



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας

«Παραλαβή, ανάλυση με χρωματογραφικές
μεθόδους και αντιμικροβιακή δράση ενώσεων
του βακτηρίου
Pseudomonas fluorescens X»



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

της

ΣΑΛΑΡΗ ΝΙΚΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2011

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας

Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας

**«Παραλαβή, ανάλυση με χρωματογραφικές
μεθόδους και αντιμικροβιακή δράση ενώσεων
του βακτηρίου
Pseudomonas fluorescens X»**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

της

ΣΑΛΑΡΗ ΝΙΚΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2011

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

- Δ. Γεωργακόπουλος (Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α., Επιβλέπων)**
Α. Μαρκόγλου (Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α., Μέλος)
Π. Ταραντίλης (Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α., Μέλος)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

- Δ. Γεωργακόπουλος (Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α., Επιβλέπων)**
Π. Ταραντίλης (Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.)
Α. Μαρκόγλου (Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.,)
Ι. Χατζηπαυλίδης (Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.)
Μ. Πολυσίου (Καθηγητής Γ.Π.Α.)
Ν. Λάμπρου (Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.)
Ε. Μικρός (Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.)

**Για την παρούσα μελέτη, η υποψήφια διδάκτωρ υποστηρίχθηκε από το
ερευνητικό πρόγραμμα ΠΕΝΕΔ 2003 (03ΕΛ230)**

Αφιερωμένο στην Ελένη μου

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες στα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Ξεκινώντας από τον επιβλέποντα της παρούσας διατριβής Επικ. Καθ. Δ. Γεωργακόπουλο, ένα θερμό ευχαριστώ και στον Επικ. Καθ. Α. Μαρκόγλου, ο οποίος βοηθούσε πάντα ως μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής. Επίσης, εκφράζω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες στον Επικ. Καθ. Π. Ταραντίλη για τις πολύτιμες συμβουλές του καθώς χωρίς αυτόν δεν θα ήταν εφικτή η ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, Καθ. Μ. Πολυσίου, Καθ. Ε. Μικρό, Αν. Καθ. Ν. Λαμπρου και Επικ. Καθ. Ι. Χατζηπαυλίδη για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην κρίση του διδακτορικού μου.

Δεν θα ξεχάσω ποτέ τις όμορφες στιγμές, εντός και εκτός εργαστηρίου και την καλή συνεργασία που είχα με τον Γ. Κρεμμύδα και τον Χ. Φωτιάδη. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους μου και το προσωπικό στο εργαστήριο Μικροβιολογίας καθώς και στο εργαστήριο Φαρμακολογίας, όχι μόνο για τη συνεργασία μαζί τους αλλά και για τη φιλία τους που κρατά μέχρι και σήμερα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους γονείς μου και την οικογένειά μου για τη συμπαράσταση τους όλα αυτά τα χρόνια και τη βοήθειά τους σε κάθε δύσκολη στιγμή μου. Τους ευχαριστώ γιατί είναι πάντα εκεί για να στηρίζουν τις επιλογές μου και να μου δίνουν δύναμη. Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το χρωστάω στην κόρη μου Ελένη που για χρόνια της στέρησα μεγάλο μέρος από το χρόνο μου, που τόσο πολύ αναζητούσε, χωρίς να καταλαβαίνει τον λόγο. Την ευχαριστώ και ελπίζω κάποια μέρα να καταλάβει πόσο σημαντικός ήταν ο λόγος της απουσίας μου.

Περίληψη

Το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* X είναι ένας ικανός παράγοντας βιολογικής καταπολέμησης φυτοπαθογόνων μυκήτων οι οποίοι προκαλούν προφυτρωτικές και μεταφυτρωτικές τήξεις σπορίων. Προκειμένου να διερευνηθεί ο μηχανισμός της βιολογικής του δράσης δημιουργήθηκαν μεταλλαγμένα στελέχη του βακτηρίου με τη χρήση του μεταθετού στοιχείου Tn5. Τα στελέχη αυτά δεν παρεμπόδιζαν την ανάπτυξη του μύκητα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Σε εκχύλισμα από την καλλιέργεια του *Ps. fluorescens* X και των μεταλλαγμένων στελεχών πραγματοποιήθηκε μελέτη της αντιμικροβιακής τους δράσης. Μείωση της γραμμικής ανάπτυξης του μύκητα *Pythium ultimum* παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση του αγρίου τύπου, γεγονός που αποκαλύπτει την παρουσία αντιμικροβιακών ενώσεων οι οποίες εμπλέκονται με την καταστολή του παθογόνου μύκητα.

Για την απομόνωση των μεταβολιτών αυτών αναπτύχθηκε ημιπαρασκευαστική μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Χρησιμοποιήθηκε επίσης και μέθοδος χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC), σε συνδυασμό με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE). Ακολούθησε μελέτη της βιοδραστικής τους ικανότητας *in vitro*. Ορισμένοι από τους ύποπτους μεταβολίτες εμφάνισαν παρεμπόδιση της γραμμικής ανάπτυξης του μύκητα κατά τη βιοδοκιμή. Μια πρώτη προσπάθεια ταυτοποίησης των αναλυτών αυτών έγινε με υγρή χρωματογραφία φασματομετρία μαζών με την τεχνική (APCI-MSD), όπου φαίνεται πιθανό οι αντιμικροβιακές ενώσεις να ανήκουν στην κατηγορία των αντιβιοτικών, λόγω του μικρού τους μοριακού βάρους.

Ο χαρακτηρισμός της δομής των αντιμικροβιακών ενώσεων έγινε με συνδυασμό των τεχνικών της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συνδυασμένης με φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού και φασματομετρία μαζών (HPLC-UV-Vis-MS), με υπέρυθρη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR), με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (GC-MS) και με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR).

Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι οι ουσίες με αντιμικροβιακή δράση που απομονώθηκαν από την καλλιέργεια του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* X είναι νέες ενώσεις που δεν αντιστοιχούν σε κάποια από τις ήδη γνωστές και

ταυτοποιημένες ενώσεις της βιβλιογραφίας. Μία επίσης από τις αντιμικροβιακές ουσίες που χαρακτηρίστηκαν βρέθηκε να ανήκει στην ομάδα των τοξινών.

Abstract

Pseudomonas fluorescens strain X is an efficient biological antagonist of soil borne phytopathogenic fungi that cause damping-off of seeds and seedlings. In order to investigate the mechanism of its biological activity, mutants deficient in the antifungal activity *in vitro* and *in vivo* were generated by mutagenesis using the transposon Tn5. Fungitoxicity tests of bacterial extracts from solid cultures of the wild type and mutant strains showed significant reduction of mycelial growth of *Pythium ultimum* only in the case of the wild type. These results indicate that the possible mechanism of biological activity of *Ps. fluorescens* X is due to the production of antimicrobial metabolites.

Two methods for the isolation of the antimicrobials were developed: a method using semi-preparative high performance liquid chromatography (HPLC) and a method of thin layer chromatography (TLC), in combination with solid phase extraction (SPE). *In vitro* bioassays were subsequently performed to test the isolated compounds for antifungal activity. Direct application of each of these purified metabolites with *Pythium ultimum* resulted in growth suppression of fungi. Structure elucidation using atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometric detector (APCI-MSD) suggested that they are probably antibiotics due to their low molecular weight.

Chemical structure was also analyzed by LC-MS/MS analysis, GC-MS analysis, Fourier Transform-IR analysis and Nuclear Magnetic Resonance.

The results of this research revealed that all of the antimicrobial compounds produced by the *Pseudomonas fluorescens* strain X, are new compounds. One of the compounds also who was further characterized it was found to belong to the group of the toxins.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	ii
Abstract	iv
Συντμήσεις.....	viii
Κεφάλαιο 1 ^ο Εισαγωγή.....	- 1 -
1.1. Καταπολέμηση των ασθενειών των φυτών.	- 1 -
1.2. Βιολογική καταπολέμηση ασθενειών των φυτών	- 2 -
1.2.1. Ορισμός – Γενικά	- 2 -
1.2.2. Η χρήση παρασιτικών ή ανταγωνιστικών μικροοργανισμών στη βιολογική καταπολέμηση.....	- 4 -
1.2.3. Τα βακτήρια ως βιολογικοί παράγοντες καταστολής των φυτοπαθογόνων μυκήτων.....	- 6 -
1.2.4. Μηχανισμοί καταστολής φυτοπαθογόνων μυκήτων από βακτηριακούς ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς.....	- 8 -
1.3. Τα βακτήρια του γένους <i>Pseudomonas</i>	- 9 -
1.3.1. Χαρακτηριστικά και ιδιότητες	- 9 -
1.3.2. Αντιμικροβιακές ενώσεις από βακτήρια του γένους <i>Pseudomonas</i>	- 11 -
1.3.3. Δομές δευτερογενών αντιβιοτικών ενώσεων.....	- 17 -
1.4. Αναλυτικές τεχνικές χαρακτηρισμού - ταυτοποίησης αντιμικροβιακών ενώσεων.....	- 25 -
1.4.1. Υγρή-χρωματογραφία.....	- 25 -
1.4.2. Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC)	- 25 -
1.4.2.1. Αρχή μεθόδου- Εφαρμογές.....	- 25 -
1.4.3. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	- 26 -
1.4.3.1. Ορισμός- Πλεονεκτήματα	- 26 -
1.4.4. Εγκύλιση Στερεάς Φάσης (SPE)	- 28 -
1.4.4.1. Αρχή μεθόδου- Εφαρμογές.....	- 28 -
1.4.4.2. SPE ‘αντίστροφης φάσης’	- 28 -
1.4.5. Φασματομετρία Μαζών (MS)	- 29 -
1.4.5.1. Αρχή της τεχνικής.....	- 29 -
1.4.5.2. Διασύνδεση Συστημάτων Υγρής Χρωματογραφίας με Φασματόμετρο Μαζών.....	- 30 -
1.4.6. Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FT-IR)-	32
1.4.6.1. Ορισμός – Έννοιες-Εφαρμογές	- 32 -
1.4.7. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	- 34 -
1.4.7.1. Αρχή τεχνικής.....	- 34 -
1.4.7.2. Χαρακτηριστικά φάσματος NMR.....	- 35 -
1.4.7.3. Εφαρμογές φασματοσκοπίας NMR	- 37 -
1.4.8. Οι αναλυτικές τεχνικές στο χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση προϊόντων δευτερογενούς μεταβολισμού	- 37 -
1.5. Περιγραφή του έργου	- 39 -
1.5.1. Οι τήξεις των σπορίων και των φυταρίων.	- 39 -
1.5.2. Το βακτήριο <i>Pseudomonas fluorescens</i> X	- 40 -
1.6. Αντικείμενο και στόχοι του έργου	- 41 -
1.7. Περίγραμμα διδακτορικής διατριβής	- 41 -
Κεφάλαιο 2 ^ο Υλικά και Μέθοδοι.....	- 45 -
2.1. Βιολογικό υλικό και θρεπτικά μέσα αύξησης.....	- 45 -
2.1.1. Βιολογικό υλικό.....	- 45 -
2.1.2. Θρεπτικά υλικά.....	- 46 -

2.2. Αντιδραστήρια – Διαλύματα.....	- 46 -
2.2.1. Πρότυπες ουσίες-Αντιδραστήρια	- 46 -
2.2.2. Διαλύματα	- 47 -
2.3. Μεθοδολογία.....	- 47 -
2.3.1. Εισαγωγή.....	- 47 -
2.3.2. Πορεία εργασίας I.....	- 48 -
2.3.2.1. Εμβολιασμός-Επώαση	- 49 -
2.3.2.2 Φυγοκέντρωση-Συμπύκνωση.....	- 49 -
2.3.2.3 Εκχύλιση-Παραλαβή.....	- 49 -
2.3.2.4 Ανασύσταση	- 49 -
2.4. In vitro βιοδοκιμή εκχυλισμάτων.....	- 50 -
2.5. RP-HPLC ανάλυση εκχυλισμάτων.....	- 50 -
2.5.1. Οργανολογικός εξοπλισμός.....	- 50 -
2.6. Πορεία εργασίας II	- 52 -
2.7. Απομόνωση αντιμικροβιακών ενώσεων.....	- 54 -
2.7.1. Ανάπτυξη μεθόδου απομόνωσης δευτερογενών μεταβολιτών με Ημιπαρασκευαστική Χρωματογραφία (RP-HPLC).....	- 54 -
2.7.1.1. Οργανολογικός εξοπλισμός.....	- 54 -
2.7.2 Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών με Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας, TLC.	- 55 -
2.7.2.1. Εισαγωγή.....	- 55 -
2.7.2.2 Καθαρισμός δειγμάτων με Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (Solid Phase Extraction).....	- 56 -
2.7.2.3. In vitro βιοδοκιμή κλασμάτων.....	- 57 -
2.8. Χαρακτηρισμός δομής αντιμικροβιακών ενώσεων.....	- 57 -
2.8.1 Εισαγωγή.....	- 57 -
2.8.2. Ανάλυση κλασμάτων με φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού και φασματομετρία μαζών (HPLC-UV-Vis-MS)	- 57 -
2.8.2.1. Οργανολογικός εξοπλισμός.....	- 57 -
2.8.3. Ανάλυση κλασμάτων με Υγρή Χρωματογραφία Υπερυψηλής Πίεσης συνδεδεμένη με Υβριδικό Φασματογράφο Μάζας διαδοχικής φασματομετρίας και υψηλής διακριτικής ικανότητας (UHPLC-HRMS ⁿ)	- 58 -
2.8.3.1. Οργανολογικός εξοπλισμός.....	- 58 -
2.8.4. Ανάλυση κλασμάτων με αέρια χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας (GC-MS)	- 59 -
2.8.5. Ανάλυση με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-IR	- 60 -
2.8.5.1. Φασματοσκοπία FT-IR	- 60 -
2.8.5.2 Πορεία εργασίας	- 61 -
2.8.6. Ανάλυση με τη χρήση πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)...	- 61 -
2.9. Σύγκριση με γνωστές αντιμικροβιακές ουσίες.....	- 62 -
Κεφάλαιο 3 ^ο Αποτελέσματα.....	- 64 -
3.1. Απομόνωση αντιμικροβιακών ενώσεων.....	- 64 -
3.1.1. Βιοδοκιμή εκχυλισμάτων ως προς την παρεμπόδιση του <i>P. ultimum in vitro</i>	- 64 -
3.2. Ανάλυση εκχυλισμάτων άγριου τύπου και μεταλλαγμάτων από θρεπτικό υλικό PDA με RP-HPLC.....	- 68 -
3.2.1. Πορεία εργασίας I.....	- 68 -
3.2.2. Πορεία εργασίας II.....	- 71 -
3.2.3. Ανάλυση εκχυλισμάτων άγριου τύπου και μεταλλαγμάτων από θρεπτικό υλικό PA με RP-HPLC.....	- 72 -

3.3. Απομόνωση κλασμάτων	- 74 -
3.3.1. Μέθοδος απομόνωσης με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC	- 74 -
3.3.2. Μέθοδος απομόνωσης με Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας TLC. ...	- 76 -
3.4. Χαρακτηρισμός δομής αντιμικροβιακών ενώσεων.....	- 79 -
3.4.1. Χαρακτηρισμός δομής των κλασμάτων κ-1, κ-2 κ-3 και κ-4	- 80 -
3.5. Απομόνωση του μεταβολίτη Q _a με Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας. ...	- 100 -
3.6. Αποτελέσματα σύγκρισης εκχυλισμένων αντιμικροβιακών ενώσεων του <i>Ps. fluorescens</i> X1 με γνωστές αντιμικροβιακές ουσίες άλλων ανταγωνιστικών βακτηρίων του γένους <i>Pseudomonas</i>	- 102 -
3.6.1. Χρωματογραφική ανάλυση εκχυλίσματος <i>Pseudomonas aureofaciens</i> PGS12.....	- 104 -
3.6.2. Χρωματογραφική ανάλυση εκχυλίσματος <i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0.....	- 109 -
Κεφάλαιο 4 ^ο Συμπεράσματα.....	- 111 -
Βιβλιογραφία	- 118 -
Παράρτημα	- 138 -

Συντμήσεις

PGPR	Ριζοβακτήρια που προάγουν την αύξηση των φυτών (Growth Promoting Rhizobacteria)
PCA	Φαιναζίνη-1-καρβοξυλικό οξύ, (Phenazine-1-carboxylic acid)
IAA	Ινδολοξικό οξύ (Indole acetic acid)
DAPG	Διακετυλοφλορογλουκινόλη (2,4-diacetylphloroglucinol)
MAPG	Μονοακέτυλοφλορογλουκινόλη
TAPG	Τριακετυλοφλορογλουκινόλη
CLPs	Κυκλικά λιποπεπτίδια (Cyclic Lipopeptides)
TLC	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography)
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography)
RP-HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσης Reverse phase-high performance liquid chromatography
SPE	Εχκύλιση Στερεάς Φάσης (Solid phase extraction)
GC/MS	Αέρια Χρωματογραφία / Φασματομετρία Μαζών (Gas Chromatography / Mass Spectrometry)
ESI	Ιονισμός με ηλεκτροδιάχυση (Electron Spray Ionization)
APCI	Χημικός ιονισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric pressure chemical ionization).
FT-IR	Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier Fourier Transform Infrared Spectroscopy
LC/MS	Υγρή Χρωματογραφία / Φασματομετρία Μαζών (Liquid Chromatography / Mass Spectrometry)
NMR	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός Nuclear Magnetic Resonance
PDA	Potato Dextrose Agar

LA	Luria Bertani Agar
NA	Nutrient Agar
MA	Mannitol Agar
UHPLC-HRMSⁿ	Υγρή Χρωματογραφία Υπερυψηλής Πίεσης συνδεδεμένη με Υβριδικό Φασματογράφο Μάζας διαδοχικής φασματομετρίας και υψηλής διακριτικής ικανότητας

Κεφάλαιο 1^ο Εισαγωγή

1.1. Καταπολέμηση των ασθενειών των φυτών.

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

Ο όρος «καταπολέμηση» δε δηλώνει απαραίτητα την πλήρη παρεμπόδιση της εμφάνισης ή ακόμη και την εξάλειψη μιας ασθένειας. Επειδή η καταπολέμηση συνδέεται άρρηκτα με την παραγωγή, κάθε μέθοδος πρέπει να μελετάται ως προς την οικονομικότητά της. Δηλαδή, το κόστος των επεμβάσεων σε σχέση με το οικονομικό αποτέλεσμα της επέμβασης. Αντίθετα επομένως με ότι συμβαίνει στην Ιατρική, στη Φυτοπροστασία το κριτήριο είναι κατά κανόνα αυστηρά οικονομικό (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992). Για να εφαρμοσθεί καταπολέμηση, πρέπει πρώτα να καθορισθεί ποιό είναι το ελάχιστο ποσοστό έκτασης της ασθένειας, που προκαλεί οικονομική ζημία, και ποια είναι τα περιθώρια, μέσα στα όποια η καταπολέμηση κοστίζει λιγότερο από τη ζημία, πού προσπαθούμε να αποφύγουμε. Συνεπώς, μια μέθοδος καταπολέμησης δεν αρκεί να είναι αποτελεσματική, πρέπει επίσης να είναι κατά κύριο λόγο οικονομική, απλή στην εφαρμογή της και ασφαλής (Δροσόπουλος, 1992).

Γενικά, τα μέσα που χρησιμοποιούνται στην καταπολέμηση των εχθρών και ασθενειών των φυτών ποικίλλουν ανάλογα την περίπτωση και μπορεί να είναι νομοθετικά, καλλιεργητικά, βιοτεχνολογικά, βιολογικά και χημικά. Οι νομοθετικές μέθοδοι, σύμφωνα με τη Διεθνή Σύμβαση Φυτοπροστασίας του 1951, περιλαμβάνουν

όλους εκείνους τους ελέγχους και τα διοικητικά μέτρα που στοχεύουν στην εξάλειψη ή τον περιορισμό της εξάπλωσης ενός φυτοπαράσιτου.

