμβατική ανίχνευση, η ευαισθησία ανίχνευσης βελτιώθηκε αποτελεσματικά από τον ανοσομαγνητικό διαχωρισμό (Xue, et al., 2018). Εκτός αυτού, ορισμένοι φορητοί νανοαισθητήρες φθορισμού σχεδιάστηκαν για την αποτελεσματική εξέταση βακτηριακών παθογόνων. Λόγω του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού, η αποτελεσματικότητα ανοσοκαθήλωσης για τα σπορογόνα βακτήρια στο μαρούλι, στο βόειο κρέας και στις γαρίδες ήταν 88 έως 111%, 89 έως 111%, και 88 έως 106% αντίστοιχα για συγκεντρώσεις από  $10^3$  έως  $10^5$  CFU / mL, ενώ το όριο ανίχνευσης ήταν  $10^2$ ,  $10^3$  και  $10^3$  CFU / mL αντίστοιχα. Η όλη διαδικασία μπορεί να ολοκληρωθεί σε 60 λεπτά (Xu, et al., 2017).

### 5.2.3 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση είναι ο διαχωρισμός φορτισμένων μορίων σε ένα εφαρμοσμένο ηλεκτρικό πεδίο. Η σχετική κινητικότητα μεμονωμένων μορίων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, οι σημαντικότεροι εκ των οποίων είναι το καθαρό φορτίο, η αναλογία φορτίου / μάζας, το οριακό σχήμα και η θερμοκρασία, το πορώδες και το ιξώδες της μήτρας μέσω της οποίας μετακινείται το μόριο. Τα σύνθετα μίγματα μπορούν να διαχωριστούν σε πολύ υψηλή ανάλυση με αυτήν τη διαδικασία (Reddy & Nomula, 2012).

Τα θετικά ή αρνητικά ηλεκτρικά φορτία συνδέονται συχνά με βιομόρια. Όταν τοποθετούνται σε ηλεκτρικό πεδίο, τα φορτισμένα βιομόρια κινούνται προς το ηλεκτρόδιο αντίθετου φορτίου λόγω του φαινομένου της ηλεκτροστατικής έλξης. Εάν ένα μείγμα ηλεκτρικά φορτισμένων βιομορίων τοποθετηθεί σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, τα βιομόρια αυτά θα κινηθούν ελεύθερα προς το ηλεκτρόδιο αντίθετου φορτίου. Ωστόσο, τα διαφορετικά μόρια κινούνται με πολύ διαφορετικούς και μεμονωμένους ρυθμούς ανάλογα με τα φυσικά χαρακτηριστικά του μορίου και από το πειραματικό σύστημα που χρησιμοποιείται (Sheehan, 2000).

### Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (αγγλ.: *CE / capillary electrophoresis*) αναπτύχθηκε αρχικά για την ανάλυση των μορίων, καθώς ακόμη και τα μεγαλύτερα μόρια είναι πολύ μικρότερα και λιγότερο πολύπλοκα από οποιονδήποτε μικροοργανισμό. Η γλυκόζη, για παράδειγμα, έχει μήκος μόλις 1,5 nm, ενώ τα βακτήρια μπορούν να έχουν μέγεθος έως και 10 μm (Black, 1996). Το μέγεθος είναι μόνο ένα χαρακτηριστικό των μικροοργανισμών που μπορούν να δυσκολέψουν τον διαχωρισμό μέσω μικροαναλυτικών μεθόδων. Πρέπει να ληφθούν υπόψη και να ελεγχθούν διάφοροι άλλοι παράγοντες για να επιτευχθεί ένας επιτυχής διαχωρισμός μέσω τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (Armstrong, et al., 1999).

Οι Hjertan et al. (1987) περιέγραψαν το πρώτο πείραμα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης που περιελάμβανε μικρόβια σε αναλυτική κλίμακα. Χρησιμοποιώντας ένα τριχοειδές πυριτικό τήγμα επικαλυμμένο με μεθυλοκυτταρίνη για να αποφευχθεί η προσρόφηση στα τριχοειδή τοιχώματα, ανέλυσαν το βακτήριο *Lactobacillus casei* και τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (αγγλ.: *TMV / tobacco mosaic virus*) σε ξεχωριστές πειραματικές δοκιμές. Ο TMV ανιχνεύθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ανίχνευσης απορρόφησης ορατής και υπεριώδους ακτινοβολίας στα 260 nm, ενώ ο *Lactobacillus casei* ανιχνεύτηκε στα 220 nm. Ωστόσο, δεν υπήρχε διαχωρισμός των διαφορετικών μικροοργανισμών, καθώς όλοι κινήθηκαν μαζί στο ρεύμα ροής που παράγεται μέσω της ηλεκτρο-οσμωτικής ροής (αγγλ.: *EOF / electroosmotic flow*). Αυτά τα πειράματα έδειξαν την πιθανότητα μετακίνησης μικροβίων μέσω τριχοειδών αγγείων σε εφαρμοσμένα ηλεκτρικά πεδία (Desai & Armstrong, 2003).

Στη συνέχεια, οι Zhu & Chen (1989) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζωνών για την ανάλυση ερυθροκυττάρων, με τη χρήση υδροξυπροπυλικής μεθυλοκυτταρίνης για την επικάλυψη των τοιχωμάτων του τριχοειδούς με σκοπό τη μείωση της ηλεκτροοσμωτικής ροής. Οι χρόνοι διασποράς των ερυθρών αιμοσφαιρίων για διαδοχικές δοκιμές αποδείχθηκαν εξαιρετικά αναπαραγώγιμοι υπό συγκεκριμένες ελεγχόμενες συνθήκες, όπως η παρασκευή των κυττάρων και η σύνθεση των διαλυμάτων ηλεκτρολύτη. Ο αναφερόμενος χρόνος διασποράς των μεμονωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων ήταν 14 λεπτά (Zhu & Chen, 1989).



Οι Zhu & Chen ήταν οι πρώτοι που σημείωσαν ότι οι ξένες κορυφές στο ηλεκτρόγραμμα φαίνεται να ήταν το αποτέλεσμα της συσσωμάτωσης των κυττάρων. Ήταν επίσης σε θέση να δημιουργήσουν στενή συσχέτιση μεταξύ του ύψους κορυφής και του αριθμού των κυττάρων που εγχύθηκαν (Desai & Armstrong, 2003).

Οι Grossman & Soane (1990) διαπίστωσαν ότι ο προσανατολισμός ενός μικροβίου επηρεάζει την ηλεκτροφορητική του κινητικότητα: για παράδειγμα, η κινητικότητα του ιού του μωσαϊκού του καπνού, αυξήθηκε με υψηλότερες εφαρμοζόμενες τάσεις, καθώς θεωρήθηκε ότι ο προσανατολισμός του εντός του ηλεκτρικού πεδίου ήταν υπεύθυνος για τις παρατηρούμενες διαφορές. Η αύξηση της κινητικότητας με ισχύ πεδίου προκλήθηκε από μείωση της μεταφραστικής τριβής, που προέκυψε από την ευθυγράμμιση του ιού με το πεδίο (Grossman & Soane, 1990).

Οι Ebersole & McCormick (1993) ανέφεραν τον πρώτο διαχωρισμό βακτηρίων μέσω της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζωνών, καθώς κατόρθωσαν να διαχωρίσουν (ολικώς ή μερικώς) διάφορους σπορογόνους μικροοργανισμούς σε διακριτές ζώνες. Το 90% των βακτηρίων θεωρήθηκε ότι παρέμειναν βιώσιμα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, ενώ η ένεση μεμονωμένων βακτηρίων επέτρεψε την ταυτοποίηση των κορυφών μέσω της αντιστοίχισης κινητικότητας (Ebersole & McCormick, 1993).

Η αντιστοίχιση κινητικότητας έχει χρησιμοποιηθεί και στην παραδοσιακή ηλεκτροφόρηση των κυττάρων στο χαρακτηρισμό των βακτηρίων (Uhlenbruck, et al., 1988). Προκειμένου να δοθεί στα βακτήρια αρκετός χρόνος για να απομακρυνθούν από το μέτωπο της ηλεκτρο-οσμωτικής ροής, έπρεπε να χρησιμοποιηθούν πολύ μεγάλα τριχοειδή (250 cm). Ένας από τους διαχωρισμούς έδειξε δύο κορυφές που αντιστοιχούσαν στον *Bacillus cereus*: η πρώτη κορυφή θεωρήθηκε ότι αντιπροσωπεύει μόνο τα βακτήρια και η δεύτερη κορυφή θεωρήθηκε ότι ήταν αποτέλεσμα συσσωμάτωσης των ίδιων βακτηρίων. Η διαφορά στα φορτία της επιφάνειας των βακτηρίων και των βακτηριακών αλυσίδων θεωρήθηκε ότι προκάλεσε τις διαφορές στους χρόνους διασποράς (Ebersole & McCormick, 1993).

Τέσσερα χρόνια αργότερα, οι Pfetsch & Welsch (1997) ανέφεραν επίσης έναν ανάλογο διαχωρισμό τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης τριών διαφορετικών βακτηρίων, χρησιμοποιώντας μια μέθοδο παρόμοια με αυτή των Ebersole & McCormick (1993). Ο χρόνος ανάλυσης ήταν ελαφρώς μικρότερος από αυτόν που ανέφεραν οι Ebersole & McCormick για τους διαχωρισμούς τους.

### **Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή**

Η ηλεκτροφόρηση πηκτής (αγγλ.: *GA / Gel Electrophoresis*) αναφέρεται σε μια τεχνική στην οποία τα μόρια ωθούνται σε μια έκταση πηκτής, η οποία υποκινείται από ένα ηλεκτρικό ρεύμα. Η κινητήρια δύναμη για την ηλεκτροφόρηση είναι η τάση που εφαρμόζεται στα ηλεκτρόδια και στα δύο άκρα του πηκτώματος. Οι ιδιότητες ενός μορίου καθορίζουν πόσο γρήγορα ένα ηλεκτρικό πεδίο μπορεί να το μετακινήσει με τη βοήθεια ενός ζελατινώδους μέσου (Somma & Querci, 2020).

Τα δίκτυα πηκτής έχουν πολλές επιθυμητές ιδιότητες για τη διενέργεια ηλεκτροφόρησης, καθώς επιτρέπουν μια μεγάλη ποικιλία μηχανικά σταθερών πειραματικών μορφών όπως οριζόντια και η κατακόρυφη ηλεκτροφόρηση σε πηκτές σε σχήμα πλακών και η ηλεκτροφόρηση σε σωλήνες και τριχοειδή. Δεδομένου ότι οι πηκτές που χρησιμοποιούνται στη βιοχημεία είναι χημικά μάλλον μη αντιδραστικές, αλληλεπιδρούν ελάχιστα με τα βιομόρια κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, επιτρέποντας τον διαχωρισμό με βάση τις φυσικές και όχι τις χημικές διαφορές μεταξύ των συστατικών του δείγματος (Adamson & Reynolds, 1997).