Τα καλλιεργητικά μέτρα στοχεύουν στην ανάπτυξη δυσμενών συνθηκών για την ανάπτυξη του φυτοπαράσιτου και ευνοϊκών για την ανάπτυξη της καλλιέργειας με την εφαρμογή ενός συνόλου καλλιεργητικών πρακτικών όπως η αμειψισπορά, η αγρανάπαυση, ο χρόνος σποράς, η κατεργασία του εδάφους, το κλάδεμα κ.α. Η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών θεωρείται αποτελεσματική μέθοδος καταπολέμησης, δεδομένου ότι οι ανθεκτικές ποικιλίες δεν προσβάλλονται σε βαθμό που να προκαλείται οικονομική ζημία, όμως σε πολύ λίγες περιπτώσεις έχει τύχει εφαρμογής. Οι χημικές μέθοδοι καταπολέμησης χρησιμοποιούνται εκτεταμένα σήμερα και συνίστανται στην εφαρμογή χημικών ουσιών για την πρόληψη ή και εξάλειψη προσβολών. Τέλος, οι βιολογικές μέθοδοι χρησιμοποιούν άλλους οργανισμούς, πλην του ανθρώπου, για τη μείωση του πληθυσμού ή της δραστηριότητας των φυτοπαράσιτων (Agiros, 1996). Τα τελευταία χρόνια η μελέτη των μεθόδων αυτών έχει εντατικοποιηθεί και έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος στον τομέα των βιολογικών καλλιεργειών.

Τα προϊόντα που χρησιμοποιούνται για την προστασία των φυτών από τα φυτοπαράσιτα ονομάζονται φυτοπροστατευτικά προϊόντα ή φυτοφάρμακα (pesticides). Ανάλογα με το είδος του φυτοπαράσιτου που επηρεάζουν ή τη δράση τους διακρίνονται σε μυκητοκτόνα (fungicides), βακτηριοκτόνα (bactericides), εντομοκτόνα (insecticides), ακαρεοκτόνα (acaricides), νηματοδοκτόνα (nematicides), ζιζανιοκτόνα (herbicides) κ.α. Στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, επιπλέον, υπάγονται και τα βιοφυτοφάρμακα (biopesticides), που έχουν ως δραστικό συστατικό κάποιο μικροοργανισμό (μύκητες, ιοί, βακτήρια), καθώς και παρασιτοειδή και αρπακτικά των ζωικών εχθρών.

1.2. Βιολογική καταπολέμηση ασθενειών των φυτών

1.2.1. Ορισμός – Γενικά

Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του '70, η εμφάνιση των πρώτων περιβαλλοντικών προβλημάτων από την αλόγιστη χρήση των γεωργικών φαρμάκων προκάλεσε ένα κύμα αμφισβήτησης για το γεωργικό πρότυπο της «συμβατικής γεωργίας». Ο ευτροφισμός των λιμνών, προβλήματα στη δημόσια υγεία από τη χρήση

χημικών φυτοφαρμάκων, η ρύπανση των υπογείων υδάτων από τη χρήση αγροχημικών, αρχίζουν να διαφαίνονται ως αποτελέσματα της αλόγιστης χρήσης φυτοφαρμάκων που υποβαθμίζουν το περιβάλλον, τη διατροφή και την ποιότητα ζωής. Η τάση μείωσης των εισροών φυτοφαρμάκων στη γεωργική παραγωγή αποτελεί σήμερα επιδίωξη των περισσότερων κρατών και διεθνών οργανισμών. Πολλά φυτοφάρμακα καταργούνται (τριαζίνες, οργανοχλωριωμένα, οργανοφωσφορικά, βρωμιούχο μεθύλιο, κ.λ.π) και θεσπίζονται αυστηρά όρια στη χρήση των υπολοίπων. Η ανατολή του 21ου αιώνα φαίνεται πως βρίσκει τη Βιολογική Γεωργία στη θέση που της αξίζει. Γεωργικά προϊόντα που παράγονται υπό συνθήκες ολοκληρωμένης καταπολέμησης ή βιολογικά, δεν εμφανίζουν προβλήματα υπολειμμάτων από φυτοφάρμακα, επιτυγχάνουν καλύτερες τιμές στην αγορά και αποφέρουν υψηλότερα εισοδήματα για τους παραγωγούς.

Κατά τους Cook και Baker βιολογική καταπολέμηση στην περίπτωση των ασθενειών των φυτών, είναι η μείωση της ποσότητας του μολύσματος ή της νοσογόνου δράσης του παθογόνου, που πραγματοποιούνται από ένα ή περισσότερων οργανισμών, εκτός από τον άνθρωπο (Cook και Baker, 1974). Στους οργανισμούς αυτούς περιλαμβάνονται: α) μη παθογόνα στελέχη του ίδιου του παθογόνου (cross protection), β) το ίδιο τα παθογόνο σε μικρότερες ποσότητες μολύσματος (ανοσοποίηση-plant immunization), γ) το φυτό-ξενιστής εφοδιασμένο με αντοχή στην προσβολή του συγκεκριμένου παθογόνου και δ) άλλοι οργανισμοί ανταγωνιστές του παθογόνου (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992). Η βιολογική καταπολέμηση έχει προοδεύσει σημαντικά στον τομέα της αντιμετώπισης των εχθρών των καλλιεργειών. Στην περίπτωση όμως των ζιζανίων τα παραδείγματα επιτυχούς βιολογικής καταπολέμησης είναι ελάχιστα.

Πολλές εφαρμογές στη βιολογική καταπολέμηση των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών έχουν μελετηθεί και αναπτυχθεί τα τελευταία 65 χρόνια (Baker, 1987) και μπορεί να είναι είτε έμμεσες ή άμεσες. Έμμεσα, η βιολογική καταπολέμηση εφαρμόζεται με τη χρήση ανθεκτικών ποικιλιών καθώς και με τη χρήση καλλιεργητικών τεχνικών που συμβάλλουν στην ανάπτυξη των υπαρχόντων μικροβιακών ανταγωνιστών. Η άμεση εφαρμογή περιλαμβάνει την εισαγωγή ανταγωνιστικών ή παρασιτικών μικροοργανισμών ή την εισαγωγή μη παθογόνων στελεχών των παθογόνων (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007). Τα τελευταία 15 χρόνια πολλές εταιρίες έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στην ανάπτυξη βιολογικών παραγόντων με εμπορική σημασία για τη βιολογική καταπολέμηση. Το μεγάλο, όμως,

ενδιαφέρον εστιάζεται στην καταπολέμηση των φυτοπαθογόνων με τη χρήση των βιολογικών φυτοφαρμάκων (biopesticides).

1.2.2. Η χρήση παρασιτικών ή ανταγωνιστικών μικροοργανισμών στη βιολογική καταπολέμηση.

Ειδικότερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα παθογόνα που προσβάλλουν τις ρίζες και το λαιμό των φυτών και τα οποία κατά τεκμήριο διαβιούν στο έδαφος. Τους οργανισμούς αυτούς τους ονομάζουμε «εδαφογενή παθογόνα» και τις ασθένειες που προκαλούν «εδαφογενείς» ασθένειες. Στα εδαφογενή παθογόνα περιλαμβάνονται είδη που ανήκουν σε διάφορες ομάδες ζωντανών οργανισμών, οι σπουδαιότερες των οποίων είναι οι μύκητες, τα βακτήρια και οι νηματώδεις ζωικοί εχθροί. Το έδαφος αποτελεί ένα οικοσύστημα, πλούσιο σε μικροοργανισμούς, πολλοί εκ των οποίων εμφανίζουν φυτοπαθογόνο δράση, προκαλώντας την εκδήλωση σοβαρών ασθενειών των φυτών. Ο χειρισμός των μικροοργανισμών αυτών με διάφορες καλλιεργητικές πρακτικές αποτελεί τη βάση της βιολογικής μεθόδου αντιμετώπισης των εδαφογενών παθογόνων (Γραβάνης, 2004).

Εκτός, όμως, από τις καλλιεργητικές πρακτικές, υπήρξαν ορισμένες παρατηρήσεις που έδωσαν νέα διάσταση στο θέμα της βιολογικής καταπολέμησης. Οι παρατηρήσεις προήλθαν από τα «κατασταλτικά» εδάφη, στα οποία η συχνότητα εμφάνισης ασθενειών των φυτών είναι σημαντικά μειωμένη. Σύμφωνα με τους (Baker και Cook, 1983), στα εδάφη αυτά το παθογόνο είτε δεν εγκαθίσταται ή εγκαθίσταται, αλλά προκαλεί μικρή ή καθόλου ζημία, ή τέλος προκαλεί ζημία, η οποία σταδιακά γίνεται αναξιόλογη, αν και το παθογόνο βρίσκεται στο έδαφος. Τα κατασταλτικά εδάφη οφείλουν τις ιδιότητές τους στην ύπαρξη μικροοργανισμών που δρουν ως βιολογικοί ανταγωνιστές των φυτοπαθογόνων. Κατασταλτικά εδάφη έχουν αναφερθεί για διάφορους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς όπως *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Fusarium oxysporum*, *Aphanomyces euteiches*, *Thielaviopsis basicola*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora infestans*, *Pythium splendens*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Streptomyces scabies* καθώς και νηματώδεις όπως *Heterodera avenae* και *H. schachtii*. (Weller et. al., 2002).

Μικροβιολογικές αναλύσεις των εδαφών αυτών οδήγησαν στην απομόνωση ριζοβακτηρίων που προάγουν την αύξηση των φυτών PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Τα βακτήρια αυτά, που διαβιούν στη ριζόσφαιρα,

διαθέτουν την ικανότητα ανάπτυξης σημαντικών πληθυσμών στην επιφάνεια και σε μερικές περιπτώσεις, στο εσωτερικό των ριζών. Οι πρώτες εφαρμογές των PGPR σε καλλιέργειες έγιναν με σκοπό τη βελτίωση της γονιμότητας του εδάφους, μέσω της αύξησης του διαθέσιμου αζώτου. Οι μηχανισμοί με τους οποίους προωθούν την ανάπτυξη των φυτών είναι: η δέσμευση ατμοσφαιρικού αζώτου (από συμβιωτικά και ελευθέρως διαβιούντα), η αύξηση της διαλυτότητας του φωσφόρου, η παραγωγή φυτορρυθμιστικών ορμονών (π.χ. γιββερελίνες, ινδολοξικό οξύ), η ρύθμιση της παραγωγής αιθυλενίου στις ρίζες, η απορρόφηση βαρέων μετάλλων-τοξικών για τα φυτά κ.α. (Lalande *et al.*, 1989; Bowen και Rovira, 1999) .

Αργότερα, ορισμένα PGPR χρησιμοποιήθηκαν ως βιολογικοί παράγοντες καταστολής εδαφογενών παθογόνων μυκήτων (Broadbent *et al.*, 1971). Γενικά, είναι δυνατόν στελέχη PGPR τα οποία αποτελούν βιολογικούς παράγοντες καταπολέμησης να προωθούν παράλληλα και την ανάπτυξη των φυτών. Είναι όμως δυνατόν μερικά PGPR να καταστέλλουν την ανάπτυξη μιας ασθένειας χωρίς να ανταγωνίζονται απευθείας τον παθογόνο μικροοργανισμό. Η καταπολέμηση της ασθένειας, στην περίπτωση αυτή είναι πολύ πιθανόν να οφείλεται είτε στην επιτάχυνση της ανάπτυξης των φυτών που συνεπάγεται τη βράχυνση του σταδίου στο οποίο το φυτό είναι ευπαθές στην προσβολή, είτε στην επαγωγή διασυστηματικής ανθεκτικότητας του φυτού έναντι του παθογόνου (Klopper *et al.*, 1999).

Παρά τις έρευνες που έχουν διεξαχθεί τα τελευταία χρόνια, προκειμένου να αναλυθούν σε βάθος οι μηχανισμοί τους οποίους χρησιμοποιούν για την καταστολή ορισμένων παθογόνων, δεν υπάρχουν ακόμη ενδείξεις ότι όλα τα PGPR έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιηθούν ως παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Για τον λόγο αυτό, έχει προταθεί ο διαχωρισμός των PGPR από τους μικροοργανισμούς-ανταγωνιστές φυτοπαθογόνων. Στα PGPR κατατάσσονται μικροοργανισμοί που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών χωρίς να καταστέλλουν την ανάπτυξη κάποιων άλλων, ενώ στους ανταγωνιστές κατατάσσονται μικροοργανισμοί που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών καταστέλλοντας τις προσβολές τους από φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς (Bashan και Holguin, 1997). Μικροοργανισμοί που έχει διαπιστωθεί ότι μπορούν να αποτελέσουν βιολογικούς παράγοντες καταστολής των φυτοπαθογόνων προέρχονται από διάφορα είδη μυκήτων αλλά και βακτηρίων, τόσο της φυλλόσφαιρας όσο και της ριζόσφαιρας. Ο Weller (1988) αναφέρει ότι η κατασταλτικότητα ορισμένων εδαφών οφείλεται στην παρουσία ορισμένων ειδών μυκήτων που ανήκουν στα γένη

Trichoderma, *Penicillium* και *Sporodesmium* καθώς και βακτηρίων των γενών *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Pasteuria*, *Rhizobium* – *Bradyrhizobium*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Xanthomonas*. Οι μικροοργανισμοί-ανταγωνιστές φυτοπαθογόνων έχουν την ικανότητα να προάγουν την ανάπτυξη των φυτών καταστέλλοντας την ανάπτυξη ή ακόμα και θανατώνοντας παθογόνα, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένους μηχανισμούς καταστολής.

1.2.3. Τα βακτήρια ως βιολογικοί παράγοντες καταστολής των φυτοπαθογόνων μυκήτων.

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

Βασικό κριτήριο για την επιλογή ενός βιολογικού παράγοντα καταστολής, είναι η ικανότητά του να εγκαθίσταται και να διατηρεί τον πληθυσμό του στη ριζόσφαιρα κάτω από συγκεκριμένες εδαφοκλιματικές συνθήκες (π.χ. θερμοκρασία, υγρασία, pH, μηχανική σύσταση του εδάφους, διαθεσιμότητα οξυγόνου). Οι απομονωθέντες μικροοργανισμοί αξιολογούνται επίσης και *in vitro*. Η *in vitro* αξιολόγηση πραγματοποιείται ανάλογα με τον τρόπο δράσης και το μηχανισμό καταστολής που ακολουθεί ο μικροοργανισμός (π.χ. αν ο μικροοργανισμός παράγει κάποιο αντιβιοτικό τότε η *in vitro* αξιολόγηση συνίσταται στην παρατήρηση της παρεμπόδισης που θα εμφανιστεί σε τρυβλία). Η ικανότητα ενός μικροοργανισμού να παρεμποδίζει την *in vitro* ανάπτυξη ενός παθογόνου δεν συνεπάγεται σε καμία

περίπτωση και την καταστολή της ασθένειας που προκαλείται από το παθογόνο αυτό *in vivo* (Wong και Baker, 1984). Είναι δυνατόν στελέχη που παρουσιάζουν μεγάλη αναστολή της αύξησης *in vitro* να μην καταστέλλουν ικανοποιητικά το παθογόνο *in vivo*.

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

Χαρακτηριστικά είναι τα παραδείγματα της ανταγωνιστικής τους δράσης. Το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* CHA0 αποδείχτηκε ικανός βιολογικός ανταγωνιστής του νηματώδους *Meloidogyne javanica* που προκαλεί το σχηματισμό φυματίων στην τομάτα (Siddiqui *et al.*, 2003). Η φθορίζουσα ψευδομονάδα *Pseudomonas fluorescens* 2-79 και η *Pseudomonas aurofaciens* 30-84 που απομονώθηκαν από ρίζες σιταριού, αποδείχτηκαν ότι μείωναν το παρασιτικό πλάγιασμα (Take-All decline). Οι ψευδομονάδες αυτές εκδήλωναν την ανταγωνιστική τους δράση εναντίον του *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* παράγοντας την αντιβιοτική ουσία φαιναζίνη-1-καρβοξυλικό οξύ, (phenazine-1-carboxylic acid), (Thomashow *et al.*, 1990). Το βακτήριο *Pseudomonas aurantiaca* S-1 παρήγαγε αντιμικροβιακές ενώσεις εναντίον του *Fusarium oxysporum* (Mandryk *et al.*, 2007) και η φθορίζουσα ψευδομονάδα P.f. HV37a κατέστειλε τη δράση του *Pythium ultimum* με τον ίδιο μηχανισμό (Douglas *et al.*, 1986). Τα βακτήρια αυτά απομονώθηκαν από τις εστίες μόλυνσης του ίδιου του παθογόνου ενώ ένα πλούσιο απόθεμα από όπου μπορούσαν να απομονωθούν ήταν τα κατασταλτικά εδάφη (Sneh *et al.*, 1987).

Η προσπάθεια εφαρμογής των μικροοργανισμών στη βιολογική καταπολέμηση έχει επεκταθεί και στην παραγωγή εμπορικών σκευασμάτων των βακτηρίων. Τα εμπορικά σκευάσματα Companion, Kodiak και Rhizo-Plus παράγονται από απομονώσεις του γένους *Bacillus* και είναι αποτελεσματικά εναντίον εδαφογενών κυρίως φυτοπαθογόνων. Τα σκευάσματα Norbac 84-C, Galltrol και Nogall προέρχονται από το μη παθογόνο στέλεχος K84 του *Agrobacterium*

radiobacter, που συνίσταται για την καταπολέμηση του καρκίνου των φυτών από το παθογόνο *A. tumefaciens*. Τα σκευάσματα επίσης Spot-Less, BlightBan και Bio Save προέρχονται από απομονώσεις των βακτηρίων *Ps. aureofaciens*, *Ps. fluorescens* και *Ps. syringae* αντίστοιχα. Το Spot-Less είναι αποτελεσματικό εναντίον μυκήτων που προσβάλλουν καλλιέργειες χλοοταπήτων και άλλων φυτών. Το BlightBan, είναι αποτελεσματικό στην αντιμετώπιση του βακτηριακού καψίματος (*Erwinia amylovora*) των μηλοειδών, καθώς και για άλλες ασθένειες σε πυρηνόκαρπα, πατάτα, φράουλα και τομάτα. Τέλος, το Bio Save χρησιμοποιείται κυρίως στα εσπεριδοειδή και είναι επίσης αποτελεσματικό στην αντιμετώπιση ανθεκτικών στελεχών μυκήτων που προσβάλλουν τα μηλοειδή (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007). Παρά την πληθώρα ερευνητικών εργασιών λίγοι μικροοργανισμοί έχουν αναπτυχθεί σε εμπορικά σκευάσματα για γεωργική χρήση και λιγότερα από δέκα αριθμούνται τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα που βασίζονται σε ανταγωνιστικά βακτήρια (Koch, 1999, Baker *et al*, 1990).

1.2.4. Μηχανισμοί καταστολής φυτοπαθογόνων μυκήτων από βακτηριακούς ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς.

Τα μέσα που χρησιμοποιούν τα βακτήρια προκειμένου να ανταγωνιστούν τα παθογόνα είναι ποικίλα και διαφοροποιούνται ανάλογα από τον τύπο της αλληλεπίδρασης (έμμεσος, άμεσος ανταγωνισμός) και τον μηχανισμό του ανταγωνισμού (παρασιτισμός, ανταγωνισμός για θρεπτικά στοιχεία, αντιβίωση). Ο άμεσος ανταγωνισμός προκύπτει από τη φυσική επαφή και τον υψηλό βαθμό εκλεκτικότητας του βιολογικού ανταγωνιστή για το παθογόνο. Με αυτήν την έννοια ο παρασιτισμός θεωρείται η πιο άμεση μορφή ανταγωνισμού διότι η καταστολή του παθογόνου επιτυγχάνεται από τον ίδιο το βιολογικό παράγοντα, συχνά σε επαφή με τον παθογόνο μικροοργανισμό. Το φαινόμενο λαμβάνει χώρα τόσο στη φυλλόσφαιρα όσο και στη ριζόσφαιρα μέσω της παραγωγής και απέκκρισης ενζύμων όπως οι χιτινάσες και οι κυτταρινάσες, χωρίς να μεσολαβήσει άλλος οργανισμός ή μέσο (Pal *et al.*, 2006). Αντίθετα, χαρακτηριστική περίπτωση έμμεσου ανταγωνισμού είναι η επαγωγή ανθεκτικότητας, όπου η εφαρμογή των ριζοβακτηρίων δεν επηρεάζει δυσμενώς το παθογόνο αλλά επάγει μηχανισμούς ανθεκτικότητας στο φυτό. Ο ανταγωνισμός θέσης στη ριζόσφαιρα καθώς και για θρεπτικά συστατικά είναι πολύ γνωστοί μηχανισμοί επιβίωσης των βακτηρίων. Ορισμένα βακτήρια της ριζόσφαιρας

όπως για παράδειγμα οι φθορίζουσες ψευδομονάδες (*Pseudomonas fluorescens*), έχουν την ικανότητα να παράγουν εξειδικευμένες ενώσεις που ονομάζονται σιδηροφόρα, δηλαδή ενώσεις που δεσμεύουν τον σίδηρο και τον αποστερούν από τα παθογόνα (Weller, 1988, Penyalver *et al.*, 2001), δρώντας ανταγωνιστικά. Μια άλλη χαρακτηριστική περίπτωση ανταγωνισμού για την οποία θα αναφερθούμε εκτενέστερα παρακάτω, είναι ο ανταγωνισμός με παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων από τους βιολογικούς παράγοντες καταστολής των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών.

1.3. Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*

1.3.1. Χαρακτηριστικά και ιδιότητες

Τα είδη του γένους *Pseudomonas* κατατάσσονται σε δύο ομάδες: α) τις φθορίζουσες ψευδομονάδες (π.χ. *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *Ps. syringae*, *Ps. cichorii*) και β) τις μη φθορίζουσες ψευδομονάδες (π.χ. *Ps. stutzeri*, *Ps. mendocina*). Ένα κοινό χαρακτηριστικό των φθορίζουσών ψευδομονάδων είναι η παραγωγή χρωστικών ουσιών που φθορίζουν όταν διεγερθούν από φως με μήκος κύματος στα 254 nm (υπεριώδες). Η παραγωγή τέτοιων χρωστικών είναι ιδιαίτερα υψηλή μετά την αύξηση υπό συνθήκες μειωμένης συγκέντρωσης σιδήρου. Μερικές από αυτές τις χρωστικές ουσίες και τα παράγωγά τους είναι γνωστές για τον ρόλο που διαδραματίζουν ως σιδηροφόρα. Η παραγωγή των χρωστικών ουσιών καταδεικνύεται εύκολα με την καλλιέργεια των βακτηρίων σε θρεπτικά μέσα όπως το King's B, το οποίο δεν περιέχει καμία πηγή σιδήρου (Neilands, 1995).

Τα είδη του γένους *Pseudomonas* είναι ιδιαίτερα σημαντικά εξαιτίας της ικανότητάς τους να αποικοδομούν ενώσεις που είναι ιδιαίτερα τοξικές σε άλλους οργανισμούς, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται αλειφατικοί και αρωματικοί υδρογονάνθρακες, λιπαρά οξέα, φυτοφάρμακα και άλλοι περιβαλλοντικοί ρύποι. Υπάρχουν είδη τα οποία μπορούν να χρησιμοποιήσουν περισσότερες από 150 διαφορετικές οργανικές ενώσεις ως μοναδική πηγή άνθρακα, με εξαιρέσεις το τεφλόν και οργανικές ενώσεις με ένα άτομο άνθρακα (μεθάνιο, μεθανόλη, φορμαλδεΐδη, κ.λπ.). Μερικά είδη ψευδομονάδων (π.χ. *Ps. fluorescens*) αποτελούν επίσης ένα από τους παράγοντες αλλοίωσης των κατεψυγμένων τροφίμων διότι έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες (4°C), και τη δυνατότητα υδρόλυσης της ζελατίνης. Οι φυτοπαθόγones ψευδομονάδες προκαλούν τις ασθένειες των

περισσότερων σημαντικών ομάδων ανώτερων φυτών. Μερικές από τις σοβαρότερες ασθένειες προκαλούνται από τους παθότυπους (pathovars) των ειδών *P. solanacearum* και *P. syringae*. Τα συμπτώματα των φυτών που προσβάλλονται από τα φυτοπαθογόνα αυτά είναι νεκρωτικές κηλίδες, υπερπλασίες, αποσυνθέσεις των ιστών και αγγειακές μολύνσεις (θρομβώσεις των αγγειώδων δεσμίδων). Μερικές ψευδομονάδες, όπως το *Ps. aeruginosa* και το *Burkholderia cepacia*, είναι μολυσματικές και σε φυτά και σε ζώα.

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

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

Μια ακόμα σημαντική ιδιότητα που παρουσιάζουν ορισμένα είδη του γένους *Pseudomonas*, είναι ότι αποτελούν πυρήνες πάγου στις θερμοκρασίες άνω των -10 °C. Τρία είδη (*Ps. syringae*, *Ps. fluorescens*, και *Ps. viridiflava*) φαίνεται ότι περιέχουν

παγοπυρηνωτικά στελέχη. Η μελέτη της βακτηριακής παγοπυρήνωσης έχει λάβει την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας, τα τελευταία χρόνια, λόγω των ζημιών παγετού που προκαλούνται από τα βακτήρια αυτά. Η ιδιότητα της παγοπυρήνωσης των βακτηρίων προέρχεται από τη σύνθεση μεγάλων πρωτεϊνικών μορίων (πρωτεΐνες παγοπυρήνωσης, Μοριακού Βάρους 118 kDa ή μεγαλύτερο) οι οποίες αποτελούν πυρήνες σχηματισμού πάγου (Morris *et al.*, 2004).

1.3.2. Αντιμικροβιακές ενώσεις από βακτήρια του γένους *Pseudomonas* .

Οι αντιμικροβιακές ενώσεις είναι προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού και περιλαμβάνουν αντιβιοτικές ενώσεις, ένζυμα και πτητικές ουσίες όπως το υδροκυάνιο (Weller, 1988; Thomashow *et al.*, 1995), οι οποίες σε μικρές συγκεντρώσεις επηρεάζουν δυσμενώς την ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων. Οι αντιβιοτικές ενώσεις συγκεκριμένα, είναι οργανικά μόρια μικρού μοριακού βάρους όπου σε μικρές συγκεντρώσεις μπορούν να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη και τις μεταβολικές διεργασίες των μικροοργανισμών. Το έδαφος είναι πλούσιο σε μικροοργανισμούς ικανούς να συνθέτουν αντιβιοτικές ενώσεις και τούτο είναι πλέον αποδεδειγμένο τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Το ενδιαφέρον της έρευνας έχει στραφεί στα γονίδια και τις βιοχημικές οδούς που ελέγχουν τη βιοσύνθεσή τους καθώς και τη δυναμική βιοσύνθεση *in planta* σε σχέση με τη διαδικασία προσβολής και τη σύνθεση της μικροχλωρίδας της ριζόσφαιρας και της σπερμόσφαιρας. Η ανάπτυξη μοριακών και γενετικών τεχνικών σε συνδυασμό με την χρήση ποικίλων βιοαναλυτικών εφαρμογών έχει αποδείξει ότι οι μικροοργανισμοί παράγουν μια ποικιλία αντιβιοτικών ενώσεων τόσο στη σπερμόσφαιρα όσο και στη ριζόσφαιρα του φυτού ξενιστή. Πολλοί αβιοτικοί παράγοντες όπως το οξυγόνο, η θερμοκρασία, οι πηγές αζώτου, άνθρακα και μικροστοιχείων καθώς και άλλων προϊόντων μεταβολισμού που απελευθερώνονται από τα φυτά μπορούν να επηρεάσουν τη σύνθεση των αντιβιοτικών ουσιών από τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Οι αντιβιοτικές ενώσεις ανταγωνίζονται ή και καταστέλλουν τη δράση παθογόνων μικροοργανισμών στα φυτά, όμως, ο ακριβής μηχανισμός δράσης για πολλές από αυτές δεν είναι απόλυτα γνωστός (Thomashow *et al.*, 2002).

Είναι γνωστό, όμως, ότι οι αντιβιοτικές ενώσεις είναι προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού και για τη βιοσύνθεσή τους απαιτούνται σημαντικά ποσά ενέργειας. Η παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών στη ρίζα, και επομένως η επίδρασή τους στη σύνθεση

της μικροχλωρίδας, σχετίζεται στενά με τα επίπεδα αποικισμού των οργανισμών που τις παράγουν. Οι μικροοργανισμοί με δυνατότητα παραγωγής αντιβιοτικών ουσιών πλεονεκτούν σημαντικά έναντι των παθογόνων ανταγωνιστών τους γιατί μπορούν και αξιοποιούν οικοθέσεις-κλειδιά, που τους εξασφαλίζουν την πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων που ελευθερώνονται από τις ρίζες και διασφαλίζουν την ανάπτυξη τους. Παραγωγή αντιβιοτικών είναι δυνατόν να παρατηρείται μόνο υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Έτσι, ενώ άλλα βακτηριακά στελέχη έχουν την ικανότητα παραγωγής αντιβιοτικών *in vitro* και *in vivo*, για άλλα η ικανότητα αυτή παρατηρείται μόνο *in vivo* και παρουσία του παθογόνου.

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν απομονωθεί πολλές αντιβιοτικές ενώσεις από βιολογικούς ανταγωνιστές που ανήκουν σε διαφορετικά γένη βακτηρίων (Raaijmakers *et al.*, 2002; Haas *et al.*, 2003). Δημοσιευμένες ερευνητικές μελέτες καταδεικνύουν ότι η παραγωγή αντιβιοτικών από βακτήρια του γένους *Pseudomonas* αποτελεί πολύ συχνό μηχανισμό δράσης τους. Οι μελέτες των Howell και Stipanovic (1979, 1980) απέδειξαν ότι το βακτηριακό στέλεχος Pf-5 του *Ps. fluorescens* βιοσυνθέτει δυο συγκεκριμένα αντιβιοτικά, τα οποία απομονώθηκαν. Επεμβάσεις είτε με το στέλεχος αυτό, είτε με τα δύο αυτά αντιβιοτικά, οδήγησαν σε βιολογική καταπολέμηση των ασθενειών τήξης φυταρίων βάμβακος που προκαλείται από τους μύκητες *Rhizoctonia solani* και *Pythium ultimum*.

Σε άλλη σχετική μελέτη (Howie και Suslow, 1986) αποδείχθηκε ότι ακόμα ένα στέλεχος του βακτηρίου *Ps. fluorescens*, είναι ικανό να καταπολεμήσει τις τήξεις που προκαλεί το παθογόνο *Pythium ultimum* σε φυτάρια βάμβακος μέσω της βιοσύνθεσης ενός αντιβιοτικού. Χαρακτηριστική είναι και η περίπτωση μιας ομάδας μυκητοκτόνων παραγώγων του αντιβιοτικού πυρρολνιτρίνη (pyrrolnitrin), το οποίο παράγεται κατά το μεταβολισμό του βακτηρίου *Pseudomonas pyrociniae*. Η μεγάλη αποτελεσματικότητα του pyrrolnitrin κατά διαφόρων παθογόνων μυκήτων οδήγησε στη δημιουργία δυο συνθετικών αναλόγων του, του fenpiclonil και fludioxonil (Narayanasamy, 2006).

Στον πίνακα I παρουσιάζονται χαρακτηριστικά παραδείγματα της δράσης των αντιβιοτικών ουσιών που παράγονται από τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* καθώς και από ορισμένα γένη άλλων γνωστών βακτηρίων και μυκήτων.

Πίνακας 1.1. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα αντιβιοτικών ουσιών από βακτηριακούς ανταγωνιστές

Αντιβιοτικό	Στέλεχος/Είδος	Παθογόνο στόχος	Προέλευση	Αναφορά
Διακετυλο-φλορογλουκινόλη 1-(3-ακέτυλ-2,4,6-τριυδροξυφαινύλ)-αιθανόνη (DAPG)	<i>Pseudomonas</i> spp. Q2-87	Ggt	Σιτάρι, WA, ΗΠΑ	Vincent <i>et al.</i> , 1991
	CHAO	Ggt, Tb, Pu	Καπνός, Ελβετία	Keel <i>et al.</i> , 1992
	F113	Pu	Ζαχαρότευτλο,	Shanahan <i>et al.</i> , 1992
	PFM2	St	Ιρλανδία	Levy <i>et al.</i> , 1992
	PF-5	Pu, Rs	Σιτάρι, ΗΠΑ	Howell και Stipanovic 1979
	Q8r1-96	Ggt	Βαμβάκι, Τέξας, ΗΠΑ	Raaijmakers και Weller 2001
Φαιναζίνες (Phenazines)	<i>Pseudomonas</i> spp. 2-79RN10	Ggt	Σιτάρι, WA, ΗΠΑ	Weller 1983
	30-84	Ggt	Σιτάρι, Κάνσας, ΗΠΑ	Pierson & Thomashow 1992
	PGS12	Fo	Δημητριακά, Βέλγιο	Georgakopoulos <i>et al.</i> , 1994
	In-b-109	Rs, Gg	Ρύζι, Φιλιππίνες	Rosales <i>et al.</i> , 1995
	PCL1391	Fo	Ντομάτα, Ισπανία	Chin-A-Woeng <i>et al.</i> , 1998
	PNA1	Fo, Ps	Ρεβίθι, Ινδία	Anjaiah <i>et al.</i> , 1998
Ωμοκίνη Α	<i>Ps. fluorescens</i> Hv37a	Pu	Κριθάρι, ΗΠΑ	James <i>et al.</i> , 1986
Οομυκίνη Α Πυρρολνιτρίνη 3-γλώρο-4-(3-γλώρο-2-νιτροφαινύλ)-1Η-πυρρόλη (Pyrrrolnitrin)	<i>Ps. fluorescens</i> BL915	Rs	Βαμβάκι, ΗΠΑ	Ligon <i>et al.</i> , 2000
	<i>B. cepacia</i> B37w	Fs	Πατάτα	Burkhead <i>et al.</i> , 1994
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	Bc, Rs	Σταφύλι, Ουζμπεκιστάν	Chernin <i>et al.</i> , 1996
	<i>Serratia</i> spp.	Vd, Rs, Ss	Oilseed rape	Kalbe <i>et al.</i> , 1996
Πυολουτεορίνη 4,5-δίγλωρο-1Η-πυρρόλ-2-υλ)-(2,6-διυδροξυφαινύλ)-μεθανόνη (Pyoluteorin)	<i>Ps. fluorescens</i> Pf-5	Pu, Rs	Βαμβάκι, Τέξας, ΗΠΑ	Howell & Stipanovic 1979
	CHAO	Tb, Pu	Καπνός, Ελβετία	Keel <i>et al.</i> , 1992
2,3-διεπόξυ-2,3 διυδροροζοξίνη (DDR)	<i>Ps. borealis</i> MA342	Pt, Tc	Σιτάρι, Δημητριακά	Hokeberg <i>et al.</i> , 1998
Κυκλικό δεμπεπτίδιο Βισκοσινάμιν (Viscosinamide)	<i>Ps. fluorescens</i> DR54	Rs, Pu	Ζαχαρότευτλο, Δανία	Nielsen <i>et al.</i> , 1999
Βουτυρολακτόνες (Butyrolactones)	<i>Ps. aureofaciens</i> 63-28	Pu, ,Pc	Καναδάς	Gamard <i>et al.</i> , 1997
N-βουτυλβενζέν-σουλφοναμίδιο (N-BBS).	<i>Pseudomonas</i> sp AB2	Pu, Rs, Bc	Έδαφος, Κορέα	Ki Kim <i>et al.</i> , 2000
AFA	<i>S. violaceusniger</i> YCED-9	Pu	Μαρούλι	Trejo-Estrada <i>et al.</i> , 1998
Παντοσίνη (R)-N-[(S)-2-Αμινο-προπανουλάμινο]-μεθύλ]-2-μεθανοσουλφονύλ-σουκινναμικό οξύ (Pantocin A και B)	<i>Ps. agglomerans</i> EH318	Eh	Μήλο, ΗΠΑ	Wright <i>et al.</i> , 2001

Αντιβιοτικό	Στέλεχος /Είδος	Παθογόνο στόχος	Προέλευση	Αναφορά
Μακροκυκλικές λακτάμες τετραμικού οξέος (Xanthobaccins A,B,C)	<i>Stenotrophomonas</i> SB-K88	Pu	Ζαχαρότευτλο, Ιαπωνία	Nakayama <i>et al.</i> , 1999
Λιποπεπτιδίο AFC-BC11	<i>B. cepacia</i> BC11	Rs	Έδαφος, Βαμβάκι	Kang <i>et al.</i> , 1998
Κανοσαμίνη 3-άμινο-3-δεόξυ-D- γλυκόζη (Kanosamine)	<i>B. cereus</i> UW85	Pm	Τριφύλλι	Milner <i>et al.</i> , 1996
4,8-διάμινο-N-[1-άμινο- 3-(καρβαμουλάμινο)-1- οξοπροπαν-2-υλ]- 2,3,5,7,9- πενταυδροξυναμίδιο (Zwittermycin A)	<i>B. cereus</i> UW85	Pm	Τριφύλλι,	Silo-Suh <i>et al.</i> , 1994

¹ DAPG – 2,4-diacetylphloroglucinol; DDR – 2,3-de-epoxy-2,3-didehydro-rhizoxin; N-BBS – N-Butylbenzenesulphonamide. ² At – *Agrobacterium tumefaciens*; Ggt – *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*; Tb – *Thielaviopsis basicola*; Pu, *Pythium ultimum*; St – *Septoria tritici*; Rs – *Rhizoctonia solani*; Fo – *F. oxysporum* ; Gg – *G. graminis*; Ps – *Pythium splendens*; Fs – *Fusarium sambucinum*; Pt – *Pyrenophora teres*; Tc – *Tilletia caries*; Pc – *Phytophthora cryptogea*; Bc – *Botrytis cinerea*; Eh – *Erwinia herbicola*; Pm – *Phytophthora medicaginis*; Vd – *Verticillium dahliae*; Ss – *Sclerotinia sclerotiorum*

Οι παραπάνω μελέτες απέδειξαν ότι τα βακτήρια μπορούν και ανταγωνίζονται φυτοπαθογόνους μύκητες παράγοντας αντιμικροβιακές ενώσεις. Παρ' όλα αυτά, η *in situ* ανίχνευση των αντιβιοτικών ουσιών είναι μια πολύπλοκη διαδικασία. Η ανίχνευση, η ανάκτηση και πολύ περισσότερο η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των αντιβιοτικών ουσιών δυσχεραίνονται λόγω της χημικής αστάθειας των ουσιών αυτών, ή της μη αντιστρεπτής πρόσδεσής τους με τα κολλοειδή ή την οργανική ύλη του εδάφους ακόμη και εξαιτίας μικροβιακής αποσύνθεσης (Thomashow *et al.*, 1997). Δεδομένου ότι είναι δύσκολη η *in situ* ποσοτικοποίηση των παραγόμενων από τους ανταγωνιστές φυτοπροστατευτικών ενώσεων (έδαφος, ριζόσφαιρα, σπερμόσφαιρα), έχει επιχειρηθεί η μελέτη τους έμμεσα, με χρήση γονιδίων-ανταποκριτών, τα οποία μετρούν την μεταγραφή των γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των ενώσεων αυτών. Το σύστημα του γονιδίου-ανταποκριτή της παγοπυρήνωσης είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο και κατάλληλο για σχετικές μελέτες είτε στο υπέργειο, είτε στο υπόγειο τμήμα του φυτού (Georgakopoulos *et al.*, 1994b).