- ❖ **Ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα βαθμίδωσης (αγγλ.: *DGGE / Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*):** Είναι μια τεχνική δακτυλικής αποτύπωσης, με την οποία μπορούν να επιλυθούν θραύσματα DNA παρόμοιου μήκους αλλά με διαφορετικές αλληλουχίες ζευγών βάσεων (Muyzer, et al., 1996). Ο διαχωρισμός μέσω DGGE βασίζεται στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα ενός μερικώς λιωμένου μορίου DNA διπλής έλικας σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου που περιέχουν παράγοντες μετουσίωσης του DNA (ουρία και φορμαμίδη), με μικρότερη κινητικότητα από την ελικοειδή μορφή του μορίου. Τα μόρια

DNA διατρέχουν το πήκτωμα έως ότου εμφανίσουν μετουσίωση ως συνέπεια της έκθεσης στα πηκτώματα βαθμίδωσης. Η μετουσίωση του DNA διπλής έλικας εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης του, πράγμα το οποίο σημαίνει ότι η διατήρηση των μορίων DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται από την ακολουθία του. Έτσι μπορούν να διαχωριστούν θραύσματα DNA ίδιου μήκους και διαφορετικών αλληλουχιών (Muyzer, et al., 1996). Η τεχνική σχεδιάστηκε για να εντοπίσει μεταλλάξεις μονής βάσης σε γονίδια και ήταν πολύ χρήσιμη στη μοριακή παθολογία (Myers, et al., 1987). Οι Muyzer et al. (1993) εφάρμοσαν αυτή την τεχνική για πρώτη φορά στη μελέτη ενός οικοσυστήματος.

- ❖ **Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (αγγλ.: 2-DE / two-dimensional electrophoresis):** Η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση είναι ικανή να διαχωρίσει εκατοντάδες έως χιλιάδες πρωτεΐνες ή πολυπεπίδια συνδέοντας την ισοηλεκτρική εστίαση (αγγλ.: *IEF / isoelectric focus*) σε πρώτη διάσταση και την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης παρουσία δωδεκυλο-θειικού νατρίου (αγγλ.: *SDS-PAGE / Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) σε δεύτερη διάσταση. Αυτή η συγκεκριμένη διαμόρφωση ονομάζεται κλασική 2-DE: η ισοηλεκτρική εστίαση διαχωρίζει τις πρωτεΐνες σε συνάρτηση με το ισοηλεκτρικό τους σημείο, ενώ η SDS-PAGE σε συνάρτηση με τη μοριακή τους μάζα, με αυτές τις δύο παραμέτρους να είναι άσχετες μεταξύ τους. Η κλασική 2-DE εξακολουθεί να είναι η βασική τεχνική της πρωτεωμικής ως το πρώτο βήμα για τον διαχωρισμό μιγαδικών πρωτεϊνικών μιγμάτων, με το δεύτερο βήμα να είναι ο προσδιορισμός αυτών των διαχωρισμένων πολυπεπτιδίων χρησιμοποιώντας φασματομετρία μάζας, είτε με δακτυλικό αποτύπωμα μάζας πεπτιδίου (αγγλ.: *PMF / peptide mass fingerprinting*) μετά από συγκεκριμένη πρωτεολυτική υδρόλυση, είτε με προσδιορισμό αλληλουχίας της πολυπεπτιδικής αλυσίδας χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με διαδοχική φασματομετρία. Η κλασική 2-DE έχει επίσης άμεσες εφαρμογές, όπως η φαινοτυπία των γενετικών παραλλαγών (αγγλ.: *PGV / phenotyping of genetic variants*) και ο χαρακτηρισμός των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (αγγλ.: *PTM / post-translational modification*), και ιδίως των φωσφορυλιώσεων, των γλυκοζυλιώσεων κ.ά. (Baudin, 2012).

#### 5.2.4 Υβριδισμός

Ο υβριδισμός είναι η συσχέτιση μεταξύ ελίκων DNA και RNA, των οποίων η κινητική διέπεται από το βαθμό συγγένειας (τόσο μεταξύ τους όσο και με το υπόλοιπο κύτταρο), τον τύπο διαλύτη, την ιοντικής ισχύ του διαλύτη, τη θερμοκρασία και το χρόνο (Stoler & Michael, 1995).

Η βάση για αυτήν την πτυχή της μοριακής βιολογίας είναι η δομή του DNA που προτάθηκε για πρώτη φορά από τους Watson & Crick (1953). Η δουλειά τους έδειξε ότι το DNA αποτελείται από δύο αντιπαράλληλους κλώνους νουκλεϊνικού οξέος που τυλίγονται σε διπλή έλικα με έναν εξωτερικό σκελετό πολυανιονικού φωσφορικού άλατος και μια εσωτερική σύνδεση των τεσσάρων συστατικών βάσεων. Αυτές οι βάσεις στοιβάζονται στο κατακόρυφο επίπεδο της έλικας με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και συνδέονται στο οριζόντιο επίπεδο σύμφωνα με τους κανόνες ζευγαρώματος βάσης: οι βάσεις πουρίνης, γουανίνης και αδερίνης πρέπει να δημιουργήσουν ζεύγη βάσεων με βάσεις πυριμιδίνης, κυτοσίνης και θυμιδίνης αντίστοιχα. Το βήμα περιορισμού του ρυθμού του υβριδισμού είναι η αρχική συσχέτιση μεταξύ δύο αντιπαράλληλων κλώνων νουκλεϊκού οξέος που είναι ικανοί να δημιουργήσουν συμπληρωματικά ζεύγη βάσεων, μια διαδικασία που ονομάζονται πυρήνωση (αγγλ.: *nucleation*) (Flavell, et al., 1974). Η πυρηνική ενέργεια ενισχύεται όταν η συγκέντρωση των δύο συμπληρωματικών κλώνων είναι υψηλή και όταν παρέχεται επαρκής χρόνος για να βρεθούν οι δύο κλώνοι μεταξύ τους. Αυτές οι δύο παράμετροι είναι κρίσιμες για την κινητική της αντίδρασης, ενώ γενικά ο υβριδισμός ευνοείται από την αύξηση μίας ή και των δύο αυτών παραμέτρων (Stoler & Michael, 1995).

#### *In situ υβριδισμός*

Οι τεχνικές μοριακού υβριδισμού σε συνδυασμό με ηλεκτρόνια, φως ή συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με λέιζερ ονομάζονται δοκιμές υβριδισμού *in situ* (ελλ.: *σε θέση*), και ουσιαστικά σημαίνουν την παραγωγή υβριδίων μέσω διασταυρώσεων (Looi & Cheah, 1992). Έχουν εφαρμοστεί ως επί το πλείστον για τη μελέτη εντοπισμού ιοειδών υποκυτταρικής θέσης (Stoler & Michael, 1995). Στη βιολογία μοριακών κυττάρων, ο *in situ* υβριδισμός σημαίνει την ανίχνευση

συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA ή RNA σε τμήματα ιστού ή παρασκευάσματα κυττάρων χρησιμοποιώντας ανιχνευτές υβριδοποίησης υπό κατάλληλες συνθήκες, οι οποίοι θα υβριδοποιήσουν το DNA-στόχο ή το RNA που θα οπτικοποιηθεί από ραδιενεργές ή μη ραδιενεργές ενδείξεις ενσωματωμένες στον ανιχνευτή. Είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την εξέταση DNA και RNA στο τοπογραφικό τους περιβάλλον (Ehtisham, et al., 2016).

### *Υβριδισμός αποτύπωσης κηλίδας*

Ο υβριδισμός αποτύπωσης κηλίδας (αγγλ.: *dot-blot hybridization*) είναι η πιο συνηθισμένη μορφή υβριδισμού, η οποία περιλαμβάνει την άμεση εφαρμογή ενός διαλύματος νουκλεϊκού οξέος σε ένα στερεό υπόστρωμα, όπως μεμβράνες νιτροκυτταρίνης ή νάιλον, και την επακόλουθη εξεύρεση με τους κατάλληλους ειδικούς ανιχνευτές. Η χρήση μη ραδιενεργών προδρόμων για την ένδειξη των νουκλεϊκών οξέων έχει κάνει την τεχνική μοριακού υβριδισμού πιο προσιτή, ενώ οι πρώτοι μη ισοτοπικοί ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν για τη συνηθισμένη διάγνωση ιοειδών αναπτύχθηκαν μέσω βιοτινυλίωσης με φωτοβιοτίνη σε φορείς πλασμιδίου που περιείχαν ένθετα ιοειδή μονομερή (Pallas, et al., 2011).

### *Υβριδισμός κατά Southern*

Ο υβριδισμός κατά Southern χρησιμοποιείται για την επαλήθευση της παρουσίας ή της απουσίας συγκεκριμένης αλληλουχίας νουκλεοτιδίων στο DNA από διαφορετικές πηγές. Το DNA απομονώνεται από κάθε πηγή, στη συνέχεια υποβάλλεται σε πέψη με ένα ειδικό ένζυμο περιορισμού, ενώ τα θραύσματα DNA που προκύπτουν φορτώνονται σε πήκτωμα αγαρόζης και διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σύμφωνα με το μέγεθος, με τα μικρότερα θραύσματα να διασπείρονται γρηγορότερα από τα μεγαλύτερα θραύσματα. Τα θραύσματα καθίστανται ορατά μέσω της χρήσης βρωμιούχου αιθιδίου υπό υπεριώδες φως (το βρωμιούχο αιθίδιο φθορίζει υπό υπεριώδες φως όταν παρεμβάλλεται στην κύρια αύλακα του DNA ή του RNA). Το DNA μετά μεταφέρεται από το πήκτωμα αγαρόζης σε μια μεμβράνη (νάιλον ή νιτροκυτταρίνη) και

μετουσιώνεται για την παραγωγή μονών κλώνων. Ένας ανιχνευτής νουκλεϊκού οξέος επισημαίνεται, συνήθως με ενσωμάτωση ραδιενέργειας ή επισήμανση του μορίου με βάμμα φθορισμού, ενώ στη συνέχεια ο επισημασμένος ανιχνευτής συνδέεται με συμπληρωματικό DNA στην μεμβράνη. Για την ανίχνευση της θέσης του επισημασμένου ανιχνευτή, η μεμβράνη καλύπτεται με ένα φιλμ ακτίνων X και μετά την ανάπτυξη η θέση του γίνεται ορατή (van Heerden, 2018).

### 5.3 ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 5.3.1 ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ATP

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός της τριφωσφορικής αδενοσίνης (αγγλ.: *ATP / adenosine triphosphate*) μέσω της λουσιφεράσης (McElroy, 1947) είναι μια γρήγορη και εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της μικροβιακής βιομάζας (Hamilton & Holm-Hansen, 1967; Holm-Hansen, 1970; Holm-Hansen & Booth, 1966). Η επιτυχία αυτής της ανάλυσης εξαρτάται από την ικανότητα του ερευνητή να εξαγάγει τα νουκλεοτίδια από τα κύτταρα με συνεπή και αξιόπιστο τρόπο, αν και δεν έχει βρεθεί καμία μέθοδος εξαγωγής που να μπορεί να εφαρμοστεί σε κάθε δείγμα. Οι απαιτήσεις για καλή ανίχνευση και προσδιορισμό είναι οι ακόλουθες είναι:

- Ο γρήγορος κυτταρικός θάνατος και λύση.
- Η πλήρης απελευθέρωση νουκλεοτιδίων.
- Η πλήρης και μη αναστρέψιμη απενεργοποίηση της δραστηρικής ενζυμικής αποικοδόμησης.
- Η μακροπρόθεσμη σταθερότητα των εκχυλισθέντων νουκλεοτιδίων (Nieto, et al., 1997).

Η καλύτερη μέθοδος εξαγωγής είναι αυτή που δίνει την υψηλότερη απόδοση ATP (Lundin & Thore, 1975).

Οι μέθοδοι εξαγωγής μπορούν να ταξινομηθούν ως εξής:

- Υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα.

- Ανόργανα οξέα.
- Οργανικοί διαλύτες.
- Ανόργανες βάσεις (Karl, 1980).