Υπάρχει ωστόσο ένα βασικό ερώτημα που δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Η συγκέντρωση των αντιβιοτικών ενώσεων που παράγονται στη ριζόσφαιρα είναι ικανή να εξουδετερώνει τα παθογόνα και αν όχι πως αποδίδεται σε αυτά η ικανότητα να καταστέλλουν τους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς; Τα μέχρι στιγμής πειραματικά δεδομένα δεν φαίνεται να δείχνουν ότι οι αντιβιοτικές ενώσεις θανατώνουν τους φυτοπαθογόνους μύκητες *in situ*. Παράγονται στη ριζόσφαιρα σε τέτοιες συγκεντρώσεις που δε θεωρούνται τοξικές για το παθογόνο, θεωρούνται όμως ότι αποτρέπουν τους παθογόνους εισβολείς ή επάγουν μηχανισμούς ανθεκτικότητας στα φυτά. Η ουσία κινολόνη, για παράδειγμα, που ανήκει στην κατηγορία των μακρολιδικών αντιβιοτικών, παράγεται σε συγκέντρωση ικανή να παρεμποδίζει την παραγωγή των τοξινών που παράγει το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa*, αποτρέποντας την εκδήλωση της ασθένειας της κυστικής ίνωσης των πνευμόνων, χωρίς να εξουδετερώνεται το ίδιο το παθογόνο βακτήριο (Haas *et al.*, 2003).

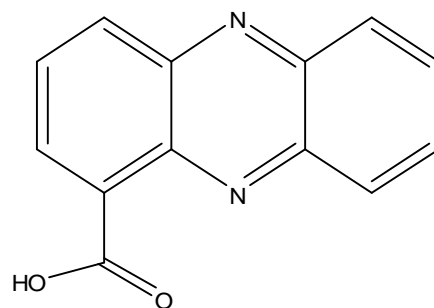
Τα γονίδια και οι βιοχημικές οδοί που ελέγχουν τη βιοσύνθεση των αντιβιοτικών μελετώνται *in vitro* με την εφαρμογή μοριακών και βιοαναλυτικών τεχνικών. Τα αποτελέσματα των πειραματικών σχεδιασμών είναι χαρακτηριστικά. Η μείωση της ικανότητας παραγωγής αντιβιοτικών ενώσεων με εισαγωγή ή τροποποίηση των γονιδίων που ελέγχουν την παραγωγή των αντιβιοτικών στον άγριο τύπο των ανταγωνιστικών βακτηρίων, οδηγεί στις περισσότερες περιπτώσεις στη μείωση της κατασταλτικής τους δράσης τόσο *in vitro* όσο και *in planta*. Αντίθετα, η ενίσχυση της ικανότητας παραγωγής αντιβιοτικών ενώσεων μετά από μεταλλαξιγένεση των άγριων στελεχών, συντελεί αντίστοιχα στην αύξηση της ικανότητας τους να παρεμποδίζουν τους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς (Raaijmakers *et al.*, 2002; Haas *et al.*, 2003). Πιο συγκεκριμένα, τα μεταλλάγματα της φθορίζουσας ψευδομονάδας *Ps. fluorescens* CHA0 κατέστειλαν αποτελεσματικότερα το φυτοπαθογόνο μύκητα *Pythium ultimum* που προκαλεί την ασθένεια της τήξης των φυταρίων της αγγουριάς σε σχέση με τον άγριο τύπο, διότι σε αυτά είχε ενισχυθεί η ικανότητα παραγωγής των αντιβιοτικών 1-(3-ακέτυλ-2,4,6-τριυδροξυφαινύλ)-αιθανόνης με εμπορική ονομασία 2,4-διακετυλοφλορογλουκινόλης (*Εικ. 1.4.*) και 4,5-δύχλωρο-1H-πυρρόλ-2-υλ)-(2,6-διδυδροξυφαινύλ)-μεθανόνης ή πυλουτεορίνης (*Εικ. 1.3.*), (Maurhofer *et al.*, 1992). Οι Ligon *et al.* (2000) εισήγαγαν πολλαπλά αντίγραφα του ρυθμιστικού γονιδίου *gacA* στο στέλεχος BL915 του *Ps. fluorescens* ενισχύοντας κατά 2.5 φορές την παραγωγή του αντιβιοτικού 3-χλώρο-4-(3-χλώρο-2-νιτροφαινύλ)-1H-πυρρόλη, ή πυρρολνιτρίνη (*Εικ.1.2.*). Σε σχέση με τον άγριο τύπο,

το γενετικά τροποποιημένο αυτό στέλεχος επέδειξε αυξημένη ανταγωνιστική ικανότητα έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani*. Η εισαγωγή, επίσης, βιοσυνθετικών γονιδίων που εκφράζουν την παραγωγή συγκεκριμένων αντιβιοτικών σε στελέχη βακτηρίων που κανονικά δεν τα παράγαν, αύξησε την ανταγωνιστική ικανότητα των γενετικά τροποποιημένων στελεχών και τα κατέστησε ικανότερους βιολογικούς ανταγωνιστές. Στην εργασία των Fenton *et al.*, (1992) η εισαγωγή ενός τμήματος DNA 6kb, απαραίτητου για τη βιοσύνθεση του αντιβιοτικού 2,4-διακετυλοφλορογλουκινόλη, DAPG, από το βακτηριακό στέλεχος *Ps. fluorescens* F113 στο στέλεχος *Ps. fluorescens* M114 που δεν παράγει την εν λόγω ουσία, μετέτρεψε το M114 σε πολύ πιο αποτελεσματικό ανταγωνιστή του μύκητα *Pythium ultimum* στο ζαχαρότευτλο από το πατρικό στέλεχος. Οι Timms-Wilson *et al.*, (2000), εισήγαγαν στο χρωμόσωμα του στελέχους *Ps. fluorescens* SBW25 το οποίο δεν παράγει το αντιβιοτικό φαιναζίνη-1-καρβοξυλικό οξύ, PCA, (εικόνα 1.1.) το οπερόνιο βιοσύνθεσης του αντιβιοτικού αυτού. Τα μεταλλάγματα που παράγαν το PCA ήταν πιο αποτελεσματικά στην καταστολή του φυτοπαθογόνου μύκητα *Pythium ultimum* στο μπιζέλι σε σύγκριση με το πατρικό στέλεχος.

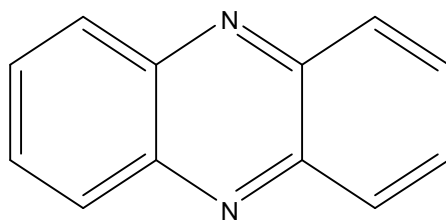
Οι αντιμικροβιακές ενώσεις που παράγονται *in vitro* από τα βακτηριακά στελέχη παραλαμβάνονται βιοχημικά, απομονώνονται, καθαρίζονται και ταυτοποιούνται. Η παραλαβή πραγματοποιείται με αναλυτικές χημικές μεθόδους που περιλαμβάνουν εκχυλίσεις των καλλιεργειών των βακτηριακών στελεχών και μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων απουσία του βακτηρίου. Ο καθαρισμός και η απομόνωση επιτυγχάνεται με διάφορες τεχνικές όπως εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction), χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, (TLC) παρασκευαστική και ημιπαρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, (HPLC). Για την ταυτοποίηση των αντιμικροβιακών ενώσεων εφαρμόζονται ποικίλες τεχνικές, όπως η υπέρυθρη φασματοσκοπία (Infra Red, IR), φασματοσκοπία Raman με μετασχηματισμό Fourier (FT-Raman), φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry, MS) και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, NMR) (Shanahan *et al.*, 1992; Brisbane *et al.*, 1987; Thomashow *et al.*, 1990; Niessen *et al.* 1998,; Lee *et al.*, 2003; Siddiqui *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004). Οι ίδιες τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί και για την απομόνωση των αντιβιοτικών ενώσεων *in planta* από τη ριζόσφαιρα των φυτών όπως και στα *in vitro* πειράματα.

1.3.3 Δομές δευτερογενών αντιβιοτικών ενώσεων.

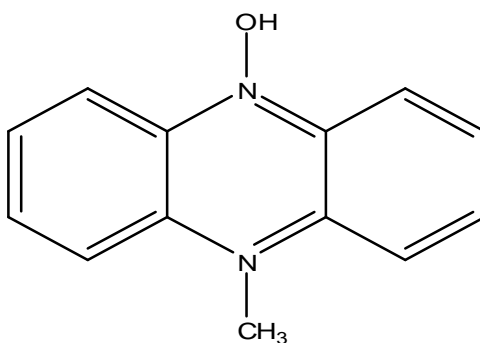
Σχεδόν έναν αιώνα πριν χρονολογούνται οι πρώτες παρατηρήσεις που σχετίζονται με μελέτες της αντιβιοτικής δράσης των περισσότερων δευτερογενών μεταβολιτών από τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*. Το 1899 οι Emmerich και Low παρατήρησαν ότι καλλιέργειες του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*, μπορούσαν να εξουδετερώσουν πολλά είδη βακτηρίων. Το παρασκεύασμα της καλλιέργειας ονομάστηκε πυοκυανάση (pyocyanase) και χρησιμοποιήθηκε ευρέως στη θεραπεία των ασθενειών της διφθερίτιδας, της γρίπης και της μηνιγγίτιδας για πολλά χρόνια. Η έρευνα σήμερα έχει προχωρήσει πολύ. Πολλές αντιβιοτικές ενώσεις έχουν απομονωθεί και η πλειοψηφία των δομών αυτών παρουσιάζει ατιμικροβιακές και φυτοτοξικές δράσεις. Οι φαιναζίνες (phenazines) (Εικ. 1.1), η (4,5-δίχλωρο-1H-πυρρόλ-2-υλ)-(2,6-διυδροξυφαινύλ)-μεθανόνη με εμπορική ονομασία πυολουτεορίνη (pyoluteorin), (Εικ. 1.3.), η 3-χλώρο-4-(3-χλώρο-2νιτροφαινύλ)-1H-πυρρόλη με εμπορική ονομασία πυρρολιτρίνη (pyrrolinitin), (Εικ.1.2.) και τα παράγωγα της ινδόλης (indole), ανήκουν στην κατηγορία των άζωτο-ετεροκυκλικών οργανικών μεταβολιτών που προκύπτουν ως ενδιάμεσα ή τελικά προϊόντα της βιοσύνθεσης των αρωματικών αμινοξέων. Μια δεύτερη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών από τις φθορίζουσες ψευδομονάδες περιλαμβάνει ασυνήθη αμινοξέα και πεπτίδια. Επιπλέον, μεταξύ των δευτερογενών μεταβολιτών, έχουν ανιχνευθεί ορισμένα λιπίδια, γλυκολιπίδια, αντιβιοτικά τύπου λακτάμης, αντιβιοτικά όπως οι φλορογλουκινόλες, οι ωμοκίνες, οι ακετοφαινόνες και διάφορα αλειφατικά προϊόντα. (Leisinger και Margraff, 1979).



Φαιναζίνη-1-καρβοξυλικό οξύ



Φαιναζίνη



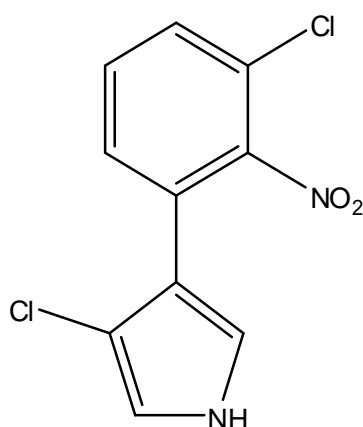
Πυοκυανίνη

Εικόνα 1.1 Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα φαιναζινών

Οι φαιναζίνες (Εικ. 1.1.), είναι αζωτούχα μόρια που παράγονται στη φύση αποκλειστικά από βακτήρια (Turner και Messenger, 1986) και είναι τοξικές σε μύκητες, βακτήρια και φύκη. Οι μηχανισμοί που έχουν προταθεί για τη δράση των ενώσεων αυτών αναφέρονται στον κυτταρικό θάνατο, λόγω της ικανότητάς τους να οξειδώνονται παρουσία αναγωγικών μέσων και μοριακού οξυγόνου, σχηματίζοντας με τον τρόπο αυτό τοξικούς μεταβολίτες (Hassan και Fridovich, 1980). Οι φαιναζίνες παρουσιάζουν ευρύ φάσμα δράσης, το οποίο αποδίδεται στη μεγάλη οξειδοαναγωγή τους ικανότητα (Baron *et al.*, 1981, Whelan P.A. *et al.*, 2006). Διαθέτουν την ικανότητα παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου, ενδέχεται να παίζουν ρόλο στην αναπνοή και στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, έχει βρεθεί ότι επάγουν τη διασυστηματική ανθεκτικότητα των φυτών, ενισχύουν την δημιουργία βιοφίλμ, είναι δυνατόν να αποτελούν μοριακά σήματα στο σύστημα αίσθησης μεγέθους πληθυσμού, έχουν την ικανότητα να δεσμεύσουν ιόντα σιδήρου (Fe^{+3}) παίζοντας τον ρόλο σιδηροφόρων και παρεμποδίζουν την αντιγραφή του DNA (Turner και Messenger, 1986, Pierson *et al.*, 2010).

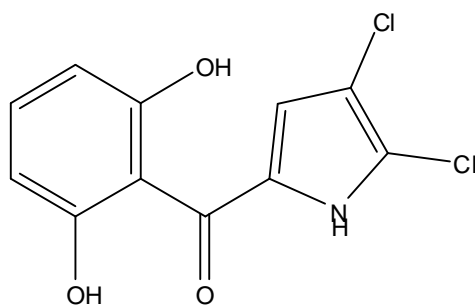
Οι ενώσεις πυοκυανίνη (Εικ. 1.1.) και 1-υδρόξυ-φαιναζίνη απομονώθηκαν από το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* και προσδιορίστηκε η δομή τους με φασματομετρία μαζών (Watson *et al.*, 1986, Kerr *et al.*, 1999). Η ουσία φαιναζίνη-1-

καρβοξυλικό οξύ (Εικ. 1.1) απομονώθηκε από την καλλιέργεια του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* 2-79, και κατέστειλε τις προσβολές του φυτοπαθογόνου μύκητα *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* και *Pythium* spp. που προσβάλλουν τα σιτηρά (Sarangamat *et al.*, 1986). Οι τρεις ενώσεις φαιναζίνη-1-καρβοξυλικό οξύ, 2-υδρόξυ-φαιναζίνη-1-καρβοξυλικό οξύ και 2-υδροξυφαιναζίνη παράγονται από την *P. aureofaciens* 30-84 (Delaney *et al.*, 2001).



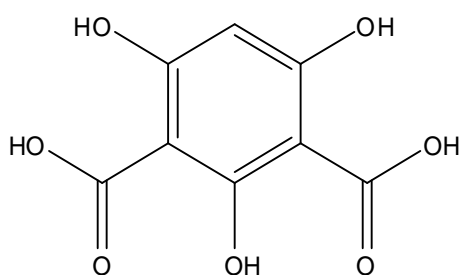
Εικόνα 1.2. Χημική δομή του μορίου της πυρρολιντρίνης

Η πυρρολιντρίνη (Εικ. 1.2.) ανήκει στα χλωριωμένα φαινυλοπυρρολικά αντιβιοτικά και παράγεται από διάφορα βακτηριακά στελέχη του γένους *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Serratia* και *Myxococcus* (Arima *et al.*, 1964; Elander *et al.*, 1968; Hammer *et al.*, 1999; Kalbe *et al.*, 1996). Ο ρόλος της ουσίας αυτής διαφαίνεται μέσα από μελέτες στις οποίες τα μεταλλάγματα των βακτηριών *Ps. fluorescens* BL915 και Pf-5 που δεν παρήγαγαν την πυρρολιντρίνη, έχασαν την ικανότητα να καταστέλλουν τις προσβολές του *R. solani* και του *Pyrenophora tritici-repentis* στα σιτηρά (Hill *et al.*, 1994; Pfender *et al.*, 1993).



Εικόνα 1.3. Χημική δομή του μορίου της πυλουτεορίνης

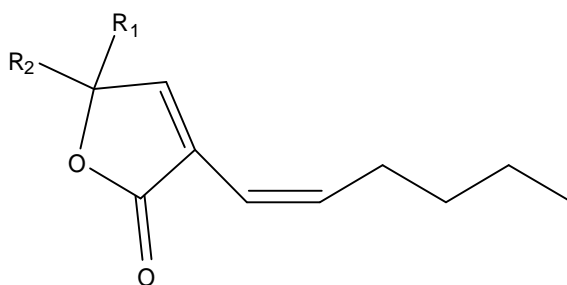
Η πυλουτεορίνη απομονώθηκε αρχικά από το στέλεχος S10B2 του *Ps. aeruginosa* (Ohmori *et al.*, 1978). Σύμφωνα με τους (Wang *et al.*, 2005), η αντιβιοτική ουσία πυλουτεορίνη παράγεται από διάφορα βακτηριακά στελέχη φθοριζουσών ψευδομονάδων, όπως τα στελέχη *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, CHA0 και *Pseudomonas fluorescens* M18.



Εικόνα 1.4. Χημική δομή του μορίου της 2,4 διακετυλοφλορογλουκινόλης

Οι φλορογλουκινόλες παράγονται από βακτήρια, φύκη και φυτά. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται περισσότερα από 60 παράγωγα φλορογλουκινόλης, από αυτά όμως μόλις τα τρία η μονοακέτυλοφλορογλουκινολη (MAPG), η 2,4 διακετυλοφλορογλουκινόλη (2,4 DAPG), και η τριακετυλοφλορογλουκινόλη (TAPG) παράγονται από στελέχη ψευδομονάδων (Reddi και Boronkov, 1969; Shanahan *et al.*, 1992). Η αντιμικροβιακή δράση των μορίων αυτών και ιδιαίτερα της 2,4 DAPG έχει διερευνηθεί αρκετά και έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να καταστείλει τη δράση πολλών παθογόνων μυκήτων, βακτηρίων και νηματωδών (Stutz *et al.*, 1986; Keel *et al.*, 1990; Keel *et al.*, 1996; Vincent *et al.*, 1991; Fenton *et al.*, 1992; Levy *et al.*, 1992; Keel *et*

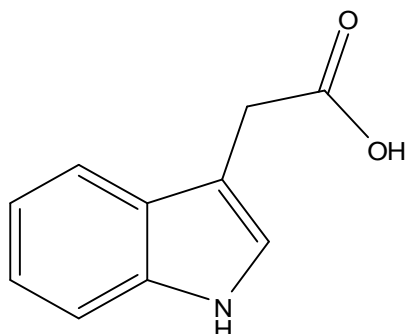
al., 1992; Cronin *et al.*, 1997a, b; Duffy and Defago, 1997; Sharifi-Tehrani *et al.*, 1998). Όπως φαίνεται και στον πίνακα I μεταξύ των μυκήτων ο *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* στα σιτηρά (Vincent *et al.*, 1991), ο *Thielaviopsis basicola* στον καπνό (Keel *et al.*, 1992), ο *Pythium ultimum* στο ζαχαρότευτλο και στο αγγούρι (Duffy και Defago, 1997) και ο *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* στην τομάτα (Stutz *et al.*, 1986) καταστέλλονται από την παρουσία της 2,4-DAPG. Ο ρόλος της 2,4-DAPG στην καταστολή των ασθενειών αποδείχθηκε πειραματικά με τη χρήση μεταλλαγμάτων που έχουν χάσει την ικανότητα να την παράγουν (Vincent *et al.*, 1991; Shanahan *et al.*, 1992; Keel *et al.*, 1992; Cronin *et al.*, 1997a,b).