### 5.3.2 ΒΙΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

Ο βιοφθορισμός είναι η απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (φως) σε ένα μήκος κύματος ακολουθούμενη από την επανάληψη της σε χαμηλότερη ενέργεια και μεγαλύτερο μήκος κύματος από έναν ζωντανό οργανισμό. Έχει διαπιστωθεί ότι ο βιοφθορισμός παρουσιάζει μια εντυπωσιακή διακύμανση στο φθορίζον μοτίβο του και τα κύρια μήκη κύματος που εκπέμπονται ως απόκριση στο μπλε φως διέγερσης βρίσκονται εντός του φάσματος του πράσινου φωτός. Ο εκτεταμένος βιοφθορισμός σε όλη την ακτινοβολία του είναι ένα φαινόμενο για το οποίο δεν έχει διεξαχθεί ακόμη εκτεταμένη έρευνα, αλλά θα μπορούσε να έχει σημαντικές επιπτώσεις για τις μεθόδους ανίχνευσης και χαρακτηρισμού των μικροοργανισμών (Lamb & Davis, 2020). Η αντίδραση που αποδίδει το φως καταλύεται από τη λουσιφεράση και περιλαμβάνει την οξείδωση μειωμένης φωσφορικής ριβοφλαβίνης και αλδεΐδης μακράς αλυσίδας παρουσία οξυγόνου για την παραγωγή γαλάζιου πράσινου φωτός.

Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή λουσιφεράσης (*lux A* και *lux B*), τη σύνθεση της αλδεΐδης (*lux C*, *lux D* και *lux E*) και τη ρύθμιση της φωταύγειας (*lux I* και *lux R*) έχουν όλα ταυτοποιηθεί, ενώ άλλες έρευνες έχουν οδηγήσει σε την ανακάλυψη τριών νέων γονιδίων (*lux F*, *lux G* και *lux H*). Η ικανότητα γενετικής τροποποίησης των σκοτεινών μικροοργανισμών ώστε να εκπέμπουν φως εισάγοντας τα γονίδια *lux* σε αυτούς έχει ανοίξει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών βιοφωταύγειας, με τις πειραματικές δοκιμές που χρησιμοποιούν βακτηριακό βιοφθορισμό για την ανίχνευση και την απαρίθμηση μικροοργανισμών να είναι γρήγορες, ακριβείς και δυνητικά συγκεκριμένες, γεγονός το οποίο τις καθιστά εφαρμόσιμες και στο κομμάτι της ανίχνευσης μικροοργανισμών σε τρόφιμα (Baker, et al., 1992).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Η μόλυνση από βακτηρία που σχηματίζουν σπόρια προκαλεί υψηλές οικολογικές απώλειες στη βιομηχανία τροφίμων και ζωοτροφών. Η αποστείρωση ήταν και παραμένει ένα ευρέως γνωστό και αποτελεσματικό μέσο διατήρησης των τροφίμων ενάντια των θερμοφίλων ή θερμοανθεκτικών βακτηρίων που αποτελούν συνήθεις παράγοντες στην αλλοίωση των τροφίμων. Σήμερα, η ζήτηση των καταναλωτών για συντήρηση των οργανοληπτικών, θρεπτικών και υγειονομικών ιδιοτήτων του τροφίμου έχει αυξηθεί σημαντικά. Κατά συνέπεια, η βιομηχανία τροφίμων έχει εξελίξει πλέον τεχνολογίες τροποποιήσεις των υλικών συσκευασίας και αποθήκευσης (αντικατάσταση μεταλλικών κουτιών από ανθεκτικά στη θερμότητα πλαστικά, επένδυση κονσερβών κ.λπ.) καθώς και διαδικασίες επεξεργασίας (παστερίωση, αφυδάτωση, κ.λπ.). Ωστόσο, οι τροποποιήσεις αυτές έχουν συνδεθεί με την παραγωγή ρύπων και νέων μολυσματικών ουσιών. Επομένως, η επιστημονική κοινότητα χρειάζεται αυξημένη γνώση για την οικολογία και την φυσιολογία των βακτηρίων ώστε να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά οι νέες απειλές. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι με τους οποίους μπορούμε να εμποδίσουμε την βακτηριακή μόλυνση. Ένας από αυτούς είναι η εστίαση στην πηγή της μόλυνσης και η χρήση συνδυασμένων επεξεργασιών με σκοπό την μείωση της βλάστησης και της μικροβιακής ανάπτυξης. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τον σχηματισμό σπορίων στα τρόφιμα πρέπει να είναι γνωστοί στους επιστήμονες τροφίμων, ώστε να μπορούν να εστιάσουν και να εξαλείψουν αποτελεσματικά την μόλυνση. Συμπερασματικά, η ανασκόπηση αυτή παρέχει πληροφορίες για μικροβιολόγους τροφίμων σχετικά με τα βακτηριακά είδη που σχηματίζουν σπόρια στα



αντίστοιχα τρόφιμα υπό συγκεκριμένες συνθήκες ενώ παράλληλα παρέχει πληροφορίες για την δομή και τα χαρακτηριστικά των σπορογόνων βακτηρίων καθώς και τις τεχνικές με τις οποίες οι επιστήμονες έχουν καταφέρει να εμφανίσουν με λεπτομέρεια τις δομές αυτές.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Al-Qahtani, W. H., n.d. Clostridium, Riyadh: King Saud University.

An, S.-Y. και συν., 2007. Sporosarcina saromensis sp. nov., an aerobic endospore-forming bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Issue 57, pp. 1868-1871.

Aquino de Muro, M. & Priest, F. G., 2000. Construction of chromosomal integrants of Bacillus sphaericus 2362 by conjugation with Escherichia coli. Research in Microbiology, Issue 151, pp. 547-555.

Ashiuchi, M. και συν., 2006. Genetically engineered poly-gamma-glutamate producer from Bacillus subtilis ISW1214. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Issue 70, pp. 1794-1797.

Atkinson, W., Hamborsky, J., McIntyre, L. & Wolfe, S., 2006. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases (The Pink Book) 10<sup>th</sup>. 10<sup>th</sup> επμ. s.l.:Public Health Foundation.

Aüllo, T., Ranchou-Peyruse, A., Ollivier, B. & Magot, M., 2013. Desulfotomaculum spp. and related gram-positive sulfate-reducing bacteria in deep subsurface environments. Frontiers in Microbiology, 2 Δεκέμβριος, Issue 4, p. 362.

Aureli, P. και συν., 1986. Two cases of type E infant botulism caused by neurotoxic Clostridium botulinum in Italy. Journal of Infectious Diseases, Issue 154, pp. 207-211.

Barlow, S. και συν., 2005. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. EFSA Journal, Issue 226, pp. 1-12.

Barth, H., Aktories, K., Popoff, M. & Stiles, B., 2004. Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common Clostridium and Bacillus proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Issue 68, pp. 373-402.

- Blount, K. F. & Breaker, R. R., 2007. Riboswitches as antibacterial drug targets. *Nature Biotechnology*, Issue 24, pp. 1558-1564.
- Brook, I., 2007. The role of anaerobic bacteria in cutaneous and soft tissue abscesses and infected cysts. *Anaerobe*, Issue 13, pp. 171-177.
- Bruckner, R., 1992. series of shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Gene*, Issue 122, pp. 187-192.
- Bruggemann, H. & Gottschalk, G., 2009. *Clostridia: Molecular Biology in the Post-genomic Era*. s.l.:Caister Academic Press.
- Bunyapaiboonsri, T. και συν., 2003. Generation of biscationic heterocyclic inhibitors of *Bacillus subtilis* HPr kinase/phosphatase from a ditopic dynamic combinatorial library. *Journal of Medicinal Chemistry*, Issue 46, pp. 5803-5811.
- Campbell, L. L. & Postgate, J. R., 1965. Classification of the spore-forming sulfate-reducing bacteria. *Bacteriological Reviews*, Issue 29, pp. 359-363.
- Cano, R. J. & Borucki, M. K., 1995. Revival and identification of bacterial spores in 25-to 40-million-year-old Dominican amber. *Science*, Issue 268, pp. 1060-1064.
- Cavaglieri, L. και συν., 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology*, Issue 156, pp. 748-754.
- Chivian, D. και συν., 2008. Environmental genomics reveals a single-species ecosystem deep within earth. *Science*, Issue 322, pp. 275-278.
- Choi, Y.-J., Wang, T.-T. & Lee, B. H., 2002. Positive selection vectors. *Critical Reviews in Biotechnology*, Issue 22, pp. 225-244.
- Christou, P. και συν., 2006. Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. *Trends in Plant Science*, Issue 11, pp. 302-308.
- Curry, J., 2008. Pseudomembranous Colitis. [Ηλεκτρονικό]  
Available at:  
<http://www.emedicine.com/med/topic1942.htm#section~introduction>  
[Πρόσβαση 29 Απρίλιος 2021].

- Dale, G. E. και συν., 1995. Cloning and characterization of a novel, plasmid-encoded trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase from *Staphylococcus haemolyticus* MUR313. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Issue 39, pp. 1920-1924.
- Doyle, M. P., 2007. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. s.l.:ASM Press.
- Dubnau, D., 1991. Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiological Reviews*, Issue 55, pp. 395-424.
- El Bendary, M. A., 2006. *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. *Journal of Basic Microbiology*, Issue 46, pp. 158-170.
- Ferreira, L. C. S., Ferreira, R. C. C. & Schumann, W., 2005. *subtilis* as a tool for vaccine development: from antigen factories to delivery vectors. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Issue 77, pp. 113-124.
- Fredrickson, J. K. & Balkwill, D. L., 2006. Geomicrobial processes and biodiversity in the deep terrestrial subsurface. *Geomicrobiology Journal*, Issue 23, pp. 345-356.
- Gange, A. C. & Hagley, K. J., 2004. The potential for use of *Bacillus* spp. in sports turf management. Στο: E. Ricca, A. O. Henriques & S. M. Cutting, επιμ. *Bacterial Spore Formers: Probiotics and Emerging Application*. Norfolk: Horizon Bioscience, pp. 163-170.
- Garrity, G. M. & Holt, J. G., 2001. The road map to the Manual. Στο: D. R. Boone, R. W. Castenholz & G. M. Garrity, επιμ. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd επιμ. New York: Springer, pp. 119-166.
- Gerdes, S. και συν., 2002. From Genetic Footprinting to Antimicrobial Drug Targets: Examples in Cofactor Biosynthetic Pathways. *Journal of Bacteriology*, Σεπτέμβριος, Issue 184, pp. 4555-4572.
- Goldstein, M. A. & Doi, R. H., 1995. Prokaryotic promoters in biotechnology. *Biotechnology Annual Review*, Issue 1, pp. 105-128.
- Gordon, R. E., 1989. The Genus *Bacillus*. Στο: W. M. O' Leary, επιμ. *Practical Handbook of Microbiology*. Boca Raton: CRC Press, pp. 109-126.
- Hall, J. D., McCroskey, L. M., Pincomb, B. J. & Hatheway, C. L., 1985. Isolation of an organism resembling *Clostridium baratii* which produces a type F botulinum toxin

from an infant with botulism. *Journal of Clinical Microbiology*, Issue 21, pp. 654-655.

Hamoen, L. W., Venema, G. & Kuipers, O. P., 2003. Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology*, Issue 149, pp. 9-17.

Hatheway, C. L., 1990. Toxigenic clostridia. *Clinical Microbiology Reviews*, Issue 3, pp. 66-98.

Hatheway, C. L. & McCroskey, M. L., 1987. Examination of faeces for diagnosis of infant botulism in 336 patients. *Journal of Clinical Microbiology*, Issue 25, pp. 2334-2338.

Hickson, M. και συν., 2007. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: Randomised double blind placebo controlled trial. *British Medical Journal*, Issue 335, p. 80.