1. R₁=H, R₂= CH₃
2. R₁=OH, R₂= CH₃
3. R₁=H, R₂= CH₂OH

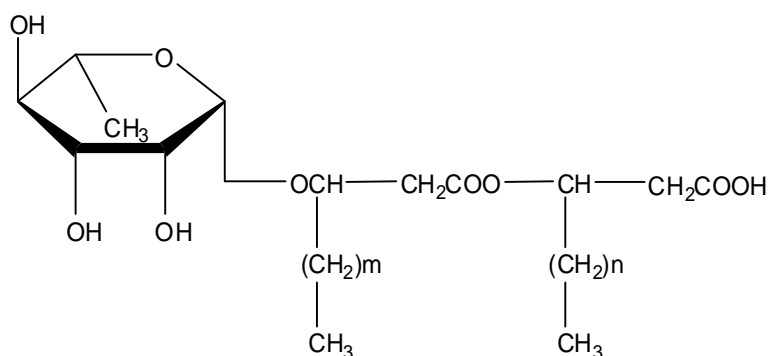
Εικόνα 1.5. Χημική δομή μορίων φουρανόνης με αντιμικροβιακή δράση

Νέες αντιβιοτικές ενώσεις ανακαλύπτονται συνεχώς. Οι Paulitz *et al.*, (2000) απομόνωσαν μια νέα φουρανόνη από το στέλεχος 63-28 του *Pseudomonas aureofaciens* με φυτοπαθογόνο δράση έναντι των μυκήτων *P. ultimum*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* και *Thielaviopsis basicola*.



Εικόνα 1.6. Χημική δομή του μορίου του ινδολοξικού οξέος

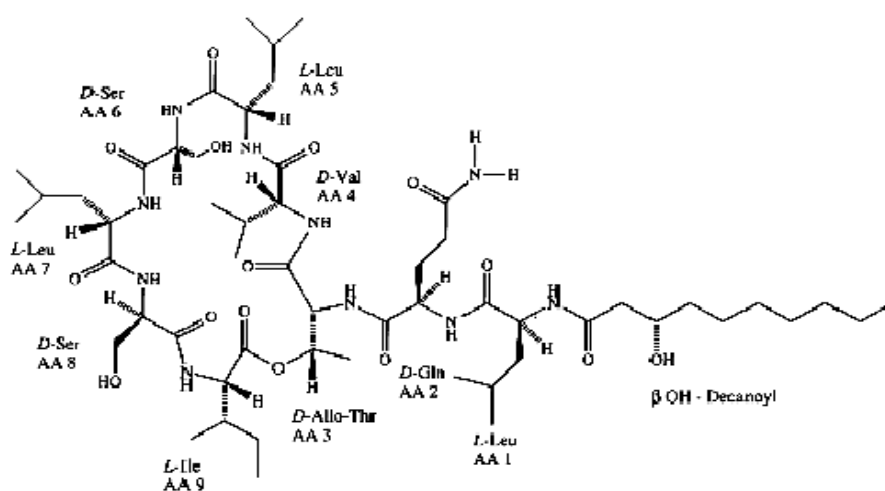
Σύμφωνα με τους Kumar *et al.*, 2005 Το στέλεχος PUPa3 της *Pseudomonas aeruginosa* που απομονώθηκε από τη ριζόσφαιρα του ρυζιού, βρέθηκε να παράγει ένα μεγάλο πλήθος μεταβολιτών. Μεταξύ άλλων ανιχνεύτηκε ο αντιμικροβιακός μεταβολίτης 2-(1H-ινδολ-3-υλ-)οξικό οξύ με εμπορική ονομασία ινδολοξικό οξύ, IAA, που είναι φυτοορμόνη και κατατάσσεται στην κατηγορία των αντιβιοτικών ενώσεων.



Εικόνα 1.7. Χημική δομή ραμνολιπιδίων με αντιμικροβιακή δράση

Ο Fiechter, (1992) υποστήριξε ότι μια μεγάλη κατηγορία αντιμικροβιακών ενώσεων αποτελούν και ορισμένα επιφανειοδραστικά μόρια. Οι ιδιότητες αυτών καθορίζονται από την ταυτόχρονη παρουσία μιας υδρόφιλης και μιας υδρόφοβης περιοχής στο ίδιο το μόριο (Desai και Banat, 1997). Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις διακρίνονται σε ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους και υψηλού μοριακού βάρους. Στην πρώτη κατηγορία κατατάσσονται τα ραμνολιπίδια και τα λιποπεπτίδια, ενώ στη

δεύτερη κατηγορία ανήκουν υψηλού μοριακού βάρους πολυμερικές επιφανειοδραστικές ενώσεις. Τα ραμνολιπίδια και ορισμένα λιποπεπτίδια που παράγονται από βακτήρια του γένους *Pseudomonas* εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση. Τα ραμνολιπίδια (Εικ.1.7.) είναι γλυκολιπίδια που περιέχουν ραμνόζη και β-υδροξυδεκανοϊκό οξύ και παράγονται από συγκεκριμένα στελέχη φθοριζουσών ψευδομονάδων και ειδικότερα από την *Pseudomonas aeruginosa* (Itoh *et al.*, 1971; Van Dijke *et al.*, 1993). Ο ρόλος των ουσιών αυτών στο βιολογικό έλεγχο των ασθενειών έχει διευκρινιστεί τα τελευταία χρόνια (Kim *et al.*, 2000).



Εικόνα 1.8. Χημική δομή λιποπεπτιδίου με αντιμικροβιακή δράση

Τα λιποπεπτίδια (Εικ. 1.8.) είναι κυκλικές δομές που αποτελούνται από ένα υδρόφιλο πεπτιδικό τμήμα επτά έως δέκα αμινοξέων, που συνδέεται με ένα υδρόφοβο λιπαρό οξύ. Η οικογένεια των CLPs περιλαμβάνει ενώσεις οι οποίες έχουν μεγάλη τασιενεργή δράση (biosurfactant). Η ικανότητα τους να μειώνουν την επιφανειακή τάση είναι αποτέλεσμα των ιδιοτήτων των επιμέρους δομικών μονάδων. Η πεπτιδική αλυσίδα έχει πολικές ιδιότητες, οι οποίες διαφέρουν αναλόγως του βαθμού υδροφοβικότητας του κάθε αμινοξέος, ενώ η αλυσίδα του λιπαρού οξέος έχει υδρόφοβο χαρακτήρα. Οι δύο αυτές δομικές μονάδες των κυκλικών λιποπεπτιδίων (CLPs) τους προσδίδουν αμφιφιλικές ιδιότητες και επομένως επιφανειοδραστική ικανότητα (Raaijmakers *et al.*, 2006).

Εκτός από την δράση τους σαν επιφανειοδραστικά μόρια, τα CLPs εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία στη φυσιολογία των μικροοργανισμών που τις παράγουν. Έχει αποδειχθεί ότι είναι δυνατό να δρουν σαν χηλικοί παράγοντες αυξάνοντας την διαθεσιμότητα υποστρωμάτων τα οποία δεν είναι υδατοδιαλυτά. Ορισμένες ομάδες της οικογένειας των CLPs είναι δυνατόν να εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση ενώ άλλες εμφανίζουν μεγάλη φυτοτοξικότητα (Raaijmakers *et al.*, 2006; de Bruijn *et al.*, 2009).

Οι (Nielsen *et al.*, 2002) απομόνωσαν κυκλικά λιποπεπτίδια με αντιβιοτική δράση, από διάφορα βακτήρια του εδάφους μεταξύ άλλων και από φθορίζουσες ψευδομονάδες. Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* παράγουν ένα πλήθος από επιφανειοδραστικά λιποπεπτίδια, όπως η βισκοσίνη (viscosin), (Hiramoto *et al.*, 1970) και η βισκοσιναμίδη, (viscosinamide), (Nielsen *et al.*, 1999) για τις οποίες γνωρίζουμε ότι έχουν την ικανότητα καταστολής παθογόνων ιών του ανθρώπου, όπως είναι διάφοροι ερπητοϊοί και ο ιός της βρογχίτιδας. Τα CLPs αυτά δεσμεύονται στην λιπιδική στοιβάδα των ιών προκαλώντας την αποσύνθεση των πρωτεϊνών του ιικού καψιδίου (Raaijmakers *et al.*, 2006). Η τολασίνη (tolaasin) (Rainey *et al.*, 1991) η τενσίνη (tensin) (Nielsen *et al.*, 2000), οι συρινγοκοπεπτίνες (syringopeptin), οι συρινγομυκίνες (syringomycin), οι συρινγοστατίνες (syringostatin), οι συρινγοτοξίνες (syringotoxin) και οι ψευδομυκίνες (pseudomycin) (Hutchison και Gross, 1997; Serra *et al.*, 1999), είναι επίσης άλλα γνωστά λιποπεπτίδια.

Προκειμένου για τις φυτοτοξικές CLPs, όπως είναι κάποιες συρινγομυκίνες, συρινγοκοπεπτίνες και τολαασίνες από το γένος *Pseudomonas*, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι έχουν την ικανότητα να πολυμερίζονται δημιουργώντας μια τεχνητή μεμβράνη πάνω ακριβώς από την κυτταροπλασματική μεμβράνη του φυτού. Η μεμβράνη, η οποία δημιουργείται από CLPs, έχει πόρους ενεργητικής διάχυσης ιόντων από και προς το εσωτερικό τους. Οι πόροι αυτοί, οι οποίοι έχουν διαφορετική διάμετρο αναλόγως των πολυμερών που σχηματίζονται, διαθέτουν την ικανότητα να μεταφέρουν ιόντα H^+ και Ca^+ προς το εσωτερικό και ιόντα K^+ προς το εξωτερικό. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση του pH των φυτικών μεμβρανών και την επαγωγή διαφόρων μοριακών σημάτων του φυτού τα οποία έχουν σαν περιβαλλοντικό ερέθισμα την μεταβολή της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου, με τελική συνέπεια την λύση των κυττάρων. Ακόμα, ορισμένες από τις φυτοτοξικές CLPs έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν τη δράση των φυτικών ATPασών και φωσφολιπασών (Ramos, 2004).

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναφερθεί νέες ενώσεις που απομονώθηκαν από φθορίζουσες ψευδομονάδες και βρέθηκαν να έχουν αντιμικροβιακή δράση. Η αμφικίνη (amphisin) (Sorensen *et al.*, 2001), η φολιπεπτίνη (pholipeptin) (Ui *et al.*, 1997), η αρθροφακτίνη (arthrobacin) (Morikawa *et al.*, 1993), οι εκομυκίνες (ecomycin) (Miller *et al.*, 1998), όπως και νέες κατηγορίες λιποπεπτιδίων που παράγονται από βακτήρια του γένους *Pseudomonas* όπως η πουτισολβίνη I και II (putisolvin) (Kuiper *et al.*, 2004), για τις οποίες έχει αποδειχθεί ότι έχουν την ικανότητα να καταστρέφουν τα βιοφίλμ που δημιουργούν ορισμένα παθογόνα.

1.4. Αναλυτικές τεχνικές χαρακτηρισμού - ταυτοποίησης αντιμικροβιακών ενώσεων

1.4.1. Υγρή-χρωματογραφία

Η χρωματογραφία συμπεριλαμβάνει μια ποικιλία αναλυτικών τεχνικών, με την εφαρμογή των οποίων επιτυγχάνεται διαχωρισμός λόγω της διαφορετικής ταχύτητας μετατόπισης των συστατικών όταν αυτά περνάνε δια μέσω πορώδους υλικού. Στην υγρή χρωματογραφία ειδικότερα, ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της συνάφειας των ουσιών σε μία στατική φάση στερεή είτε υγρή ακινητοποιημένη σε αδρανές υπόστρωμα και σε μια υγρή κινητή φάση. Οι κύριοι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την εκλεκτική συνάφεια των αναλυτών είναι η κατανομή, η προσρόφηση, η ανταλλαγή ιόντων, η διάλυση σε μια στατική μήτρα ή διαλύτη και η στερεοπαρεμπόδιση. Οι διάφορες μορφές υγρής χρωματογραφίας περιλαμβάνουν τουλάχιστον έναν από αυτούς τους μηχανισμούς, αν και στη πραγματικότητα, κατά τη διάρκεια μιας χρωματογραφικής ανάλυσης λαμβάνουν χώρα δυο ή περισσότεροι μηχανισμοί μαζί (Clark *et al.*, 1992).

1.4.2. Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC)

1.4.2.1. Αρχή μεθόδου- Εφαρμογές.

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC), που αναπτύχθηκε κυρίως από τον Stahl (1950-1958), είναι τεχνική υγρής χρωματογραφίας και καθιερώθηκε ως μια από τις σπουδαιότερες χρωματογραφικές τεχνικές. Η πλάκα της χρωματογραφίας στην TLC, είναι είτε γυάλινη ή φύλλο από αργίλιο ή πλαστικό επιστρωμένο με ξηρό και λεπτότατα διαμερισμένο προσροφητικό

υλικό, όπως π.χ. ενεργοποιημένο διοξείδιο του πυριτίου (silica gel), οξείδιο του αργιλίου (alumina), μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (cellulose powder), γη διατόμων (kieselguh), πολυαμιδίου, κ.τ.λ.

Στην TLC ως κινητές φάσεις χρησιμοποιούνται διαλύτες που ανταγωνίζονται τα συστατικά του μείγματος στην κατάληψη των θέσεων προσρόφησης της στατικής φάσης. Για κάθε υλικό προσρόφησης έχουν κατασκευαστεί κατάλογοι διαλυτών κατά σειρά αυξανόμενης σχετικής ισχύος έκλουσης με βάση την ισχύ του πεντανίου που ορίζεται μηδέν. Στην TLC προσρόφησης η ικανότητα έκλουσης των διαλυτών αυξάνεται με αύξηση της πολικότητάς τους. Προτιμώνται κινητές φάσεις ενός διαλύτη ή το πολύ δυο ή τριών, επειδή οι μεικτοί διαλύτες χρωματογραφούνται οι ίδιοι, καθώς ανέρχονται στη λεπτή στιβάδα με αποτέλεσμα να αλλάζει βαθμιαία η σύσταση της κινητής φάσης.

Η TLC είναι μια ευέλικτη τεχνική γιατί μπορεί να χρησιμοποιηθεί ποικιλία στατικών φάσεων και διάφοροι μηχανισμοί διαχωρισμού. Χρησιμοποιείται εύκολα στην εύρεση του αριθμού των συστατικών ενός μίγματος. Στην πιστοποίηση ενώσεων. Στον έλεγχο της καθαρότητας μιας ένωσης. Στην παρακολούθηση μιας αντίδρασης καθώς και στον ποιοτικό έλεγχο προϊόντων. Κατά την εμφάνιση των χρωματογραφημάτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν και δραστικά μέσα που διευκολύνουν την ανίχνευση ορισμένων ουσιών. Παραδείγματος χάρη με ψεκασμό της πλάκας με πυκνό θειικό οξύ ανιχνεύονται εύκολα οι οργανικές ουσίες, που δίνουν μαύρες κηλίδες από άνθρακα (Χατζηιωάννου, 1997). Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια εμφάνισης είναι το διάλυμα θειικής βανιλίνης, αντιδραστήριο Dragendorff (ειδικό για αλκαλοειδή), διάλυμα ανισαλδεύδης και διάλυμα θειικού οξέος (Johnson *et. al.*, 2007; Gerasimov *et. al.*, 2002; Weinstein, & Wagman, 1978).

1.4.3 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

1.4.3.1. Ορισμός- Πλεονεκτήματα

Η τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) εξελίχθηκε μέσα από συνεχείς προσπάθειες βελτίωσης της απλής χρωματογραφίας στήλης. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας κατασκευής χαλύβδινων στηλών πολύ μικρής διαμέτρου με υψηλή ανθεκτικότητα σε

μεγάλες πιέσεις, η εξέλιξη της επιστήμης των πληρωτικών υλικών, η χρήση αντλιών υψηλής πίεσης καθώς και η ανάπτυξη διαφόρων τύπων ανιχνευτών κατέστησαν την τεχνική αυτή πολύ ισχυρό εργαλείο στα χέρια του αναλυτή. Η HPLC είναι μια σημαντικότερη μέθοδος διαχωρισμού με μεγάλη ευαισθησία, εύκολη προσαρμογή σε ακριβείς ποσοτικούς διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών και με ευρύτατες εφαρμογές στην ανάλυση αμινοξέων, πρωτεϊνών, νουκλειικών οξέων, υδρογονανθράκων, υδατανθράκων, φαρμακευτικών ουσιών, τερπενοειδών, φυτοφαρμάκων, αντιβιοτικών, στεροειδών, οργανομεταλλικών ενώσεων και ποικιλία ανόργανων ουσιών.

Στην HPLC διακρίνουμε δυο φάσεις α) Τη στατική φάση, που αποτελείται είτε από στερεό πορώδες υλικό με ενεργή επιφάνεια και μικροσωματιδιακή μορφή, ή από ένα λεπτό υμένιο υγρού καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα πολύ μικρής διαμέτρου, που βρίσκεται μέσα στη στήλη, β) την κινητή φάση που είναι ένας διαλύτης, ή μίγμα διαλυτών. Κάθε συστατικό μετακινείται μέσα στη στήλη με διαφορετική ταχύτητα και αυτό αποτελεί τη βάση κάθε χρωματογραφικού διαχωρισμού. Η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης μέσα από τη στατική, πραγματοποιείται με τη βοήθεια αντλιών υψηλής πίεσης και έτσι επιτυγχάνονται δύσκολοι διαχωρισμοί μέσα σε λίγα λεπτά. Ανάλογα με την πολικότητα της στατικής φάσης η υγρή χρωματογραφία διακρίνεται σε χρωματογραφία κανονικής φάσης (normal phase) ή σε αντίστροφης φάσης (reverse phase). Στη χρωματογραφία κανονικής φάσης η στατική φάση επιλέγεται σχετικώς πολική και η κινητή φάση σχετικώς μη πολική. Στο είδος αυτού του διαχωρισμού οι πολικές ενώσεις οι οποίες είναι υδρόφιλες εκλούνται αργότερα από τις μη πολικές που θεωρούνται λιπόφιλες. Αντίθετα στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης η στατική φάση είναι σχετικώς μη πολική και η κινητή φάση σχετικώς πολική (Snyder *et al.*, 1997).

Αναλυτικότερα, στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης η στατική φάση αποτελείται από ένα αλκάνιο με 18 άτομα άνθρακα $R = C_{18}H_{37}$ -προσδεδεμένο χημικά στην επιφάνεια του διοξειδίου του πυριτίου ή ODS (octadecylsilane). Οι αντίστοιχες στήλες ονομάζονται C_{18} και χρησιμοποιούνται ευρύτατα στις περισσότερες εφαρμογές της υγρής χρωματογραφίας, ενώ πολύ συχνά πλέον χρησιμοποιούνται σήμερα και οι στήλες C_8 όπου σε αυτές η ομάδα του αλκυλίου περιλαμβάνει 8 άτομα άνθρακα. Η κινητή φάση περιλαμβάνει υδατικά συστήματα ή υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα με υδατοδιαλυτούς οργανικούς διαλύτες όπως μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, ισοπροπανόλη, τεραυδροφουράνιο, διμεθυλοφορμαμίδιο κ.α. Στη χρωματογραφία

αντίστροφης φάσης οι λιγότερο πολικοί αναλύτες συγκρατώνται περισσότερο στη μη πολική στατική φάση και εκλούνται αργότερα σε σχέση με τις πιο πολικές ουσίες. Ο χρόνος συγκράτησης (RT) ενός αναλύτη μειώνεται κατά την ακόλουθη σειρά: αλειφατικές ενώσεις > επαγόμενα δίπολα (π.χ. CCl_4)> μόνιμα δίπολα (π.χ. CHCl_3)> ασθενείς βάσεις κατά Lewis (αιθέρες, αλδεΐδες, κετόνες)> ισχυρές βάσεις κατά Lewis (αμίνες)> ασθενή οξέα κατά Lewis (αλκοόλες, φαινόλες)> ισχυρά οξέα κατά Lewis (καρβοξυλικά οξέα) (Meyer, 1994).

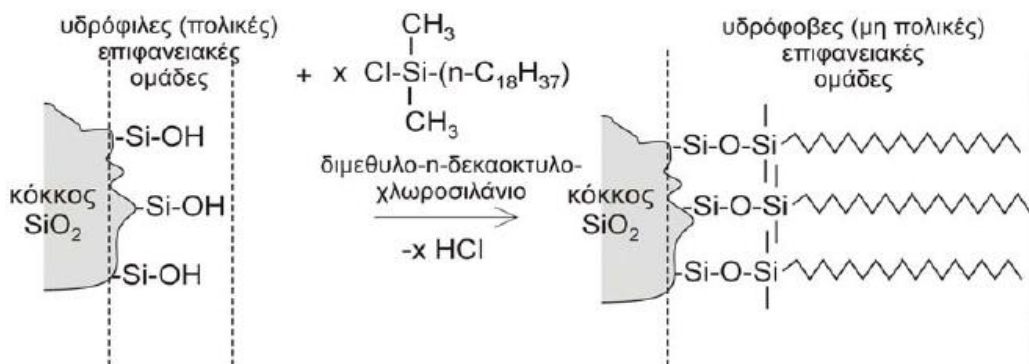
1.4.4. Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPE)

1.4.4.1. Αρχή μεθόδου- Εφαρμογές.

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction, SPE), αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική προετοιμασίας ενός δείγματος προς μέτρηση. Η SPE αντικαθιστά την υγρό-υγρό εκχύλιση και χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις που θέλουμε να προσυγκεντρώσουμε έναν αναλύτη από μεγάλους όγκους δειγμάτων και να καθαρίσουμε ένα δείγμα από ουσίες που παρεμποδίζουν την ανάλυσή του. Τέλος, η SPE χρησιμοποιείται ευρύτατα εκτός εργαστηρίου όταν πραγματοποιείται αυτοματοποιημένη/ προγραμματισμένη δειγματοληψία (π.χ αέρα, φυσικών υδάτων) σε τακτά χρονικά διαστήματα (Ευσταθίου, 2006). Η εκχύλιση στερεάς φάσης χωρίζεται στην SPE 'αντίστροφης φάσης', στην SPE 'κανονικής φάσης' και στην SPE με 'ιονανταλλαγή'. Από τις τρεις αυτές εφαρμογές στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της εκχύλισης αντίστροφης φάσης.

1.4.4.2. SPE 'αντίστροφης φάσης'

Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με κατανομή του αναλύτη μεταξύ ενός πολικού ή μετρίως πολικού διαλύτη που συνήθως είναι το νερό και μιας μη πολικής στατικής φάσης. Η κυριότερη στατική φάση που χρησιμοποιείται στην εκχύλιση στερεάς φάσης είναι η πυριτία silica (SiO_2), στην επιφάνεια της οποίας προσδένεται ομοιοπολικά άλκυλο- ή άρυλο- ομάδα, σύμφωνα με την αντίδραση σιλανοποίησης που περιγράφεται στο σχήμα που ακολουθεί.



Σχήμα 1.1. Τυπική αντίδραση σιλανοποίησης κατά την οποία οι πολικές επιφανειακές ομάδες $-\text{SiOH}$ αντικαθίστανται από υδρόφοβα αλκύλια, όπως το δεκαοκτύλιο.

Για την έκλυση ενός αναλύτη από έναν σωλήνα SPE, αντίστροφης φάσης χρησιμοποιείται ένας μη πολικός διαλύτης και ο μηχανισμός που αναπτύσσεται είναι ανταγωνισμός των μορίων του διαλύτη με τα μόρια της προσροφημένης ουσίας για μια θέση στο υπόστρωμα. Τα συνηθέστερα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στην εκχύλιση στερεάς φάσης είναι τα υποστρώματα πυριτίας C-8 και C-18.

1.4.5. Φασματομετρία Μαζών (MS)

1.4.5.1. Αρχή της τεχνικής.

Η φασματομετρία μαζών είναι μια μοναδική τεχνική ανάμεσα στις υπόλοιπες φασματομετρικές μεθόδους ανάλυσης των μορίων, αφενός μεν λόγω της αρχής μεθόδου στην οποία στηρίζεται, αφετέρου δε λόγω της χρησιμοποιούμενης οργανολογίας κατά την εφαρμογή της τεχνικής. Οι κυριότερες φασματοσκοπικές τεχνικές ανάλυσης είναι η φασματοσκοπία UV/VIS, IR, Raman και η τεχνική NMR. Όλες αυτές βασίζονται στην ίδια θεμελιώδη αρχή: τα υπάρχοντα μόρια βρίσκονται αρχικά στη θεμελιώδη ενεργειακή στάθμη και όταν προσπέσει επάνω τους ποσότητα ενέργειας συγκεκριμένης συχνότητας, τα μόρια την απορροφούν και μεταβαίνουν σε υψηλότερες ενεργειακές στάθμες. Σε κάθε περίπτωση, τα μόρια επανέρχονται τελικά στη θεμελιώδη τους κατάσταση και η όλη διαδικασία μπορεί να επαναληφθεί (Fearson *et al.*, 1987 και Van Bramer *et al.*, 1998).

Στη φασματομετρία μαζών, τα μόρια ιονίζονται με διάφορες τεχνικές και τα σχηματιζόμενα ιόντα είναι αυτά που τελικά εξετάζονται. Το φασματόμετρο μαζών διαχωρίζει τα ταχέως κινούμενα ιόντα με βάση το λόγο μάζας / φορτίου, m/z , όπως ακριβώς θα έκανε ο μονοχρωμάτορας στα οπτικά φασματόμετρα. Τα περισσότερα

ιόντα που εξετάζονται έχουν φορτίο +1, επομένως ο διαχωρισμός τους γίνεται ουσιαστικά με βάση τη μάζα τους.

Σε σχέση με τις τεχνικές ατομικής οπτικής φασματομετρίας, η φασματομετρία μαζών προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα, όπως όρια ανίχνευσης τουλάχιστον τρεις τάξεις μεγέθους χαμηλότερα από τις υπόλοιπες οπτικές μεθόδους, απλότητα φασμάτων και ευκολία στην ερμηνεία τους ακόμη και δυνατότητα μέτρησης ατομικών ισοτόπων, αυξημένη ευαισθησία και υψηλή εξειδίκευση κατά την ταυτοποίηση ουσιών καθώς και την επιβεβαίωση της παρουσίας υπόπτων ουσιών σε ένα δείγμα (Skoog *et al.*, 1998).

1.4.5.2. Διασύνδεση Συστημάτων Υγρής Χρωματογραφίας με Φασματόμετρο Μαζών

Η προσπάθεια συνδυασμού LC με MS ξεκίνησε το 1970. Οι επιδιώξεις της σύνδεσης ήταν η ανάλυση θερμοευαίσθητων ουσιών που δεν μπορούσαν να αναλυθούν με GC-MS, η ανάλυση μη πτητικών ουσιών, η αυξημένη ευαισθησία του ανιχνευτή MS, η αξιολόγηση της καθαρότητας της χρωματογραφικής κορυφής και η ταυτοποίηση των αναλυόμενων ουσιών. Ο εν σειρά συνδυασμός της υγρής χρωματογραφίας (LC) με τη φασματομετρία μαζών (MS) εξελίσσεται συνεχώς με αποτέλεσμα η τεχνική αυτή να εφαρμόζεται πλέον σε πολλές αναλύσεις ρουτίνας καθώς και σε πιο σύνθετες αναλύσεις ανίχνευσης και ταυτοποίησης ουσιών. Το φασματόμετρο μαζών δρα ως ανιχνευτής εξαιρετικής εκλεκτικότητας για το χρωματογραφικό σύστημα. Ο θερμοψεκασμός (Thermo Spray, TS), έχει πλέον αντικατασταθεί από το χημικό ιονισμό (Chemical Ionization, CI) και τον ηλεκτροψεκασμό (Electron Spray, ES) προάγοντας την ανάπτυξη της τεχνικής της διαδοχικής φασματομετρίας μαζών (Tandem mass spectrometry, MS-MS), η οποία αποτελεί σήμερα την κυριότερη μέθοδο βιοανάλυσης των μορίων που απαντώνται σε βιολογικά δείγματα (Niessen, 1998). Οι εφαρμογές της υγρής χρωματογραφίας (LC) με τη φασματομετρία μαζών (MS) είναι ευρύτατες. Περιβαλλοντικές αναλύσεις, εγκληματολογικές αναλύσεις, ο έλεγχος φαρμακοδιέγερσης, ο προσδιορισμός της δομής μεγαλομορίων, θερμοευαίσθητων μη πτητικών ενώσεων, ταυτοποίηση δομής αγνώστων ενώσεων (π.χ. μεταβολιτών φαρμάκων, πεπτιδίων, πρωτεϊνών κ.α.). Ιδιαίτερα σημαντικές είναι οι εξελίξεις στην ανίχνευση και επιβεβαίωση των αντιβιοτικών και αντιμικροβιακών ενώσεων και ξеноβιοτικών ουσιών κυρίως στον τομέα της ανάλυσης των τροφίμων (Corcia *et al.*, 2002; Lee, 2003; Douglas, 1999),

στον τομέα της έρευνας φυσικών προϊόντων, σε τομείς της οικολογίας καθώς και στην ανίχνευση και ταυτοποίηση μεταβολικών προϊόντων που παράγονται από βακτηριακά στελέχη (Warwick και Ellis, 2005; Strege, 1999; Barofsky, 1999).

Προκειμένου να επιτευχθεί ο ιονισμός με την τεχνική LC-MS, χρησιμοποιούνται δυο τύποι πηγών. Οι πηγές αέριας φάσης, όπου τα δείγματα πρώτα εξαερώνονται και μετά ιονίζονται (πηγές πρόσκρουσης ηλεκτρονίων, Electron Impact, πηγές χημικού ιοντισμού, Chemical Ionization) και οι πηγές εκρόφησης, όπου το δείγμα σε υγρή ή στερεή κατάσταση μετατρέπεται σε αεριώδη ιόντα (Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό ESI, βομβαρδισμός με άτομα μεγάλης ταχύτητας FAB, ιονισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας, MALDI) (Watson *et al.*, 2007).

Ακολουθώς περιγράφονται δυο τύποι ιονισμού που χρησιμοποιούνται στην παρούσα διατριβή. Ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI) και ο χημικός ιονισμός σε ατμοσφαιρική πίεση APCI.

- Ιονισμός με ηλεκτροδιάχυση (ESI)

Το Electron Spray Ionization είναι η τεχνική που μετατρέπει τα μόρια ή τα ιόντα που βρίσκονται σε διάλυμα, σε ιόντα στην αέρια φάση, με εξάτμιση των φορτισμένων σταγονιδίων του διαλύματος. Τα φορτισμένα σταγονίδια παράγονται από μια τριχοειδή ακίδα κάτω από την επίδραση ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου. Με τη βοήθεια ενός αερίου εκνέφωσης το οποίο είναι συνήθως το N₂ επιτυγχάνεται η δημιουργία νέφους σταγονιδίων (spray). Ανάλογα με την πολικότητα του δυναμικού που εφαρμόζεται στο τριχοειδές, η επιφάνεια των σταγόνων που σχηματίζονται στο άκρο του τριχοειδούς και περιέχουν την ιονιζόμενη ένωση φορτίζεται είτε θετικά είτε αρνητικά. Στη συνέχεια τα σταγονίδια εξατμίζονται. Η εξάτμιση των σταγονιδίων απαιτεί θέρμανση και ένα αέριο ξήρανσης το οποίο είναι επίσης το N₂. Καθώς το μέγεθος των σταγόνων μειώνεται, αυξάνεται η πυκνότητα των φορτίων στην επιφάνεια της σταγόνας. Τελικά οι απωστικές δυνάμεις των φορτίων υπερνικούν τις δυνάμεις συνοχής (όριο Rayleigh) και προκαλούν την έκρηξη της σταγόνας (Κουλομπική έκρηξη-Coulombic explosion). Αυτή η διαδικασία απελευθερώνει στην αέρια φάση τα ιόντα της ιονιζόμενης ένωσης τα οποία εισέρχονται μέσα από ένα τριχοειδές στόμιο (CDL) στον αναλυτή μαζών (Gaskell, 1997) .

- Χημικός ιονισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (APCI)

Ο χημικός ιονισμός βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα μόρια του αναλύτη και ενός αντιδραστήριου αερίου, όταν και τα δυο βρίσκονται σε αέρια φάση. Το αντιδραστήριο αέριο είναι το μεθάνιο, η αμμωνία και το ισοβουτάνιο ή η κινητή φάση της υγρής χρωματογραφίας στο χημικό ιονισμό με μεσολάβηση διαλύτη (Solvent mediated Chemical Ionization). Το αντιδραστήριο αέριο βομβαρδίζεται με ηλεκτρόνια με αποτέλεσμα να σχηματιστούν ιόντα του αερίου. Τα ιόντα αυτά δρουν ως δότες πρωτονίων, αντιδρούν με τα μόρια του αναλύτη M και σχηματίζουν μοριακά ιόντα MH^+ . Ο χημικός ιονισμός κατατάσσεται στις ήπιες τεχνικές ιονισμού με μεγάλη ευαισθησία η οποία συνήθως δίνει το μοριακό ιόν του αναλύτη. Όταν ο χημικός ιονισμός λαμβάνει χώρα σε ατμοσφαιρική πίεση η τεχνική ονομάζεται APCI (Atmospheric pressure chemical ionization). Η νεφελοποίηση και τελικά η εξαέρωση του δείγματος επιτυγχάνεται με το συνδυασμό αερίου αζώτου (nebulizer gas) και θέρμανσης. Στο άκρο του APCI probe, μεταλλική ακίδα με δυναμικό 2.5-3.0 KV, προκαλεί τον ιονισμό των μορίων. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η δημιουργία πρωτονιομένων μορίων (Van Bramer *et al.*, 1998).

1.4.6. Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FT-IR)

1.4.6.1. Ορισμός – Έννοιες-Εφαρμογές

Τα φάσματα υπέρυθρου οφείλονται σε διεγέρσεις δόνησης, παραμόρφωσης και περιστροφής των δομικών μονάδων της ύλης, οι οποίες λαμβάνουν χώρα όταν υπέρυθρη ακτινοβολία κατάλληλης συχνότητας προσπέσει σε μια ένωση. Απαραίτητη προϋπόθεση για να συμβεί εκπομπή ακτινοβολίας σε ένα μόριο είναι η μεταβολή της διπολικής του ροπής λόγω της διέγερσης δόνησης του δεσμού. Στα ετεροπυρηνικά διατομικά μόρια οι μη συμμετρικές δονήσεις μεταβάλλουν την διπολική ροπή του μορίου. Οι δονήσεις στα ομοπυρηνικά μόρια (π.χ. O_2 , N_2) ή οι συμμετρικές δονήσεις στα ετεροπυρηνικά μόρια δε μεταβάλλουν τη διπολική ροπή, με αποτέλεσμα να μην απορροφάται υπέρυθρη ακτινοβολία και οι δονήσεις να είναι ανενεργές στο υπέρυθρο. Η υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος βρίσκεται μεταξύ του ορατού τμήματος και της περιοχής των μικροκυμάτων (0,75-1000 μm) και χωρίζεται σε τρεις βασικές περιοχές: την εγγύς υπέρυθρη (Near IR, 0,75 - 2,5 μm ή 13.300-4.000 cm^{-1}),

τη μέσο υπέρυθρη (Mid IR, 2,5 - 50 μm ή 4.000-400 cm^{-1}) και την άπω υπέρυθρη (Far IR, 50 - 1000 μm ή 4.00-10 cm^{-1}). Στη φασματοσκοπία υπερύθρου, αντί του μήκους κύματος ή της συχνότητας, χρησιμοποιείται η έννοια του κυματαριθμού ($\bar{\nu}$). Ο κυματαριθμός είναι ευθέως ανάλογος με τη συχνότητα, καθώς και με την ενέργεια της υπέρυθρης ακτινοβολίας. Η μαθηματική σχέση που συνδέει τον κυματαριθμό με το μήκος κύματος είναι η ακόλουθη:

$$\bar{\nu} (\text{cm}^{-1}) = 1/\lambda (\mu\text{m}) * 10^{-4}$$

Ανάλογα με τα άτομα και τις ομάδες των οποίων οι δονήσεις προκαλούν απορρόφηση τα φάσματα υπερύθρου χωρίζονται στις ακόλουθες περιοχές.

- Περιοχή τάσης υδρογόνου (4000-2500 cm^{-1}). Η απορρόφηση σε αυτήν την περιοχή προκαλείται από δονήσεις τάσης των δεσμών C-H, O-H, N-H, και S-H
- Περιοχή τάσης τριπλού δεσμού (2500-2000 cm^{-1}). Στην περιοχή αυτή απορροφούν οι τριπλοί δεσμοί C \equiv C και C \equiv N καθώς και οι δυο διπλοί δεσμοί C=C=C και N=C=O. Επιπλέον στην περιοχή αυτή εμφανίζεται και μια διπλή κορυφή η οποία αντιστοιχεί στο ατμοσφαιρικό CO₂.
- Περιοχή τάσης και κάμψης του απλού δεσμού (1500-700 cm^{-1}), η οποία θεωρείται η περιοχή των δακτυλικών αποτυπωμάτων στην οποία οι απορροφήσεις σχετίζονται με τις δονήσεις ολοκλήρου του μορίου (Παππάς, 2000).

Στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος, η οποία συνήθως χρησιμοποιείται στο IR, η ευαισθησία του φασματοφωτομέτρου είναι περιορισμένη και οι εντάσεις των απορροφήσεων πολύ μικρές. Αποτέλεσμα αυτού, είναι ο 'θόρυβος' (δηλαδή τα σήματα τα οποία έχουν καταγραφεί αλλά δεν ανταποκρίνονται σε πραγματικές απορροφήσεις του δείγματος) να σκεπάζει τα φάσματα απορρόφησης. Η αδυναμία αυτή των κοινών φασματοφωτομέτρων αντιμετωπίστηκε με την φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (Fourier Transform Infra Red spectroscopy, FT-IR).

Με τα φάσματα υπερύθρου μπορεί να πιστοποιηθεί η παρουσία διαφόρων χαρακτηριστικών ομάδων σε μια ένωση ή να αποκλειστεί η παρουσία συγκεκριμένης ομάδας με την απουσία συγκεκριμένων απορροφήσεων, ή ακόμη να ταυτοποιηθεί μια

άγνωστη ένωση με μεγάλη βεβαιότητα, συγκρίνοντας το φάσμα της με φάσματα γνωστών ενώσεων (Αλεξάνδρου-Βάρβογλη, 1986). Για το λόγο αυτό, η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται πολύ συχνά στην οργανική και φαρμακευτική χημεία, τη φαρμακογνωσία και την ανάλυση φυσικών προϊόντων, φαρμάκων, τροφίμων και πετρελαιοειδών κ.α. Επιπλέον, το μέγεθος των κορυφών στα φάσματα υπέρυθρου μπορούν να δώσουν στοιχεία σχετικά με την ποσότητα ενός αναλύτη. Στα σύγχρονα λογισμικά, η υπέρυθρη φασματοσκοπία αποτελεί άριστο εργαλείο για ποσοτική ανάλυση.