Holzapfel, W. H. & Botha, S. J., 1988. Physiology of *Sporolactobacillus* strains isolated from different habitats and the indication of in vitro antagonism against *Bacillus* species. *International Journal of Food Microbiology*, Issue 7, pp. 161-168.

Hong, H. A., Duc, L. H. & Cutting, S. M., 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, Issue 29, pp. 813-835.

Huang, H.-Y. και συν., 2007. Basic characteristics of *Sporolactobacillus inulinus* BCRC 14647 for potential probiotic properties. *Current Microbiology*, Issue 54, pp. 396-404.

Isaksen, M. F., Bak, F. & Jørgensen, B. B., 1994. Thermophilic sulfate-reducing bacteria in cold marine sediment. *FEMS Microbiology Ecology*, Issue 14, pp. 1-8.

Jensen, G. B. και συν., 1996. The aggregation-mediated conjugation system of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*: host range and kinetics of transfer. *Current Microbiology*, Issue 33, pp. 228-236.

Johnson, S. S. και συν., 2007. Ancient bacteria show evidence of DNA repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Issue 104, pp. 14401-14405.

Jørgensen, B. B. & Boetius, A., 2007. Starvation and famine-microbial life in the deep-sea bed. *Nature Reviews Microbiology*, Issue 5, pp. 770-781.

Juckett, G., Bardwell, G., McClane, B. & Brown, S., 2008. Microbiology of salt rising bread. *The West Virginia Medical Journal*, Issue 104, pp. 26-27.

Just, I., Selzer, J., von Eichel-Streiber, C. & Aktories, K., 1995. The low molecular mass GTP-binding protein Rho is affected by toxin A from *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Investigation*, Μάρτιος, Issue 95, pp. 1026-1031.

Kaksonen, A. H. και συν., 2007. *Desulfurispora thermophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, spore-forming sulfate-reducer isolated from a sulfidogenic fluidized-bed reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Issue 57, pp. 1089-1094.

Keto-Timonen, R., Heikinheimo, A., Eerola, E. & Korkeala, H., 2006. Identification of *Clostridium* Species and DNA Fingerprinting of *Clostridium perfringens* by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, Νοέμβριος, Issue 44, pp. 4057-4065.

Kitahara, K. & Suzuki, J., 1963. *Sporolactobacillus* nov. subgen. *The Journal of General and Applied Microbiology*, Issue 9, pp. 59-71.

Kitahara, K. & Toyota, T., 1972. Auto-spheroplastization and cell-permeation. *The Journal of General and Applied Microbiology*, Issue 18, pp. 99-107.

Kluyver, A. J. & van Niel, C. B., 1936. Prospects for a natural classification of bacteria. *Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*, Issue 94, pp. 369-403.

Kotiranta, A., Lounatmaa, K. & Haapasalo, M., 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection*, Issue 2, pp. 189-198.

Kuever, J. & Rainey, F. A., 2009. Genus VII. *Desulfotomaculum*. Στο: P. de Vos, και συν. επμ. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 3: The Firmicutes. New York: Springer, pp. 989-996.

Le Breton, Y., Mohapatra, N. P. & Haldenwang, W. G., 2006. In vivo random mutagenesis of *Bacillus subtilis* by use of TnYLB-1, a mariner-based transposon. *Applied and Environmental Microbiology*, Issue 72, pp. 327-333.

Lee, G. & Pero, J., 1981. Conserved nucleotide sequences in temporally controlled bacteriophage promoters. *Journal of Molecular Biology*, Issue 152, pp. 247-265.

Lindahl, T., 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, Issue 362, pp. 709-715.

Lin, L. H. και συν., 2005. Radiolytic H<sub>2</sub> in continental crust: nuclear power for deep subsurface microbial communities. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, Issue 6, pp. 70-73.

Lomstein, B. A. & Jørgensen, B. B., 2012. Pre-column liquid chromatographic determination of dipicolinic acid from bacterial endospores. *Limnology and Oceanography: Methods*, Issue 10, pp. 227-233.

Madigan, M. & Martinko, J., 2005. *Brock Biology of Microorganisms*. 11th εκμ. s.l.:Prentice Hall.

Magot, M., Ollivier, B. & Patel, B. K., 2000. Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Issue 77, pp. 103-116.

Mehlo, L. και συν., 2005. An alternative strategy for sustainable pest resistance in genetically enhanced crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Ιούλιος, Issue 102, pp. 7812-7816.

Meima, R. B., van Dijk, J. M., Holsappel, S. & Bron, S., 2004. Expression systems in *Bacillus*. Στο: F. Baneyx, εκμ. *Protein Expression Technologies: Current Status and Future Trends*. Wymondham: Horizon Bioscience, pp. 199-252.

Mongkolthanaruk, W., 2012. Classification of *Bacillus* Beneficial Substances Related to Plants, Humans and Animals. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, Issue 22, pp. 1597-1604.

Murray, P., Rosenthal, K. S. & Pfaller, M. A., 2009. *Medical Microbiology*. 6th εκμ. Mosby: Elsevier.

Nakayama, O. & Yanoshi, M., 1967. Spore-bearing lactic acid bacteria isolated from rhizosphere. II. Taxonomic studies on the catalase-negative strains. *The Journal of General and Applied Microbiology*, Issue 13, pp. 155-165.

Nealson, K. H. & Ford, J., 1980. Surface enhancement of bacterial manganese oxidation: Implications for aquatic environments. *Geomicrobiology Journal*, Issue 2, pp. 21-37.

Nielsen, J. E. & Borchert, T. V., 2000. Protein engineering of bacterial alpha-amylases. *Biochimica et Biophysica Acta*, Issue 1543, pp. 253-274.

Notermans, S. & Havellar, A. H., 1980. Removal and inactivation of botulinum toxin during production of drinking water from surface water. *Antonie van Leeuwenhoek*, Issue 46, pp. 511-514.

Num, S. M. & Useh, N. M., 2014. Clostridium: Pathogenic Roles, Industrial Uses and Medicinal Prospects of Natural Products as Ameliorative Agents against Pathogenic Species. *Jordan Journal of Biological Sciences*, Issue 7, pp. 81-94.

Olempska-Beer, Z. S., Merker, R. I., Ditto, M. D. & DiNovi, M. J., 2006. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms - A review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Issue 45, pp. 144-158.

Ollivier, B. & Alazard, D., 2010. The oil reservoir ecosystem. Στο: K. N. Timmis, επιμ. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Berlin: Springer-Verlag, pp. 262-2268.

Pedersen, K., 1997. Microbial life in deep granitic rock. *FEMS Microbiology Ecology*, Issue 20, pp. 399-414.

Perkins, J. B. & Pragai, Z., 2004. Production of pantothenate using microorganisms incapable of sporulation. s.l., World Patent Application.

Perkins, J. B. και συν., 1999. Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of riboflavin. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Ιανουάριος, Issue 22, pp. 8-18.

Perkins, J. B. & Youngman, P. J., 1983. Streptococcus plasmid pAMβ1 is a composite of two separable replicons, one of which is closely related to *Bacillus* plasmid pBC16. *Journal of Bacteriology*, Issue 155, pp. 607-615.

Perkins, J., Wyss, M., Sauer, W. & Hohmann, H.-P., 2008. Metabolic engineering in *Bacillus subtilis*. Στο: C. Smolke, επιμ. *The Metabolic Pathway Engineering Handbook*. Boca Raton: CRC Press, pp. 379-426.



Pero, J. & Sloma, A., 1993. Proteases. Στο: A. L. Sonenshein, J. A. Hoch & R. Losick, επιμ. *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics*. Washington: American Society for Microbiology, pp. 939-952.

Phelps, R. J. & McKillip, J. L., 2002. Enterotoxin production in natural isolates of Bacillaceae outside the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*, Issue 68, pp. 3147-3151.

Priyodip, P. & Balaji, S., 2019. A Preliminary Study on Probiotic Characteristics of *Sporosarcina* spp. for Poultry Applications. *Current Microbiology*, Απρίλιος, Issue 76, pp. 448-461.

Roehr, B., 2007. Alcohol Rub, Antiseptic Wipes Inferior at Removing *Clostridium difficile*. [Ηλεκτρονικό]

Available at: <https://www.medscape.com/viewarticle/563232>

[Πρόσβαση 29 Απρίλιος 2021].

Ryan, K. J. & Ray, C. G., 2004. *Sherris Medical Microbiology*. 4th επιμ. s.l.:McGraw - Hill.

Sanders, M. E., Morelli, L. & Tompkins, T. A., 2003. poreformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Issue 2, pp. 101-110.

Satterfield, B. A. και συν., 2010. A quadruplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of the *Clostridium botulinum* toxin genes A, B, E and F. *Journal of Medical Microbiology*, Issue 59, pp. 55-64.

Savidge, T. C. και συν., 2011. Host S-nitrosylation inhibits clostridial small molecule-activated glucosylating toxins. *Nature Medicine*, Issue 17, pp. 1136-1141.

Schallmeyer, M., Singh, A. & Ward, O. P., 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, Issue 50, pp. 1-17.

- Schallmeyer, M., Singh, A. & Ward, O. P., 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Journal of Canadian Microbiology*, Issue 50, pp. 1-17.
- Schnepf, E. και συν., 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Οκτώβριος, Issue 62, pp. 775-806.
- Schoeni, J. L. & Wong, A., 2005. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *Journal of Food Protection*, Issue 68, pp. 636-648.
- Stackebrandt, E. και συν., 1997. Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Issue 47, pp. 1134-1139.
- Steinmetz, M. & Richter, R., 1994. Easy cloning of mini-Tn10 insertions from *Bacillus subtilis* chromosome. *Journal of Bacteriology*, Issue 176, pp. 1761-1763.
- Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, Issue 56, pp. 845-857.
- Tanzi, M. G. & Gabay, M. P., 2002. Association between honey consumption and infant botulism. *Pharmacotherapy*, Issue 22, pp. 1479-1483.
- Tebo, B. M. & Obratzsova, A. Y., 1998. sulfate-reducing bacterium grows with cr(vi), u(vi), mn(iv), and fe(iii) as electron acceptors. *FEMS Microbiology Letters*, Issue 162, pp. 193-198.
- Todar, K., 2005. *Pathogenic Clostridia: Ken Todar's Microbial World*. Madison: University of Wisconsin.
- Tominaga, T., An, S.-Y., Oyaizu, H. & Yokota, A., 2009. *Sporosarcina luteola* sp. nov. isolated from soy sauce production equipment in Japan. *The Journal of General and Applied Microbiology*, Issue 55, pp. 217-223.
- Tye, A., Siu, F., Leung, T. & Lim, B., 2002. Molecular cloning and the biochemical characterization of two novel phytases from *B. subtilis* 168 and *B. licheniformis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Issue 59, pp. 190-197.