1.4.7. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

1.4.7.1. Αρχή τεχνικής

Ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR) είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει όταν οι πυρήνες ορισμένων ατόμων τοποθετούνται εντός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Όπως τα ηλεκτρόνια, έτσι και οι πυρήνες συγκεκριμένων ατόμων θεωρούνται ότι αυτοστρέφονται (σπιν), δημιουργώντας μαγνητική ροπή κατά μήκος του άξονα της αυτοστροφορμής, με αποτέλεσμα να ενεργούν ως μικροσκοπικοί ράβδοι μαγνητών (δίπολο). Ένας τέτοιος πυρήνας, για τον οποίο ενδιαφερόμαστε κυρίως, είναι το πρωτόνιο, ο πυρήνας του κοινού υδρογόνου, ^1H . Εντός μαγνητικού πεδίου έντασης B , ένα σωματίδιο με σπιν (spin) μπορεί να απορροφήσει φωτόνιο σε συγκεκριμένη συχνότητα ν . Η συχνότητα εξαρτάται από το γυρομαγνητικό λόγο, γ του σωματιδίου όπου

$$\nu = \gamma B$$

Με την απορρόφηση του φωτονίου το σωματίδιο (πρωτόνιο) μπορεί να μεταβεί από στάθμη χαμηλότερης ενέργειας σε άλλη υψηλότερης ενέργειας. Η ενέργεια του φωτονίου πρέπει να ταιριάζει ακριβώς στην ενεργειακή διαφορά μεταξύ των δυο καταστάσεων. Η ενέργεια ενός φωτονίου E , σχετίζεται με τη συχνότητα ν και τη σταθερά του Planck ($h = 6.626 \times 10^{-34} \text{ J s}$). Όταν, λοιπόν, μια ουσία τοποθετηθεί εντός μαγνητικού πεδίου σταθερής συχνότητας ακτινοβολίας και μεταβαλλόμενης έντασης μαγνητικού πεδίου σε κάποια τιμή έντασης του πεδίου η ενέργεια που

απαιτείται για την μεταπήδηση του πρωτονίου ισοδυναμεί με την ενέργεια της ακτινοβολίας· τότε, λαμβάνει χώρα απορρόφηση και παρατηρείται σήμα. Ένα τέτοιο φάσμα αποκαλείται φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Δεδομένου ότι ο πυρήνας που αναφερόμαστε είναι το πρωτόνιο, το φάσμα αποκαλείται συνήθως PMR (πρωτονιακός μαγνητικός συντονισμός), για να διαφοροποιηθεί από το φάσμα που περιλαμβάνει πυρήνες όπως ^{13}C (αποκαλείται CMR) ή ^{19}F .

1.4.7.2. Χαρακτηριστικά φάσματος NMR

- Χημική μετατόπιση

Η συχνότητα στην οποία απορρόφησε το πρωτόνιο εξαρτάται από το μαγνητικό πεδίο το οποίο «αντιλαμβάνεται» και αυτή η ένταση του πεδίου δεν είναι ίδια με την εφαρμοζόμενη ένταση πεδίου. Η πραγματική ένταση σε κάθε πρωτόνιο εξαρτάται από το περιβάλλον του πρωτονίου, δηλαδή μεταξύ άλλων παραμέτρων από την ηλεκτρονική πυκνότητα επί του πρωτονίου καθώς και από την παρουσία άλλων γειτονικών πρωτονίων. Κάθε πρωτόνιο ή ακριβέστερα κάθε σύνολο ισοδύναμων πρωτονίων θα είχε ένα ελαφρώς διαφορετικό περιβάλλον από κάθε άλλο σύνολο πρωτονίων και θα απαιτούσε μια ελαφρώς διαφορετική εφαρμοζόμενη ένταση πεδίου για να παραχθεί η ίδια πραγματική ένταση πεδίου: τη μερική ένταση στην οποία λαμβάνει χώρα η απορρόφηση.

Όλοι οι ενεργοί πυρήνες ενός δείγματος δεν συντονίζονται στην ίδια συχνότητα. Η ένταση του μαγνητικού πεδίου φτάνει διαφοροποιημένη σε κάθε πυρήνα. Τα ηλεκτρόνια σθένους κάποιων ατόμων περιστρέφονται με τη φορά του εφαρμοζόμενου πεδίου. Στους πυρήνες των ατόμων που διευθετούνται αντίθετα στο εφαρμοζόμενο πεδίο η περιστροφή τους προκαλεί ένα μικρότερης έντασης μαγνητικό πεδίο. Το μαγνητικό πεδίο που αισθάνεται ο κάθε πυρήνας (the effective field) είναι τελικώς μικρότερο από το εφαρμοζόμενο πεδίο. Η ένταση του μικρότερου πεδίου είναι $B_1 = \sigma B_0$ (σ : σταθερά θωράκισης / προάσπισης) και η ένταση που δέχεται τελικά ένας ενεργός πυρήνας είναι $B = B_0 - B_1$. Η συχνότητα στην οποία συντονίζεται κάθε πυρήνας και μετράται αναφορικά με τη συχνότητα συντονισμού μιας ένωσης προτύπου, ονομάζεται χημική μετατόπιση και εκφράζεται σε μονάδες δ ppm (parts per million) σε σχέση με την κορυφή απορρόφησης των πρωτονίων του TMS ($\delta=0$).

Χημική μετατόπιση:

$$\delta = \nu_i / \nu_o \quad (\nu_i : \text{συχνότητα συντονισμού του πυρήνα, } \nu_o : \text{συχνότητα του οργάνου}).$$

Το σημείο αναφοράς από το οποίο οι χημικές μετατοπίσεις μετρούνται είναι, για πραγματικούς λόγους όχι το σήμα του γυμνού πρωτονίου, αλλά το σήμα μιας πραγματικής ένωσης, συνήθως το τετραμέθυλοσιλάνιο $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$. Εξ αιτίας της χαμηλής ηλεκτραρνητικότητας του πυριτίου, η προστασία των πρωτονίων στο σιλάνιο είναι μεγαλύτερη από ότι στα άλλα οργανικά μόρια με αποτέλεσμα τα περισσότερα σήματα NMR να εμφανίζονται προς την αντίθετη κατεύθυνση από το σήμα του τριμεθυλοσιλάνιου. Έτσι, για το τριμεθυλοσιλάνιο η θέση του λαμβάνεται ως 0.0 ppm. Οι περισσότερες χημικές μετατοπίσεις έχουν τιμές δ ανάμεσα στο 0 και το 10.

- Σύζευξη spin-spin

Σε πολλά $^1\text{H-NMR}$ φάσματα οι κορυφές συντονισμού διαχωρίζονται σε συμμετρικές πολλαπλές ομάδες κορυφών, λόγω της αλληλεπίδρασης του spin γειτονικών πρωτονίων. Η πολλαπλότητα αυτή των σημάτων συντονισμού (λεπτή υφή) καλείται spin-spin σύζευξη (coupling) και οφείλεται στην αλληλεπίδραση των spin γειτονικών μαγνητικών πυρήνων, η οποία διαδίδεται όχι μέσω του χώρου, αλλά μέσω των δεσμών του μορίου. Η σύζευξη μεταξύ δύο πυρήνων (ή δυο ομάδων ισότιμων πυρήνων) χαρακτηρίζεται από τη σταθερά σύζευξης J_{AX} , που είναι η απόσταση σε Hz, των επί μέρους κορυφών των σύνθετων (πολλαπλών) κορυφών των δυο ομάδων. Η σταθερά σύζευξης εξαρτάται μόνο από την ηλεκτρονική και στερεοσκοπική σχέση μεταξύ των αλληλεπιδρώντων πρωτονίων και, ως εκ τούτου, είναι η ίδια στις δυο ομάδες. Σε αντίθεση με τη σταθερά θωράκισης σ , η σταθερά σύζευξης είναι ανεξάρτητη από την ένταση του μαγνητικού πεδίου, γι' αυτό και δε δίνεται σε ppm, αλλά πάντοτε σε Hz. Κατά συνέπεια παίρνοντας το φάσμα NMR μιας ένωσης σε δυο συχνότητες μπορούμε να διακρίνουμε τις πολλαπλές κορυφές σε πρωτόνια με διαφορετική χημική μετατόπιση από εκείνες που οφείλονται σε spin-spin σύζευξη (Χατζηιωάννου και Κουμπάρης, 1997).

1.4.7.3. Εφαρμογές φασματοσκοπίας NMR

Από όλα τα είδη των φασμάτων, τις περισσότερες πληροφορίες για τη δομή των ενώσεων δίνουν τα φάσματα NMR, σε συσχέτισμό βέβαια με άλλα δεδομένα, που λαμβάνονται με άλλες τεχνικές, όπως φασματομετρία υπεριώδους ή φασματομετρία μαζών. Ο συνδυασμός της χημικής μετατόπισης και της γενικής εικόνας της spin spin σύζευξης παρέχει πληροφορίες για τον προσδιορισμό α) του αριθμού των μετρούμενων πρωτονίων (ή και άλλων ατόμων), β) του χημικού περιβάλλοντος κάθε πρωτονίου γ) των συντακτικών και στερεοχημικών ισομερών και σε μερικές περιπτώσεις και διαμορφομερών και δ) την ύπαρξη προσμίξεων. Ο συνδυασμός των παραπάνω πληροφοριών μπορεί συχνά να μας οδηγήσει στη δομή μιας άγνωστης ένωσης. Η ολοκλήρωση των εμβαδών των κορυφών είναι χρήσιμη στη διερεύνηση της δομής, αφού ο λόγος των εμβαδών παρέχει το σχετικό λόγο των διαφόρων ειδών πρωτονίων. Επιπλέον η ολοκλήρωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ποσοτική ανάλυση. Σημαντικές πληροφορίες για τη δομή παρέχει η σταθερά σύζευξης J, το μέγεθος της οποίας διαφέρει για τα διάφορα ισομερή, ορθο-μετα και παρα, cis-trans κτλ. (Χατζηιωάννου και Κουμπάρης, 1997).

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού έχει ευρύτατες εφαρμογές στη διερεύνηση της δομής των χημικών ενώσεων, στη χημεία των φυσικών προϊόντων και στη συνθετική οργανική χημεία. Στον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών, του DNA/RNA, των συμπλόκων πρωτεΐνης DNA, πρωτεΐνης RNA και των πολυσακχαριτών. Στη μελέτη της σχέσης δομής και δραστηριότητας κατά το σχεδιασμό των φαρμάκων, στη μελέτη της σύστασης και τη δομής, της συμβατότητας και της δυναμικής στα πολυμερή, συμπολυμερή και στα πολυμερικά μίγματα. Ευρύτατες επίσης είναι οι εφαρμογές στην Ιατρική και στη βιολογία των ζωντανών οργανισμών, στην εγκληματολογία, στον έλεγχο φαρμακοδιέγερσης κ.α. (Μαυρομούστακος, 2006).

1.4.8. Οι αναλυτικές τεχνικές στο χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση προϊόντων δευτερογενούς μεταβολισμού

Σε ότι αφορά το διαχωρισμό, την ποσοτικοποίηση και την ταυτοποίηση αντιμικροβιακών μεταβολιτών που παράγονται από βακτηριακά στελέχη, η εφαρμογή των τεχνικών της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) σε συνδυασμό

με τη φασματομετρία μαζών, τη φασματοσκοπία υπερύθρου με ανάλυση κατά Fourier (FT-IR) και φυσικά τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) παρέχουν ακριβή και αδιαμφισβήτητα αποτελέσματα. Οι μελέτες που σχετίζονται με ανίχνευση και ταυτοποίηση νέων μεταβολικών προϊόντων είναι πολλές και η πρακτική που ακολουθούν είναι κοινή. Ο διαχωρισμός, η απομόνωση, ο καθαρισμός και η ποσοτικοποίηση των αναλυτών επιτυγχάνεται με εφαρμογή χρωματογραφικών τεχνικών. Τις απαιτούμενες πληροφορίες για τη δομή των χημικών ενώσεων δίνουν τα φάσματα NMR, σε συσχετισμό φυσικά με τα δεδομένα που λαμβάνονται με τις άλλες τεχνικές, τη φασματομετρία υπεριώδους, μαζών και φασματοσκοπία υπερύθρου (Ραγκούση, 1996).

Σύμφωνα με τους (Reddy *et al.*, 2009) ο χαρακτηρισμός των αντιμικροβιακών μεταβολιτών που παράγονται από 20 στελέχη του *Pseudomonas fluorescens* επιτεύχθηκε με τη χρήση χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών τεχνικών. Η απομόνωση και ο καθαρισμός των δευτερογενών μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε με συνδυασμό της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) και χρωματογραφίας στήλης (Column Chromatography). Για τον χαρακτηρισμό των αντιμικροβιακών ουσιών τα δείγματα αρχικά αναλύθηκαν χρωματογραφικά και ταυτοποιήθηκαν με φασματομετρία μαζών (EI-MS), με φασμασκοπία υπερύθρου (IR) και με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR). Ανάλογη περίπτωση είναι και αυτή της απομόνωσης και ταυτοποίησης του νέου αντιμικροβιακού μεταβολίτη 2-ακεταμιδοφαινόλη, (2-acetamidophenol) από το υπερκείμενο της καλλιέργειας του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* 2-79 από τους Slininger *et al.*, (2000). Η ουσία απομονώθηκε από το εκχύλισμα της καλλιέργειας του βακτηρίου, με TLC και (υγρή) χρωματογραφία στήλης (Flash chromatography). Το ^1H και ^{13}C NMR σε συνδυασμού με τη φασματομετρία μάζας EI-MS, υπέδειξαν ότι η άγνωστη ουσία είναι η 2-ακεταμιδοφαινόλη. Σε άλλη εργασία, οι Yoon Kim *et al.*, (2004), διαπίστωσαν ότι το στέλεχος B65-1 του βακτηρίου *Bacillus licheniformis* που απαντάται σε κύαμο σόγιας εμφάνιζε αντιμικροβιακή δράση. Η αιτία αποδόθηκε στο αντιβιοτικό φαινυλοξικό οξύ, (phenylacetic acid) το οποίο μπορούσε να καταστήσει τις προσβολές παθογόνων βακτηρίων, ζυμών αλλά και των μυκήτων *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, και *Candida albicans*. Η αντιβιοτική ένωση απομονώθηκε από τα υπερκείμενα της καλλιέργειας του βακτηρίου *Bacillus licheniformis* στέλεχος B65-1 χρησιμοποιώντας χρωματογραφικές τεχνικές και στο καθαρό συστατικό αποδόθηκε ο μοριακός τύπος $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$ ύστερα από ανάλυση με EI-MS και NMR.

Με RP-HPLC, συνδυασμένη με ανιχνευτή UV και κινητή φάση ακετονιτρίλιο /νερό ή μεθανόλη/ νερό, έχουν διαχωριστεί οι περισσότεροι γνωστοί δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas fluorescens*, όπως για παράδειγμα η ουσία 2,4-διακετυλοφλορογλουκινόλη, ενώ για την ταυτοποίηση της χημικής της δομής εφαρμόστηκαν οι τεχνικές FT-IR, EI-MS, ¹H και ¹³C NMR (Raaijmakers, *et al.*, 1999; Ayyadurai *et al.*, 2006; Marchant *et al.*, 2000). Ο αντιμικροβιακός μεταβολίτης φαιναζίνη-1-καρβοξυλικό οξύ διαχωρίστηκε με RP-HPLC με κινητή φάση μεθανόλη και νερό και ανιχνευτή UV (210 nm) και ταυτοποιήθηκε με χρήση GC-MS, APCI-MS, ¹H NMR (Chen *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2007). Με αντίστοιχο τρόπο χαρακτηρίστηκαν και άλλες γνωστές φαιναζίνες όπως η 1-μεθοξυφαιναζίνη, η 1-υδροξυφαιναζίνη, η πυοκυανίνη (Dyer *et al.*, 2007). Η πυρρολνιτρίνη διαχωρίστηκε σε αναλυτική στήλη C18 και ταυτοποιήθηκε σε φασματόμετρο μαζών με τριπλό τετράπολο με την τεχνική ESI καθώς και με ¹H και ¹³C NMR (Banna *et al.*, 1998). Οι ίδιες τεχνικές εφαρμόζονται με επιτυχία και σε άλλες ομάδες οργανικών μορίων, γλυκολιπιδίων όπως τα ραμνολιπίδια, πεπτιδικών ενώσεων όπως τα λιποπεπτίδια, με χαρακτηριστικά και εδώ παραδείγματα όπως π.χ. η απομόνωση και ταυτοποίηση γνωστών επιφανειοδραστικών ραμνολιπιδίων με TLC και APCI-MS, FAB-MS, ¹H και ¹³C NMR (Schenk *et al.*, 1995; Gunther *et al.*, 2005).

1.5. Περιγραφή του έργου

1.5.1. Οι τήξεις των σπορίων και των φυταρίων.

Οι τήξεις και φυταρίων αποτελούν κοινό πρόβλημα σε φυτά μεγάλης καλλιέργειας και θερμοκηπίου. Στο ζαχαρότευτλο, οι μύκητες που σχετίζονται με τήξεις είναι οι *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Aphanomyces cohlloides* και *Phoma betae* (Εχθροί και ασθένειες ζαχαροτεύτλων, έκδοση EBZ). Για την αντιμετώπιση του προβλήματος των τήξεων η μόνη εμπορικά διαθέσιμη λύση είναι η χρήση μυκητοκτόνων όπως το thiram, metalaxyl, hymexazol, carbedazim, mancozeb, κτλ, τα οποία εφαρμόζονται είτε στο κάλυμμα σπόρων είτε με ριζοπότισμα. Δυστυχώς η χρήση χημικών σκευασμάτων αν και είναι αποτελεσματική μέθοδος καταπολέμησης των τήξεων πολλές φορές αποδεικνύεται ότι μπορεί να επιφέρει δυσμενείς επιδράσεις στον άνθρωπο και το περιβάλλον. Έτσι πολύ συχνά συμβαίνει

ένα σκεύασμα να αποσύρεται, όπως για παράδειγμα το βρωμιούχο μεθύλιο η χρήση του οποίου σταμάτησε το 2005, καθώς και άλλα μυκητοκτόνα, στα πλαίσια της προσπάθειας κυβερνήσεων και διεθνών οργανισμών να θεσπίσουν καλλιεργητικές πρακτικές με λιγότερες επιπτώσεις στο περιβάλλον και μικρότερη επιβάρυνση του καταναλωτή από υπολείμματα φυτοφαρμάκων.

Η καταπολέμηση τήξεων σπορίων και φυταρίων με ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς γίνεται σήμερα με επιτυχία σε λίγες μόνο περιπτώσεις. Αρκετά είδη μικροοργανισμών έχουν δοκιμασθεί ως βιολογικοί ανταγωνιστές τήξεων και άλλων προσβολών από εδαφογενείς παθογόνους μικροοργανισμούς (βακτήρια του γένους *Pseudomonas* και *Bacillus* και μύκητες των γενών *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Pythium* και άλλοι). Παρά την πληθώρα ερευνητικών εργασιών, πολλοί λίγοι οργανισμοί έχουν αναπτυχθεί σε εμπορικά σκεύασμα (Walsh *et al.*, 2001). Στις Η.Π.Α, λιγότερα από δέκα φυτοπροστατευτικά προϊόντα βασίζονται σε ανταγωνιστικά βακτήρια του γένους *Pseudomonas* και μόνο δύο από αυτά προορίζονται για προστασία από τήξεις (το Deny® που είναι σκεύασμα του *Burkholderia cepacia* και το Mycostop® που είναι σκεύασμα του *Streptomyces griseoviridis*)

Η αξιοσημείωτη, όμως πρόοδος που παρατηρείται τα τελευταία χρόνια στην έρευνα σχετικών φυτοπαθολογικών προβλημάτων σε συνδυασμό με την αυξανόμενη εφαρμογή των μεθόδων της μοριακής βιολογίας και της γενετικής μηχανικής στη φυτοπροστασία, επιτρέπουν κάποια αισιοδοξία για το μέλλον.