- Ugoji, E. O., Laing, M. D. & Hunter, C. H., 2005. Colonization of *Bacillus* spp. on seeds and in the plant rhizosphere. *Journal of Environmental Biology*, Issue 26, pp. 459-466.
- Vary, P., 1994. Prime time for *Bacillus megaterium*. *Microbiology*, Issue 140, pp. 1001-1013.
- Visser, M. και συν., 2014. Genome analyses of the carboxydrotrophic sulfate-reducers *Desulfotomaculum nigrificans* and *Desulfotomaculum carboxydivorans* and reclassification of *Desulfotomaculum carboxydivorans* as a later synonym of *Desulfotomaculum nigrificans*. *Standards in Genomic Sciences*, Issue 9, pp. 655-675.
- Vreeland, R. H., Rosenzweig, W. D. & Powers, D. W., 2000. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature*, Issue 407, pp. 897-900.
- Warrell, D. A., Cox, T. M. & Firth, J. D., 2003. *Oxford Textbook of Medicine*. 4th επιμ. σ.λ.:Oxford University Press.
- Watanabe, M., Kojima, H. & Fukui, M., 2017. *Desulfococcus palustris* gen.nov., sp. nov., a mesophilic sulfate reducer belonging to *Desulfotomaculum* subcluster Ig. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Issue 67, pp. 2679-2682.
- Watanabe, M., Kojima, H. & Fukui, M., 2018. Review of *Desulfotomaculum* species and proposal of the genera *Desulfallas* gen. nov., *Desulfofundulus* gen. nov., *Desulfofarcimen* gen. nov. and *Desulfohalotomaculum* gen. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Issue 68, pp. 2891-2899.
- Wells, C. L. & Wilkins, T. D., 1996. *Clostridia: Sporeforming Anaerobic Bacilli*. Στο: S. Baron, επιμ. *Medical Microbiology*. 4th επιμ. Texas: University of Texas Medical Branch.
- Wu, S. C. και συν., 2002. Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*: effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production. *Applied and Environmental Microbiology*, Issue 68, pp. 3261-3269.

Yanagida, F. και συν., 1987. Morphological, biochemical, and physiological characteristics of spore-forming lactic acid bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, Issue 33, pp. 33-45.

Yu, Y. και συν., 2008. *Sporosarcina antarctica* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from the Antarctic. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Issue 58, pp. 2114-2117.

Zeigler, D. R. & Perkins, J. B., 2009. The Genus *Bacillus*. Στο: E. Goldman & L. H. Green, επμ. *Practical Handbook of Microbiology*. 2η επμ. Boca Raton: CRC Press, pp. 309-337.

MURPHY, P. M., LYNCH, D., & KELLY, P. M. (1999). Growth of thermophilic spore forming bacilli in milk during the manufacture of low heat powders. *International Journal of Dairy Technology*, 52(2), 45–50.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1999.tb02069.x>

André, S., Vallaëys, T., & Planchon, S. (2017). Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. *Research in Microbiology*, 168(4), 379–387.  
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.10.003>

Gauvry, E., Mathot, A. G., Leguérinel, I., Couvert, O., Postollec, F., Broussolle, V., & Coroller, L. (2017). Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria can explain the origin of spores in the food environment. *Research in Microbiology*, 168(4), 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.10.006>

Janganan, T. K., Mullin, N., Dafis-Sagarmendi, A., Brunt, J., Tzokov, S. B., Stringer, S., Moir, A., Chaudhuri, R., Fagan, R. P., Hobbs, J. K., & Bullough, P. A. (2020). Architecture and self-assembly of the *Clostridium sporogenes/botulinum* spore surface illustrate a general protective strategy across spore formers. *BioRxiv*, 5(4), 1–17. <https://doi.org/10.1101/2020.01.14.906404>

Carlin, F. (2011). Origin of bacterial spores contaminating foods. In *Food Microbiology* (Vol. 28, Issue 2, pp. 177–182). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.008>

InVS. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. 2013. <http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=1692627>

Madslie, E. H., Rønning, H. T., Lindbäck, T., Hassel, B., Andersson, M. A., & Granum, P. E. (2013). Lichenysin is produced by most *Bacillus licheniformis* strains. *Journal of Applied Microbiology*, *115*(4), 1068–1080. <https://doi.org/10.1111/jam.12299>

Andersson, A., Rønner, U., & Granum, P. E. (1995). What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International Journal of Food Microbiology*, *28*(2), 145–155. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00053-4](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00053-4)

Auger, S., Ramarao, N., Faille, C., Fouet, A., Aymerich, S., & Gohar, M. (2009). Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(20), 6616–6618. <https://doi.org/10.1128/AEM.00155-09>

Heyndrickx, M. (2011). The Importance of Endospore-Forming Bacteria Originating from Soil for Contamination of Industrial Food Processing. *Applied and Environmental Soil Science*, *2011*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2011/561975>

Veening, J. W., Murray, H., & Errington, J. (2009). A mechanism for cell cycle regulation of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Genes and Development*, *23*(16), 1959–1970. <https://doi.org/10.1101/gad.528209>

Piggot, P. J., & Hilbert, D. W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. In *Current*

*Opinion in Microbiology* (Vol. 7, Issue 6, pp. 579–586). Elsevier Current Trends.  
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.10.001>

Postollec, F., Mathot, A. G., Bernard, M., Divanac'h, M. L., Pavan, S., & Sohier, D. (2012). Tracking spore-forming bacteria in food: From natural biodiversity to selection by processes. *International Journal of Food Microbiology*, *158*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.004>

Watterson, M. J., Kent, D. J., Boor, K. J., Wiedmann, M., & Martin, N. H. (2014). Evaluation of dairy powder products implicates thermophilic sporeformers as the primary organisms of interest. *Journal of Dairy Science*, *97*(4), 2487–2497. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7363>

Miller, R. A., Kent, D. J., Watterson, M. J., Boor, K. J., Martin, N. H., & Wiedmann, M. (2015). Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. *Journal of Dairy Science*, *98*(12), 8492–8504. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9943>

SCOTT, S. A., BROOKS, J. D., RAKONJAC, J., WALKER, K. M. R., & FLINT, S. H. (2007). The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. *International Journal of Dairy Technology*, *60*(2), 109–117. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2007.00309.x>

De Hoon, M. J. L., Eichenberger, P., & Vitkup, D. (2010). Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network. In *Current Biology* (Vol. 20, Issue 17, pp. R735–R745). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.06.031>

Talukdar, P. K., Olguín-Araneda, V., Alnoman, M., Paredes-Sabja, D., & Sarker, M. R. (2015). Updates on the sporulation process in *Clostridium* species. In *Research*

*in Microbiology* (Vol. 166, Issue 4, pp. 225–235). Elsevier Masson SAS.  
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.12.001>

Galperin, M. Y., Mekhedov, S. L., Puigbo, P., Smirnov, S., Wolf, Y. I., & Rigden, D. J. (2012). Genomic determinants of sporulation in *Bacilli* and *Clostridia* : towards the minimal set of sporulation-specific genes. *Environmental Microbiology*, *14*(11), 2870–2890. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02841.x>

Sonenshein, A. L. (2005). CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 8, Issue 2, pp. 203–207). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.01.001>

Shih, N.-J., & Labbé, R. G. (2011). Characterization and distribution of amylases during vegetative cell growth and sporulation of *Clostridium perfringens*. [Https://Doi.Org/10.1139/M96-086](https://doi.org/10.1139/M96-086). <https://doi.org/10.1139/M96-086>

Long, S., Jones, D. T., & Woods, D. R. (1984). Initiation of solvent production, clostridial stage and endospore formation in *Clostridium acetobutylicum* P262. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *20*(4), 256–261.  
<https://doi.org/10.1007/BF00250635>

Antunes, A., Camiade, E., Monot, M., Courtois, E., Barbut, F., Sernova, N. V., Rodionov, D. A., Martin-Verstraete, I., & Dupuy, B. (2012). Global transcriptional control by glucose and carbon regulator CcpA in *Clostridium difficile*. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 40, Issue 21, pp. 10701–10718). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1093/nar/gks864>

Varga, J., Stirewalt, V. L., & Melville, S. B. (2004). The CcpA protein is necessary for efficient sporulation and enterotoxin gene (*cpe*) regulation in *Clostridium*

perfringens. *Journal of Bacteriology*, 186(16), 5221–5229.  
<https://doi.org/10.1128/JB.186.16.5221-5229.2004>

Koide, A., Perego, M., & Hoch, J. A. (1999). ScoC regulates peptide transport and sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 181(13), 4114–4117. <https://doi.org/10.1128/jb.181.13.4114-4117.1999>

Shafikhani, S. H., Mandic-Mulec, I., Strauch, M. A., Smith, I., & Leighton, T. (2002). Postexponential regulation of sin operon expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 184(2), 564–571. <https://doi.org/10.1128/JB.184.2.564-571.2002>

Awang, G. M., Ingledew, W. M., & Jones, G. A. (1992). The effect of fermentable carbohydrate on sporulation and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* P262. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(1), 12–16. <https://doi.org/10.1007/BF00169411>

Bischofs, I. B., Hug, J. A., Liu, A. W., Wolf, D. M., & Arkin, A. P. (2009). Complexity in bacterial cell- cell communication: Quorum signal integration and subpopulation signaling in the *Bacillus subtilis* phosphorelay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(16), 6459–6464. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810878106>

Lazazzera, B. A. (2000). Quorum sensing and starvation: Signals for entry into stationary phase. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 3, Issue 2, pp. 177–182). Current Biology Ltd. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00072-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00072-2)

Perego, M. (2001). A new family of aspartyl phosphate phosphatases targeting the sporulation transcription factor Spo0A of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 42(1), 133–143. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02611.x>



Slamti, L., Perchat, S., Huillet, E., & Lereclus, D. (2014). Quorum sensing in *Bacillus thuringiensis* is required for completion of a full infectious cycle in the insect. In *Toxins* (Vol. 6, Issue 8, pp. 2239–2255). MDPI AG.  
<https://doi.org/10.3390/toxins6082239>

Perego, M. (1997). A peptide export-import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(16), 8612–8617. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.16.8612>

Grossman, A. D., & Losick, R. (1988). Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(12), 4369–4373.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.85.12.4369>

Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R., & Kolter, R. (2008). Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes and Development*, 22(7), 945–953. <https://doi.org/10.1101/gad.1645008>

Fujita, M., González-Pastor, J. E., & Losick, R. (2005). High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 187(4), 1357–1368. <https://doi.org/10.1128/JB.187.4.1357-1368.2005>

Rubinstein, S. M., Kolodkin-Gal, I., Mcloon, A., Chai, L., Kolter, R., Losick, R., & Weitz, D. A. (2012). Osmotic pressure can regulate matrix gene expression in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 86(2), 426–436.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08201.x>

Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M., & Herman,

- L. (2012). Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 11, Issue 2, pp. 133–147). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00183.x>
- Sharma, M., & Anand, S. K. (2002). Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry - A case. *Food Control*, *13*(6–7), 469–477. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(01\)00068-8](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(01)00068-8)
- Wijman, J. G. E., De Leeuw, P. P. L. A., Moezelaar, R., Zwietering, M. H., & Abee, T. (2007). Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, sporulation, and dispersion. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(5), 1481–1488. <https://doi.org/10.1128/AEM.01781-06>
- Faille, C., Bénézech, T., Midelet-Bourdin, G., Lequette, Y., Clarisse, M., Ronse, G., Ronse, A., & Slomianny, C. (2014). Sporulation of *Bacillus* spp. within biofilms: A potential source of contamination in food processing environments. *Food Microbiology*, *40*, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.12.004>
- Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2013). *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(17), E1621–E1630. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218984110>
- Méndez, M. B., Orsaria, L. M., Philippe, V., Pedrido, M. E., & Grau, R. R. (2004). Novel Roles of the Master Transcription Factors Spo0A and  $\sigma$  B for Survival and Sporulation of *Bacillus subtilis* at Low Growth Temperature. *Journal of*

*Bacteriology*, 186(4), 989–1000. <https://doi.org/10.1128/JB.186.4.989-1000.2004>

Reder, A., Albrecht, D., Gerth, U., & Hecker, M. (2012). Cross-talk between the general stress response and sporulation initiation in *Bacillus subtilis* - the  $\sigma_B$  promoter of *spo0E* represents an AND-gate. *Environmental Microbiology*, 14(10), 2741–2756. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02755.x>

*Handbook on Clostridia - 1st Edition - Peter Duerre - Eric A. Johnso.* (n.d.). Retrieved May 13, 2021, from <https://www.routledge.com/Handbook-on-Clostridia/Duerre/p/book/9780849316180>

Kirk, D. G., Zhang, Z., Korkeala, H., & Lindström, M. (2014). Alternative sigma factors SigF, SigE, and SigG are essential for sporulation in *Clostridium botulinum* ATCC 3502. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(16), 5141–5150. <https://doi.org/10.1128/AEM.01015-14>

Guinebretiere, M. H., Girardin, H., Dargaignaratz, C., Carlin, F., & Nguyen-The, C. (2003). Contamination flows of *Bacillus cereus* and spore-forming aerobic bacteria in a cooked, pasteurized and chilled zucchini purée processing line. *International Journal of Food Microbiology*, 82(3), 223–232. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00307-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00307-0)

Ranieri, M. L., Huck, J. R., Sonnen, M., Barbano, D. M., & Boor, K. J. (2009). High temperature, short time pasteurization temperatures inversely affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4823–4832. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2144>

Diomandé, S. E., Nguyen-The, C., Guinebretière, M. H., Broussolle, V., & Brillard, J. (2015). Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 6, Issue AUG). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00813>

Strauch, M. A., de Mendoza, D., & Hoch, J. A. (1992). *cis*-Unsaturated fatty acids specifically inhibit a signal-transducing protein kinase required for initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *6*(20), 2909–2917. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01750.x>

Nguyen Thi Minh, H., Durand, A., Loison, P., Perrier-Cornet, J. M., & Gervais, P. (2011). Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *90*(4), 1409–1417. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3183-9>

Pheil, C. G., & Ordal, Z. J. (1967). Sporulation of the “thermophilic anaerobes”. *Applied Microbiology*, *15*(4), 893–898. <https://doi.org/10.1128/aem.15.4.893-898.1967>

Wilks, J. C., Kitko, R. D., Cleeton, S. H., Lee, G. E., Ugwu, C. S., Jones, B. D., Bondurant, S. S., & Slonczewski, J. L. (2009). Acid and base stress and transcriptomic responses in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(4), 981–990. <https://doi.org/10.1128/AEM.01652-08>

Cosby, W. M., & Zuber, P. (1997). Regulation of *Bacillus subtilis*  $\sigma^H$  (Spo0H) and AbrB in response to changes in external pH. *Journal of Bacteriology*, *179*(21), 6778–6787. <https://doi.org/10.1128/jb.179.21.6778-6787.1997>

Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., El Jabri, M., Leguerinel, I., Postollec, F., Boulais, C., Carlin, F., & Mafart, P. (2012). Sporulation boundaries and spore formation kinetics of *Bacillus* spp. as a function of temperature, pH and *a<sub>w</sub>*. *Food*

*Microbiology*, 32(1), 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.011>

Ruzal, S. M., López, C., Rivas, E., & Sánchez-Rivas, C. (1998). Osmotic strength blocks sporulation at stage II by impeding activation of early sigma factors in *Bacillus subtilis*. *Current Microbiology*, 36(2), 75–79. <https://doi.org/10.1007/s002849900282>

Grau, R. R., De Oña, P., Kunert, M., Leñini, C., Gallegos-Monterrosa, R., Mhatre, E., Vileta, D., Donato, V., Hölscher, T., Boland, W., Kuipers, O. P., & Kovács, Á. T. (2015). A duo of potassium-responsive histidine kinases govern the multicellular destiny of *Bacillus subtilis*. *MBio*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00581-15>

Couchot, K. R., & Maier, S. (1974). Anaerobic sporulation in facultatively anaerobic species of the genus *Bacillus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 20(10), 1291–1296. <https://doi.org/10.1139/m74-201>

Taylor, B. L., & Zhulin, I. B. (1999). PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), 479–506. <https://doi.org/10.1128/mmbr.63.2.479-506.1999>

Kolodkin-Gal, I., Elsholz, A. K. W., Muth, C., Girguis, P. R., Kolter, R., & Losick, R. (2013). Respiration control of multicellularity in *Bacillus subtilis* by a complex of the cytochrome chain with a membrane-embedded histidine kinase. *Genes and Development*, 27(8), 887–899. <https://doi.org/10.1101/gad.215244.113>

Ahmed, M. (n.d.). *Sporulation and germination of spores of Clostridium perfringens*. Retrieved May 13, 2021, from <https://lib.dr.iastate.edu/rtd>

Tam, N. K. M., Uyen, N. Q., Hong, H. A., Duc, L. H., Hoa, T. T., Serra, C. R., Henriques, A. O., & Cutting, S. M. (2006). The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *Journal of Bacteriology*, *188*(7), 2692–2700. <https://doi.org/10.1128/JB.188.7.2692-2700.2006>

Kihm, D. J., Hutton, M. T., Hanlin, J. H., & Johnson, E. A. (1988). Zinc stimulates sporulation in *Clostridium botulinum* 113B. *Current Microbiology*, *17*(4), 193–198. <https://doi.org/10.1007/BF01589451>

Mah, J. H., Kang, D. H., & Tang, J. (2008). Effects of minerals on sporulation and heat resistance of *Clostridium sporogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, *128*(2), 385–389. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.002>

Abbas, A. A., Planchon, S., Jobin, M., & Schmitt, P. (2014). A new chemically defined medium for the growth and sporulation of *Bacillus cereus* strains in anaerobiosis. *Journal of Microbiological Methods*, *105*, 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.07.006>

López, D., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2009). Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *74*(3), 609–618. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06882.x>

Lan, R., & Kim, I. H. (2019). Effects of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* complex on growth performance and faecal noxious gas emissions in growing-finishing pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(4), 1554–1560. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9333>

- Rowland, S. L., Burkholder, W. F., Cunningham, K. A., Maciejewski, M. W., Grossman, A. D., & King, G. F. (2004). Structure and mechanism of action of Sda, an inhibitor of the histidine kinases that regulate initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Cell*, *13*(5), 689–701. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00084-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00084-X)
- Sahoo, S., Rao, K. K., & Suraishkumar, G. K. (2006). Reactive oxygen species induced by shear stress mediate cell death in *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Bioengineering*, *94*(1), 118–127. <https://doi.org/10.1002/bit.20835>
- Vissers, M. M. M., Driehuis, F., Te Giffel, M. C., De Jong, P., & Lankveld, J. M. G. (2007). Concentrations of butyric acid bacteria spores in silage and relationships with aerobic deterioration. *Journal of Dairy Science*, *90*(2), 928–936. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71576-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71576-X)
- Magnusson, M., Christiansson, A., & Svensson, B. (2007). *Bacillus cereus* spores during housing of dairy cows: Factors affecting contamination of raw milk. *Journal of Dairy Science*, *90*(6), 2745–2754. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-754>
- Kalogridou-Vassiliadou, D. (1992). Biochemical Activities of *Bacillus* Species Isolated from Flat Sour Evaporated Milk. *Journal of Dairy Science*, *75*(10), 2681–2686. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)78030-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)78030-8)
- Abecasis, A. B., Serrano, M., Alves, R., Quintais, L., Pereira-Leal, J. B., & Henriques, A. O. (n.d.). *A Genomic Signature and the Identification of New Sporulation Genes Downloaded from*. *195*, 2101–2115. <https://doi.org/10.1128/JB.02110-12>

*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes - Βιβλία Google*. (n.d.). Retrieved April 16, 2021, from [https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=0-VqgLiCPFcC&oi=fnd&pg=PR1&ots=kIxfAYMn0x&sig=SMmKYyMpRkh9dov2Q\\_zMrTe-oBc&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=0-VqgLiCPFcC&oi=fnd&pg=PR1&ots=kIxfAYMn0x&sig=SMmKYyMpRkh9dov2Q_zMrTe-oBc&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)

McClure, P. J. (2006). Spore-forming bacteria. In *Food spoilage microorganisms* (pp. 579–623). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1533/9781845691417.5.579>

André, S., Zuber, F., & Remize, F. (2013). Thermophilic spore-forming bacteria isolated from spoiled canned food and their heat resistance. Results of a French ten-year survey. *International Journal of Food Microbiology*, *165*(2), 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.019>

Sturges, W. S., & Drake, E. T. (1927). A COMPLETE DESCRIPTION OF CLOSTRIDIUM PUTREFACIENS (McBRYDE). *Journal of Bacteriology*, *14*(3), 175–179. <https://doi.org/10.1128/jb.14.3.175-179.1927>

Clemens, R. M., Adam, K. H., & Brightwell, G. (2010). Contamination levels of *Clostridium estertheticum* spores that result in gaseous spoilage of vacuum-packaged chilled beef and lamb meat. *Letters in Applied Microbiology*, *50*(6), 591–596. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02838.x>

Broda, D. M., Saul, D. J., Lawson, P. A., Bell, R. G., & Musgrave, D. R. (2000). *Clostridium gasigenes* sp. nov., a psychrophile causing spoilage of vacuum-packed meat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *50*(1), 107–118. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-1-107>

Broda, D. M., DeLacy, K. M., Bell, R. G., Braggins, T. J., & Cook, R. L. (1996). Psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with “blown pack” spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. *International Journal of Food Microbiology*, *29*(2–3), 335–352.



[https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00070-4](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00070-4)

Pichner, R., Ziegler, E., Eckardt, S., Kabisch, J., Hechelmann, H., & Gareis, M. (2012). Detection of microorganisms in refrigerated blown pack spoilage: Optimised detection and isolation of *Cl. estertheticum* and *Cl. estertheticum*-like organisms in vacuum-packed beef. [Nachweis von blown pack verursachenden bakterien in gekühltem Rindfleisch: Optimierter nachweis und isolierung von *Cl. estertheticum* und *Cl. estertheticum*-like organismen in vakuumverpacktem rindfleisch] *Fleischwirtschaft*, 92(9), 117-124. Retrieved from [www.scopus.com](http://www.scopus.com)

Broda, D. M., Bell, R. G., Boerema, J. A., & Musgrave, D. R. (2002). The abattoir source of culturable psychrophilic *Clostridium* spp. causing “blown pack” spoilage of vacuum-packed chilled venison. *Journal of Applied Microbiology*, 93(5), 817–824. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01757.x>

Moschonas, G., Bolton, D. J., Sheridan, J. J., & McDowell, D. A. (2009). Isolation and sources of blown pack spoilage clostridia in beef abattoirs. *Journal of Applied Microbiology*, 107(2), 616–624. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04229.x>

Silva, A. R., Paulo, É. N., Sant’Ana, A. S., Chaves, R. D., & Massaguer, P. R. (2011). Involvement of *Clostridium gasigenes* and *C. algidicarnis* in “blown pack” spoilage of Brazilian vacuum-packed beef. *International Journal of Food Microbiology*, 148(3), 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.016>

Adam, K. H., Flint, S. H., & Brightwell, G. (2013). Reduction of spoilage of chilled vacuum-packed lamb by psychrotolerant clostridia. *Meat Science*, 93(2), 310–315. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.09.011>

MIKOLAJCIK, E. M., & SIMON, N. T. (1978). Heat Resistant Psychrotrophic Bacteria in Raw Milk and Their Growth at 7 C. *Journal of Food Protection*, 41(2), 93–95. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-41.2.93>

MUIR, D. D., GRIFFITHS, M. W., PHILLIPS, J. D., SWEETSUR, A. W. M., & WEST, I. G. (1986). Effect of the bacterial quality of raw milk on the bacterial quality and

some other properties of low-heat and high-heat dried milk. *International Journal of Dairy Technology*, 39(4), 115–118. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1986.tb02394.x>

Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 37, Issue 5, pp. 664–698). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>

Sutherland, A. D., & Murdoch, R. (1994). Seasonal occurrence of psychrotrophic *Bacillus* species in raw milk, and studies on the interactions with mesophilic *Bacillus* sp. *International Journal of Food Microbiology*, 21(4), 279–292. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90058-2](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90058-2)

Lücking, G., Stoeckel, M., Atamer, Z., Hinrichs, J., & Ehling-Schulz, M. (2013). Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 166(2), 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.004>

Bergère, J. L., Gouet, P., Hermier, J., & Mocquot, G. (1968). Clostridium of the butyric acid group in dairy products. *Annales de l'Institut Pasteur de Lille*, 19, 41–54. <https://europepmc.org/article/med/5728589>

Cremonesi, P., Vanoni, L., Silveti, T., Morandi, S., & Brasca, M. (2012). Identification of *Clostridium beijerinckii*, *Cl. butyricum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. tyrobutyricum* isolated from silage, raw milk and hard cheese by a multiplex PCR assay. *Journal of Dairy Research*, 79(3), 318–323. <https://doi.org/10.1017/S002202991200026X>

Garde, S., Arias, R., Gaya, P., & Nuñez, M. (2011). Occurrence of *Clostridium* spp. in ovine milk and Manchego cheese with late blowing defect: Identification and characterization of isolates. *International Dairy Journal*, 21(4), 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.11.003>

Scheldeman, P., Herman, L., Foster, S., & Heyndrickx, M. (2006). *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 542–555.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02964.x>

- MUIR, D. D., GRIFFITHS, M. W., PHILLIPS, J. D., SWEETSUR, A. W. M., & WEST, I. G. (1986). Effect of the bacterial quality of raw milk on the bacterial quality and some other properties of low-heat and high-heat dried milk. *International Journal of Dairy Technology*, 39(4), 115–118. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1986.tb02394.x>
- Ivy, R. A., Ranieri, M. L., Martin, N. H., den Bakker, H. C., Xavier, B. M., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2012). Identification and characterization of psychrotolerant sporeformers associated with fluid milk production and processing. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1853–1864. <https://doi.org/10.1128/AEM.06536-11>
- Ranieri, M. L., & Boor, K. J. (2009). Short communication: Bacterial ecology of high-temperature, short-time pasteurized milk processed in the united States. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4833–4840. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2181>
- Huck, J. R., Hammond, B. H., Murphy, S. C., Woodcock, N. H., & Boor, K. J. (2007). Tracking spore-forming bacterial contaminants in fluid milk-processing systems. *Journal of Dairy Science*, 90(10), 4872–4883. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0196>
- Scheldeman, P., Pil, A., Herman, L., De Vos, P., & Heyndrickx, M. (2005). Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1480–1494. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1480-1494.2005>
- Id, D., & Schaal, E. (1979). Investigations on the microbiology of UHT-milk. *Archiv Fur Lebensmittelhygiene*, 30(1), 17–19.
- McGuiggan, J. T. M., McCleery, D. R., Hannan, A., & Gilmour, A. (2002). Aerobic spore-forming bacteria in bulk raw milk: Factors influencing the numbers of psychrotrophic, mesophilic and thermophilic Bacillus spores. *International Journal of Dairy Technology*, 55(2), 100–107. <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2002.00051.x>

- Huemer, I. A., Klijn, N., Vogelsang, H. W. J., & Langeveld, L. P. M. (1998). Thermal death kinetics of spores of *Bacillus sporothermodurans* isolated from UHT milk. *International Dairy Journal*, *8*(10–11), 851–855.  
[https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00129-0)
- Rückert, A., Ronimus, R. S., & Morgan, H. W. (2004). A RAPD-based survey of thermophilic bacilli in milk powders from different countries. *International Journal of Food Microbiology*, *96*(3), 263–272.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.020>
- SCOTT, S. A., BROOKS, J. D., RAKONJAC, J., WALKER, K. M. R., & FLINT, S. H. (2007). The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. *International Journal of Dairy Technology*, *60*(2), 109–117.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2007.00309.x>
- MURPHY, P. M., LYNCH, D., & KELLY, P. M. (1999). Growth of thermophilic spore forming bacilli in milk during the manufacture of low heat powders. *International Journal of Dairy Technology*, *52*(2), 45–50.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1999.tb02069.x>
- Ronimus, R. S., Parker, L. E., Turner, N., Poudel, S., Rückert, A., & Morgan, H. W. (2003). A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International Journal of Food Microbiology*, *85*(1–2), 45–61.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00480-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00480-4)
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., & Farrow, J. A. E. (1994). The phylogeny of the genus *Clostridium*: Proposal of five new genera and eleven new species combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *44*(4), 812–826. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-812>
- Goudkov, A. V., & Sharpe, M. E. (1966). A preliminary investigation of the importance of clostridia in the production of rancid flavour in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, *33*(2), 139–149.  
<https://doi.org/10.1017/S002202990001181X>
- Lycken, L., & Borch, E. (2006). Characterization of *Clostridium* spp. isolated from spoiled processed cheese products. *Journal of Food Protection*, *69*(8), 1887–1891. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.8.1887>

- Wisotzkey, J. D., Jurtshuk, P., Fox, G. E., Deinhard, G., & Poralla, K. (1992). Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *42*(2), 263–269. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-2-263>
- Eiroa, M. N. U., Junqueira, V. C. A., & Schmidt, F. L. (1999). *Alicyclobacillus* in orange juice: Occurrence and heat resistance of spores. *Journal of Food Protection*, *62*(8), 883–886. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.8.883>
- Bocchi, C.; Previdi, M.P.; Miglioli, L. *Heat resistance of butyric clostridia responsible for spoilage of acid products [fruit and vegetable products]*. (n.d.). Retrieved April 19, 2021, from <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=IT2005601114>
- Danyluk, M. D., Friedrich, L. M., Jouquand, C., Goodrich-Schneider, R., Parish, M. E., & Rouseff, R. (2011). Prevalence, concentration, spoilage, and mitigation of *Alicyclobacillus* spp. in tropical and subtropical fruit juice concentrates. *Food Microbiology*, *28*(3), 472–477. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.008>
- Chen, S., Tang, Q., Zhang, X., Zhao, G., Hu, X., Liao, X., Chen, F., Wu, J., & Xiang, H. (2006). Isolation and characterization of thermo-acidophilic endospore-forming bacteria from the concentrated apple juice-processing environment. *Food Microbiology*, *23*(5), 439–445. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.07.005>
- TOWNSEND, C. T. (1939). SPORE-FORMING ANAEROBES CAUSING SPOILAGE IN ACID CANNED FOODS. *Journal of Food Science*, *4*(3), 231–237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1939.tb17116.x>
- Bocchi, C.; Previdi, M.P. *Characterisation of butyric clostridia responsible for spoilage of acid products [fruit and vegetable products]*. (n.d.). Retrieved April 19, 2021, from <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=IT2005601111>
- Feng, G., Churey, J. J., & Worobo, R. W. (2010). Thermoaciduric clostridium pasteurianum spoilage of shelf-stable apple juice. *Journal of Food Protection*, *73*(10), 1886–1890. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.10.1886>
- Everis, L., & Betts, G. (2001). pH stress can cause cell elongation in *Bacillus* and

Clostridium species: A research note. *Food Control*, 12(1), 53–56.  
[https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(00\)00017-7](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(00)00017-7)

Palop, A., Raso, J., Pagán, R., Condón, S., & Sala, F. J. (1999). Influence of pH on heat resistance of spores of *Bacillus coagulans* in buffer and homogenized foods. *International Journal of Food Microbiology*, 46(3), 243–249.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00199-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00199-8)

Gordon, R. E., & Smith, N. R. (1949). AEROBIC SPOREFORMING BACTERIA CAPABLE OF GROWTH AT HIGH TEMPERATURES. *Journal of Bacteriology*, 58(3).

Wagner, I. D., & Wiegel, J. (2008). Diversity of Thermophilic Anaerobes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125(1), 1–43.  
<https://doi.org/10.1196/annals.1419.029>

Donk, P. J. (1920). A HIGHLY RESISTANT THERMOPHILIC ORGANISM. *Journal of Bacteriology*, 5(4).

Dotzauer, C., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2002). Occurrence and detection of *Thermoanaerobacterium* and *Thermoanaerobacter* in canned food. *Food Technology and Biotechnology*, 40(1), 21–26.

Rigaux, C., Denis, J. B., Albert, I., & Carlin, F. (2013). A meta-analysis accounting for sources of variability to estimate heat resistance reference parameters of bacteria using hierarchical Bayesian modeling: Estimation of D at 121.1°C and pH 7, zT and zpH of *Geobacillus stearothermophilus*. *International Journal of Food Microbiology*, 161(2), 112–120.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.001>

Caspers, M. P. M., Schuren, F. H. J., van Zuijlen, A. C. M., Brul, S., Montijn, R. C., Abee, T., & Kort, R. (2011). A mixed-species microarray for identification of food spoilage bacilli. *Food Microbiology*, 28(2), 245–251.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.010>

NAKANO, M. (2015). Development of a Quantitative PCR Assay for Thermophilic Spore-Forming <i>Geobacillus stearothermophilus</i> in Canned Food. *Biocontrol Science*, 20(3), 221–227. <https://doi.org/10.4265/bio.20.221>

Durand, L., Planchon, S., Guinebretiere, M. H., André, S., Carlin, F., & Remize, F. (2015). Contamination pathways of spore-forming bacteria in a vegetable cannery. *International Journal of Food Microbiology*, 202, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.019>

Esty, J. R., & Meyer, K. F. (1922). The heat resistance of the spores of *B. botulinus* and allied anaerobes. XI. *Journal of Infectious Diseases*, 31(6), 650–663. <https://doi.org/10.1093/infdis/31.6.650>

Anderson, N. M., Larkin, J. W., Cole, M. B., Skinner, G. E., Whiting, R. C., Gorris, L. G. M., Rodriguez, A., Buchanan, R., Stewart, C. M., Hanlin, J. H., Keener, L., & Hall, P. A. (2011). Food safety objective approach for controlling *Clostridium botulinum* growth and toxin production in commercially sterile foods. *Journal of Food Protection*, 74(11), 1956–1989. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-082>

Membré, J. M., Diao, M., Thorin, C., Cordier, G., Zuber, F., & André, S. (2015). Risk assessment of proteolytic *Clostridium botulinum* in canned foie gras. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.002>

Adamson, N. J. & Reynolds, E. C., 1997. Rules relating electrophoretic mobility, charge and molecular size of peptides and proteins. *Journal of Chromatography B*, Issue 699, pp. 133-147.

Adzitey, F., Huda, N. & Ali, G. R. R., 2013. Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. *Biotech*, Απρίλιος, Issue 3, pp. 97-107.

- Arbeit, R. D., 1995. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. Στο: P. R. Murray, και συν. επιμ. *Manual of clinical microbiology*. Washington D. C.: American Society of Microbiology, pp. 190-208.
- Armstrong, D. W., Schulte, G., Schneiderheinze, J. M. & Westenberg, D. J., 1999. Separating microbes in the manner of molecules: 1. Capillary electrokinetic approaches. *Analytical Chemistry*, Issue 71, pp. 5465-5469.
- Baker, J. M., Griffiths, M. W. & Collins-Thompson, D. L., 1992. Bacterial Bioluminescence: Applications in Food Microbiology. *Journal of Food Protection*, Ιανουάριος, Issue 55, pp. 62-70.
- Baudin, B., 2012. Two-Dimensional Gel Electrophoresis (2-DE). Στο: S. Magdeldin, επιμ. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. s.l.:InTech Open, pp. 149-170.
- Black, J. G., 1996. *Microbiology principles and applications*. 3η επιμ. New Jersey: Prentice Hall.
- Cai, R. και συν., 2015. Detection of Alicyclobacillus spp. in fruit juice by combination of immunomagnetic separation and a SYBR Green I real-time PCR assay. *PLOS One*, Issue 11, pp. 1-11.
- Chattopadhyay, S. και συν., 2016. Functionalized polymeric magnetic nanoconstructs for selective capturing and sensitive detection of Salmonella typhimurium. *Analytica Chimica Acta*, Issue 937, pp. 127-135.
- Chen, J. & Park, B., 2018. Effect of immunomagnetic bead size on recovery of foodborne pathogenic bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, Issue 267, pp. 1-8.
- Cho, I.-H., Mauer, L. & Irudayaraj, J., 2014. In-situ fluorescent immunomagnetic multiplex detection of foodborne pathogens in very low numbers. *Biosensors and Bioelectronics*, Issue 57, pp. 143-148.
- Desai, M. & Armstrong, D. W., 2003. Separation, Identification, and Characterization of Microorganisms by Capillary Electrophoresis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Απρίλιος, Issue 67, pp. 38-51.
- Ebersole, R. C. & McCormick, R. M., 1993. Separation and isolation of viable bacteria by capillary zone electrophoresis. *Biotechnology*, Issue 11, pp. 1278-1282.



- Ehtisham, M. και συν., 2016. Fundamentals of In situ Hybridization: A Review. *International Research Journal of Clinical Medicine*, Απρίλιος, Issue 1, pp. 23-29.
- Flavell, R. B., Bennett, M. D., Smith, J. B. & Smith, D. B., 1974. Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. *Biochemical Genetics*, Issue 48, pp. 257-269.
- Gracias, K. S. & McKillip, J. I., 2004. A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Canadian Journal of Microbiology*, Issue 50, pp. 883-890.
- Grossman, P. D. & Soane, D. S., 1990. Orientation effects on the electrophoretic mobility of rod-shaped molecules in free solution. *Analytical Chemistry*, Issue 62, pp. 1592-1596.
- Hakovirta, J., 2008. *Modern Techniques in Detection, Identification and Quantification of Bacteria and Peptides from Foods*, Helsinki: University of Helsinki.
- marine bacteria. *Limnology and Oceanography*, Issue 12, pp. 319-324.
- Hjertan, S. και συν., 1987. Carrier-free zone electrophoresis, displacement electrophoresis and isoelectric focusing in a high-performance electrophoresis apparatus. *Journal of Chromatography A*, Issue 403, pp. 47-61.
- Holm-Hansen, O., 1970. ATP levels in algal cells as influenced by environmental conditions. *Plant and Cell Physiology*, Issue 11, p. 689.
- Holm-Hansen, O. & Booth, C. R., 1966. The measurement of. *Limnology and Oceanology adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance*, Issue 11, pp. 510-519.
- Hornbeck, P., 2015. Enzyme-linked immunosorbent assays. *Current Protocols in Immunology*, Issue 110, pp. 1-23.
- Jayasree, S., Selvam, G. S. & Thomas, S., 2000. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for agglutinin, an antibacterial protein of the shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Journal of Crustacean Biology*, Issue 20, pp. 621-627.
- Jay, J., Loessner, M. J. & Golden, D. A., 2005. Chemical, biological, and physical methods. Στο: J. Jay, M. J. Loessner & D. A. Golden, επιμ. *Modern food microbiology*. New York: Springer Science & Business Media, Inc., pp. 241-284.

- Kadri, K., 2020. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. Στο: M. L. Nagpal, O. Boldura, C. Balta & S. Enany, επιμ. *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*. s.l.:InTech Open, pp. 139-155.
- Karl, D. M., 1980. Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microbiological Reviews*, Issue 44, pp. 739-796.
- Kell, D. B. και συν., 1998. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Issue 73, pp. 169-187.
- Lamb, J. Y. & Davis, M. P., 2020. *Salamanders and other amphibians are aglow with biofluorescence*. [Ηλεκτρονικό]  
Available at: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-59528-9>  
[Πρόσβαση 4 Μάιος 2021].
- Li, F. και συν., 2018. Polyamidoamine (PAMAM) dendrimer-mediated biotin amplified immunomagnetic separation method coupled with flow cytometry for iable *Listeria monocytogenes* detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Issue 257, pp. 286-294.
- Looi, L. M. & Cheah, P. L., 1992. In situ hybridisation: Principles and applications. *Malaysian Journal of Pathology*, Issue 14, pp. 69-76.
- Lundin, A. & Thore, A., 1975. Comparison of methods for extraction of bacterial adenine nucleotides determined by firefly assay. *Applied Microbiology*, Issue 30, pp. 713-721.
- Luo, D. και συν., 2017. Two-step large-volume magnetic separation combined with PCR assay for sensitive detection of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. *Journal of Dairy Science*, Issue 100, pp. 7883-7890.
- MacKnight, K. T., 2004. Stand, The Polymerase Chain Reaction (PCR): The Second Generation of DNA Analysis Methods Takes the. *Santa Clara High Technology Law Journal*, Ιανουάριος, Issue 20, pp. 288-359.
- McElroy, W., 1947. The energy source for bioluminescence in an isolated system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Issue 333, pp. 342-345.
- Muyzer, G., de Waal, E. C. & Uitterlinden, A. G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of

polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*, Issue 59, pp. 695-700.

Muyzer, G., Hottenträger, S., Teske, A. & Waver, C., 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA - A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. Στο: A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas & F. J. de Bruijn, επιμ. *Molecular Microbial Ecology Manual*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 3441-3442.

MyBioSource, 2019. *What is ELISA? (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)*.

[Ηλεκτρονικό]

Available at: <https://www.mybiosource.com/learn/ELISA>

[Πρόσβαση 3 Μάιος 2021].

Myers, R. M., Maniatis, T. & Lerman, L. S., 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymology*, Issue 155, pp. 501-527.

Nachamkin, I., 2001. *Campylobacter jejuni*. Στο: M. P. Doyle, επιμ. *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*. Washington D. C.: ASM Press, pp. 179-192.

Nieto, F. E., Lee, J. J. & Koestler, R. J., 1997. Assessing Biodeterioration in Wood Using ATP Photometry: Part I. Nucleotide Extraction and Wood Interference. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Issue 39, pp. 9-13.

Notermans, S. & Wernars, K., 1991. Immunological methods for detection of foodborne pathogens and their toxins. *International Journal of Food Microbiology*, Issue 12, pp. 91-102.

Pallas, V., Faggioli, F., Aparico, F. & Sanchez-Navarro, J. A., 2011. Molecular Hybridization Techniques for Detecting and Studying Fruit Tree Viruses and Viroids. Στο: A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse & W. Jeikmann, επιμ. *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*. St. Paul: American Phytopathological Society, pp. 333-349.

Pfetsch, A. & Welsch, T., 1997. Determination of the electrophoretic mobility of bacteria and their separation by capillary zone electrophoresis. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, Issue 359, pp. 198-201.

Reddy, P. R. & Nomula, R., 2012. Gel-Electrophoresis and Its Applications. Στο: S. Magdeldin, επιμ. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. s.l.:InTech Open, pp. 15-34.

Seo, S. και συν., 2009. An ELISA-on-a-chip biosensor system for early screening of *Listeria monocytogenes* in contaminated food products. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, Issue 30, pp. 2993-2998.

Sheehan, D., 2000. *Physical biochemistry: Principles and applications*. New York: John Wiley & Sons.

Shim, W.-B. και συν., 2008. Enhanced rapidity for qualitative detection of *Listeria monocytogenes* using an enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatography strip test combined with immunomagnetic bead separation. *Journal of Food Protection*, Issue 71, pp. 781-789.

Somma, M. & Querci, M., 2020. *Agarose Gel Electrophoresis*. Luxembourg, Publications Office of the European Union.

Stoler, D. L. & Michael, N. L., 1995. Nucleic Acid Blotting Techniques for Virus Detection. Στο: D. L. Wiedbrauk & D. H. Farkas, επιμ. *Molecular Methods for Virus Detection*. s.l.:Elsevier, pp. 39-74.

Towner, K. J. & Cockayne, A., 1993. *Molecular methods for microbial identification and typing*. 1η επιμ. London: Chapman & Hall.

Uhlenbruck, G., Froml, A., Lutticken, R. & Hannig, K., 1988. Cell electrophoresis of group B Streptococci: separation of types Ia, Ib/c, II, III, and IV before and after neuraminidase treatment. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology*, Issue 270, pp. 28-34.

Umesha, S. & Manukumar, H., 2018. Advanced molecular diagnostic techniques for detection of food-borne pathogens: Current applications and future challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Issue 58, pp. 84-104.

van Belkum, A. και συν., 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Issue 13, pp. 1-46.

van Heerden, D., 2018. *Molecular Biology: Blotting / Hybridization techniques*. [Ηλεκτρονικό]

Available at: [https://nanopdf.com/download/hybridizationfs\\_pdf](https://nanopdf.com/download/hybridizationfs_pdf)  
[Πρόσβαση 3 Μάιος 2021].

Vinayaka, A. C. και συν., 2019. Rapid detection of *Salmonella enterica* in food samples by a novel approach with combination of sample concentration and direct PCR. *Biosensors and Bioelectronics*, Issue 129, pp. 224-230.

Wang, D. και συν., 2017. Efficient separation and quantitative detection of *Listeria monocytogenes* based on screen-printed interdigitated electrode, urease and magnetic nanoparticles. *Food Control*, Issue 73, pp. 555-561.

Wang, L. και συν., 2017. An aptamer-based PCR method coupled with magnetic immunoseparation for sensitive detection of *Salmonella Typhimurium* in ground turkey. *Analytical Biochemistry*, Issue 533, pp. 34-40.

Wang, Z. και συν., 2020. Immunomagnetic separation: An effective pretreatment technology for isolation and enrichment in food microorganisms detection. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Οκτώβριος, Issue 19, pp. 3802-3824.

Wang, Z. και συν., 2018. Synthesis of multifunctional fluorescent magnetic nanoparticles for the detection of *Alicyclobacillus* spp. in apple juice. *Food Research International*, Issue 114, pp. 104-113.

Wang, Z. και συν., 2013. Development and evaluation of an immunomagnetic separation-ELISA for the detection of *Alicyclobacillus* spp. in apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, Issue 166, pp. 28-33.

Wang, Z. και συν., 2013. Preparation of immunomagnetic nanoparticles for the separation and enrichment of *Alicyclobacillus* spp. in apple juice. *Food Research International*, Issue 54, pp. 302-310.

Watson, J. D. & Crick, F. H., 1953. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 25 Απρίλιος, Issue 171, pp. 737-738.

Xue, L. και συν., 2018. An ultrasensitive fluorescent biosensor using high gradient magnetic separation and quantum dots for fast detection of foodborne pathogenic bacteria. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Issue 265, pp. 318-325.

Xu, L. και συν., 2017. n-field detection of multiple pathogenic bacteria in food products using a portable fluorescent biosensing system. *Food Control*, Issue 75, pp. 21-28.

Zhu, A. & Chen, Y., 1989. High-voltage capillary zone electrophoresis of red blood cells. *Journal of Chromatography A*, Issue 470, pp. 251-260.

Zhu, P. και συν., 2011. Detection of E. coli O157:H7 by immunomagnetic separation coupled with fluorescence immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics*, Issue 30, pp. 337-341.