1.5.2. Το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* X

Το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* X απομονώθηκε από τη ριζόσφαιρα της φασολιάς με συμπτώματα τήξης από τον μύκητα *Rhizoctonia solani*. Η προστασία που παρέχει σε πειράματα θερμοκηπίου κατά των τήξεων αγγουριάς και ζαχαροτεύτλου που προκαλούνται από το μύκητα *Pythium ultimum* είναι ήδη τεκμηριωμένη (Georgakopoulos *et al.*, 2002 και αδημοσίευτα δεδομένα) και σχεδόν εφάμιλλη των αντίστοιχων μυκητοκτόνων που χρησιμοποιούνται κατά των τήξεων. Σπόροι ζαχαροτεύτλου και αγγουριού επενδύθηκαν με σκεύασμα του βακτηρίου σε τύρφη και φυτεύθηκαν σε φυτόχωμα μολυσμένο τεχνητά με τον εν λόγω μύκητα. Στα πειράματα αυτά αξιολογήθηκαν και άλλα βακτηριακά στελέχη, αλλά το στέλεχος X

επέδειξε στατιστικά τον καλλίτερο έλεγχο της ασθένειας (Georgakopoulos *et al.*, 2002).

Ο μηχανισμός δράσεως του X δεν έχει ακόμα διερευνηθεί γενετικά και βιοχημικά. Για τη διερεύνηση του τρόπου δράσης του στελέχους X γενετικά και βιοχημικά έχει κατασκευασθεί γενωμική βιβλιοθήκη του βακτηρίου. Επίσης έχουν παραχθεί έχουν παραχθεί έξι μεταλλαγμένα στελέχη του βακτηρίου, τα οποία έχασαν την ανταγωνιστική τους ιδιότητα *in vitro* και *in planta* (Κρεμμύδας, αδημοσίευτα δεδομένα). Κατά συνέπεια οι μεταλλάξεις προκλήθηκαν σε γονίδια που ελέγχουν την καταστολή του παθογόνου από το στέλεχος X, τα οποία είναι προς το παρόν άγνωστα.

1.6. Αντικείμενο και στόχοι του έργου

Η προτεινόμενη έρευνα στοχεύει στη διερεύνηση του τρόπου δράσης του στελέχους X βιοχημικά, με την απομόνωση και χαρακτηρισμό της/των παρεμποδιστικών ενώσεων με αναλυτικές χημικές μεθόδους, συγκρίνοντας τις εκκρίσεις σε υγρά θρεπτικά μέσα των μεταλλαγμένων στελεχών και του αγρίου τύπου του βακτηρίου. Οι προκληθείσες μεταλλάξεις των στελεχών αυτών αδρανοποίησαν την ικανότητα παρεμπόδισης του μύκητα *P. ultimum in vitro* και *in planta*. Κατά συνέπεια, αναζητήθηκαν ενώσεις που υπήρχαν στο υπερκείμενο καλλιέργειας του αγρίου τύπου και απουσίαζαν από το υπερκείμενο καλλιεργειών των μεταλλαγμένων στελεχών. Οι ενώσεις αυτές χαρακτηρίστηκαν με αναλυτικές χημικές μεθόδους.

1.7. Περίγραμμα διδακτορικής διατριβής

Η παρούσα διατριβή συνίσταται από ένα θεωρητικό και ένα πειραματικό μέρος. Το θεωρητικό μέρος, στο πρώτο κεφάλαιο πραγματεύεται θέματα σχετικά με τη βιολογική καταπολέμηση των ασθενειών των φυτών και τη χρήση παρασιτικών και ανταγωνιστικών μικροοργανισμών προς την κατεύθυνση αυτή. Δίνονται στοιχεία για τη δράση ορισμένων γενών βακτηρίων ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου έναντι ορισμένων φυτοπαθογόνων μυκήτων, καθώς και πληροφορίες σχετικά με τα διαθέσιμα εμπορικά σκευάσματα των βακτηρίων που χρησιμοποιούνται σήμερα για την καταστολή των ασθενειών στα φυτά. Περιγράφονται οι μηχανισμοί παρεμπόδισης που χρησιμοποιούν οι βιολογικοί παράγοντες προκειμένου να

ανταγωνιστούν τα παθογόνα, με ιδιαίτερη έμφαση στο μηχανισμό παραγωγής αντιβιοτικών ενώσεων. Το ενδιαφέρον εστιάζεται στα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, όπου γίνεται εκτενής αναφορά στους δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από τα βακτήρια αυτά. Ακολουθούν οι βασικές αρχές που διέπουν την εφαρμοζόμενη οργανολογία, καθώς και τα κριτήρια επιλογής των χρησιμοποιούμενων τεχνικών. Τέλος, γίνεται μια μικρή αναφορά στις τεχνικές που εφαρμόζονται σήμερα για τον χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση προϊόντων δευτερογενούς μεταβολισμού.

Στο δεύτερο κεφάλαιο περιγράφονται αναλυτικά η παρουσίαση των χρησιμοποιούμενων υλικών και των εφαρμοζόμενων μεθόδων που χρειάστηκαν για τη διεκπεραίωση όλων των πειραμάτων.

Στο τρίτο κεφάλαιο, περιγράφεται η πορεία εργασίας για την απομόνωση των παρεμποδιστικών ενώσεων που παράγονται από το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* X, η χρωματογραφική ανάλυση των ενώσεων αυτών και τα πειράματα βιοδοκιμής των αναλυτών αυτών στο φυτοπαθογόνο μύκητα *Pythium ultimum*. Επιπλέον, δίνονται αναλυτικά όλα τα στοιχεία για την ταυτοποίηση των ενώσεων που έχουν απομονωθεί και ακολουθεί συγκριτική ανάλυση των στοιχείων αυτών με μια σειρά από ήδη γνωστές και ταυτοποιημένες αντιμικροβιακές ενώσεις, προκειμένου να διαπιστώσουμε εάν οι αναλύτες μας αντιστοιχούν σε γνωστές ουσίες.

Στο τελευταίο κεφάλαιο γίνεται εκτενής συζήτηση και σχολιασμός όλων των αποτελεσμάτων.

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται όλες οι πειραματικές πορείες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, καθώς και τα αποτελέσματα στα οποία κατέληξαν.

Πίνακας 1.2 Περίγραμμα διδακτορικής διατριβής

Υλικό	Πορεία	Πείραμα	Αποτελέσματα
Καλλιέργεια <i>Ps. fluorescens</i> X σε υποστρώματα με διάφορες πηγές άνθρακα	Εκχύλιση σύμφωνα με την πορεία εργασίας I	<i>In vitro</i> μελέτη αντιμικροβιακής δράσης με βιοδοκιμή κάθε εκχυλίσματος στο μύκητα <i>P. ultimum</i>	Εκδήλωση αντιμικροβιακής δράσης του εκχυλίσματος του <i>Ps. fluorescens</i> X από την καλλιέργεια σε PDA. Απώλεια αντιμικροβιακής δράσης του εκχυλίσματος του <i>Ps. fluorescens</i> X μετά από καλλιέργεια σε όσα θρεπτικά μέσα δεν περιέχουν γλυκόζη.
Καλλιέργεια μεταλλαγμένων στελεχών σε υποστρώματα με διάφορες πηγές άνθρακα			Απώλεια αντιμικροβιακής δράσης όλων των εκχυλίσμάτων των μεταλλαγμένων στελεχών.
Καλλιέργεια <i>Ps. fluorescens</i> X σε PDA	Εκχύλιση με διαλύτες διαφορετικής πολικότητας και παραλαβή εκχυλίσμάτων από κάθε καλλιέργεια	<i>In vitro</i> μελέτη αντιμικροβιακής δράσης με βιοδοκιμή κάθε εκχυλίσματος στο μύκητα <i>P. ultimum</i>	Εκδήλωση αντιμικροβιακής δράσης ορισμένων μόνο εκχυλίσμάτων από την καλλιέργεια του <i>Ps. fluorescens</i> X σε PDA.
Καλλιέργεια μεταλλαγμένων στελεχών σε PDA			Απώλεια αντιμικροβιακής δράσης εκχυλίσμάτων μεταλλαγμένων στελεχών.
Καλλιέργεια <i>Ps. fluorescens</i> X και μεταλλαγμένων στελεχών σε PDA	Εκχύλιση σύμφωνα με την πορεία εργασίας I	Συγκριτική ανάλυση εκχυλίσμάτων άγριου τύπου και μεταλλαγμάτων από θρεπτικό υλικό PDA με RP-HPLC (πρόγραμμα 1).	Στο χρωματογράφημα του <i>Ps. fluorescens</i> X απεικονίζονταν χαρακτηριστικές κορυφές οι οποίες απουσίαζαν από όλα τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα των μεταλλαγμένων στελεχών.
Καλλιέργεια <i>Ps. fluorescens</i> X σε PDA και σε PA	Εκχύλιση σύμφωνα με την πορεία εργασίας I	Ανάλυση εκχυλίσμάτων άγριου τύπου με RP-HPLC (πρόγραμμα 1).	Στο χρωματογράφημα του <i>Ps. fluorescens</i> X στο PDA απεικονίζονταν χαρακτηριστικές κορυφές κ-1, κ-2, κ-3, κ-4, σε οι οποίες απουσίαζαν από το χρωματογράφημα του <i>Ps. fluorescens</i> X στο PA.
		<i>In vitro</i> μελέτη αντιμικροβιακής δράσης με βιοδοκιμή κάθε εκχυλίσματος στο μύκητα <i>P. ultimum</i>	Απώλεια αντιμικροβιακής δράσης του εκχυλίσματος του <i>Ps. fluorescens</i> X από την καλλιέργεια στο PA. Απώλεια αντιμικροβιακής δράσης εκχυλίσμάτων μεταλλαγμένων στελεχών.
Καλλιέργεια <i>Ps. fluorescens</i> X σε PDA	Εκχύλιση σύμφωνα με την πορεία εργασίας II	Ανάλυση εκχυλίσμάτων άγριου τύπου με RP-HPLC. (πρόγραμμα 1).	Το σύνθετο χρωματογράφημα του <i>Ps. fluorescens</i> X χωρίστηκε σε απλούστερα χρωματογραφήματα που επεξεργάζονται πιο εύκολα

Υλικό	Πορεία	Πείραμα	Αποτελέσματα
Καλλιέργεια <i>Ps. fluorescens</i> X σε PDA	Εκχύλιση σύμφωνα με την πορεία εργασίας II	Απομόνωση με RP-HPLC (πρόγραμμα 2).	Απομόνωση των κορυφών κ-1, κ-2, κ-3,κ-4.
		Απομόνωση με TLC	Απομόνωση ζώνης Qa
		<i>In vitro</i> μελέτη αντιμικροβιακής δράσης με βιοδοκιμή κορυφών <i>P. ultimum</i>	Εκδήλωση αντιμικροβιακής δράσης των κορυφών κ-1, κ-2, κ-3 και της ζώνης Qa
Απομόνωση των κορυφών κ-1, κ-2, κ-3,κ-4.	Χαρακτηρισμός δομής κορυφών κ-1, κ-2, κ-3	Τεχνικές HPLC-UV-Vis-MS	Προτεινόμενοι μοριακοί τύποι
Απομόνωση ζώνης Qa	Καθαρισμός με SPE Χαρακτηρισμός δομής της ζώνης Qa	FT-IR GC-MS NMR	Εκδήλωση αντιμικροβιακής δράσης
Καλλιέργεια <i>Ps. fluorescens</i> X <i>Ps. aureofaciens</i> PGS12 και <i>Ps. fluorescens</i> CHA0 σε PDA	Εκχύλιση σύμφωνα με την πορεία εργασίας I	Συγκριτική ανάλυση φασμάτων με την τεχνική HPLC-UV-Vis-MS	Καμία από τις γνωστές αντιμικροβιακές ενώσεις που παράγουν τα στελέχη <i>Ps.</i> <i>aureofaciens</i> PGS12 και <i>Ps. fluorescens</i> CHA0 δεν αντιστοιχεί σε κάποια από τις άγνωστες ενώσεις της παρούσας εργασίας.

Κεφάλαιο 2^ο Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Βιολογικό υλικό και θρεπτικά μέσα αύξησης.

2.1.1. Βιολογικό υλικό

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν οι εξής (πίνακας 2.1):

- Το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas fluorescens* X, από την συλλογή του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γ.Π.Α., το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas fluorescens* X1 και τα μεταλλάγματά του B91, B163, p26, k36, R48, W139. Τα μεταλλάγματα αυτά δεν παρεμποδίζουν τον μύκητα *Pythium ultimum* *in vitro* και *in planta* (Κρεμμύδας, αδημοσίευτα δεδομένα).
- Το στέλεχος *Pythium ultimum* 1308, της συλλογής του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γ.Π.Α.
- Το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas aureofaciens* PGS12, που προερχόταν επίσης από την συλλογή του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γ.Π.Α.
- Το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas fluorescens* CHA0, που παραχωρήθηκε από τον Dr. Christoph Keel, Πανεπιστήμιο Λωζάννης, Ελβετία.

Πίνακας 2.1.: Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Βακτηριακά Στελέχη	Περιγραφή-Κατασκευή	Αναφορά
<i>Ps. fluorescens</i>		
X	άγριος τύπος	Georgakopoulos et al.(2002)
X1	Rif ^R (spontaneous mutant)	Κρεμμύδας Γ., αδημοσίευτα δεδομένα
B91	X1::Tn5-RL27 Km ^F	Κρεμμύδας Γ., αδημοσίευτα δεδομένα
B163	X1::Tn5-RL27 Km ^F	Κρεμμύδας Γ., αδημοσίευτα δεδομένα

p26	X1::Tn5-RL27 Km ^r	Κρεμμύδας Γ., αδημοσίευτα δεδομένα
Βακτηριακά Στελέχη	Περιγραφή κατασκευής	Αναφορά
k36	X1::Tn5-RL27 Km ^r	Κρεμμύδας Γ., αδημοσίευτα δεδομένα
R48	X1::Tn5-RL27 Km ^r	Κρεμμύδας Γ., αδημοσίευτα δεδομένα
W139	X1::Tn5-RL27 Km ^r	Κρεμμύδας Γ., αδημοσίευτα δεδομένα
<i>P. aureofaciens</i> PGS 12		
<i>P. fluorescens</i> CHA0		

2.1.2. Θρεπτικά υλικά

Για την καλλιέργεια των βακτηρίων και του μύκητα *P. ultimum* χρησιμοποιήθηκε το πλήρες θρεπτικό υλικό PDA (Potato Dextrose Agar, Scharlab). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά υλικά Luria Bertani Agar (LA), Nutrient Agar (NA, Scharlab), Mannitol Agar (MA), και King's B (πίνακας 2.2).

Πίνακας 2.2: Σύσταση θρεπτικών υλικών που χρησιμοποιήθηκαν

LA	King's B	NA	MA	PDA
10 g Tryptone	20 g Proteose Peptone No3	8 g NB	3 g Proteose Peptone No3	300g κομμένη πατάτα
5 g Yeast Extract	1,5g MgSO ₄ ·7H ₂ O	pH=7, 1l dH ₂ O	5 g Yeast Extract	15g Glucose
10 g NaCl	1,965 g K ₂ HPO ₄	18g Agar	25g of mannitol	18g Agar
pH=7, 1l dH ₂ O	17 g glycerol		18g Agar	1l dH ₂ O
18g Agar	1 l dH ₂ O		1 l dH ₂ O	

2.2. Αντιδραστήρια – Διαλύματα

2.2.1. Πρότυπες ουσίες-Αντιδραστήρια

Τα πρότυπα διαλύματα μεθανόλης (stock solutions) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται στον πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3: Πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν και συγκεντρώσεις αυτών

Πρότυπες ουσίες	Εταιρεία	Καθαρότητα	Ποσότητα (mg)
2,4 DAPG	TRC	≥98% (HPLC)	1000
Pyrrrolnitrin microbiological	Sigma	≥98% (HPLC)	1000

Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε μεθανόλη αναλυτικού βαθμού καθαρότητας φυλάσσονταν σε σκουρόχρωμα υάλινα φιαλίδια (vial) σε καταψύκτη θερμοκρασίας (-4) °C .

2.2.2. Διαλύματα

2.2.2.1. Διάλυμα υδροχλωρικού οξέος, HCL, 6,0 M.

2.2.2.2. Διάλυμα οξικού οξέος, σε ultrapure-grade HPLC H₂O 0,1M.

2.2.2.3. Μεθανόλη, MeOH (LABSCAN, HPLC grade).

2.2.2.4. Ακετονιτρίλιο, ACN(LABSCAN, HPLC grade).

2.2.2.5. Εξάνιο, n-Hexane, (LABSCAN, 95 %).

2.2.2.6. Οξικός αιθυλεστέρας, Ethyl-acetate, (LABSCAN, 95 %).

2.2.2.7 Διχλωρομεθάνιο, Dichloromethane, (LABSCAN, 95 %).

2.3. Μεθοδολογία

2.3.1. Εισαγωγή

Το βακτηριακό στέλεχος X1 καλλιεργήθηκε σε στερεό θρεπτικό υλικό Potato Dextrose Agar και επώαστηκε για πέντε ημέρες στους 28 °C. Τα τρυβλία PDA με την καλλιέργεια του *Pseudomonas fluorescens* X1 τεμαχίστηκαν και εκχυλίστηκαν χωριστά με μια σειρά από διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας, ενώ η δράση κάθε ενός από τα λαμβανόμενα εκχυλίσματα της παρεμπόδισης στο μύκητα *Pythium*

ultimum μελετήθηκε ποιοτικά με βιοδοκιμή. Συνολικά μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων που παρελήφθησαν από έξι διαλύτες. Αυτοί ήταν το εξάνιο, το βενζόλιο, το διχλωρομεθάνιο, η ακετόνη και ο οξικός αιθυλεστέρας. Τα θετικά δείγματα που εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση, αναλύθηκαν στη συνέχεια χρωματογραφικά σύμφωνα με το πρόγραμμα που αναφέρεται στο κεφάλαιο 2.5.1.

Με παρόμοιο τρόπο παρασκευάστηκαν εκχυλίσματα για όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη του *Ps. fluorescens* X1 (πίνακας 2.1) και μελετήθηκε η αντιμικροβιακή τους δράση στο μύκητα *P. ultimum* με *in vitro* βιοδοκιμή. Ακολούθησε στη συνέχεια χρωματογραφική ανάλυση των παραπάνω δειγμάτων σύμφωνα με τις συνθήκες ανάλυσης του εκχυλίσματος του αγρίου τύπου του βακτηρίου.

Το βακτήριο *Ps. fluorescens* X1 καλλιεργήθηκε επίσης και αναπτύχθηκε σε στερεό θρεπτικό μέσο απουσία γλυκόζης PA, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της παρουσίας της γλυκόζης στην παραγωγή τυχόν αντιμικροβιακών ουσιών από τον άγριο τύπο του βακτηρίου. Τα τρυβλία με την καλλιέργεια του *Ps. fluorescens* X1 στη συνέχεια τεμαχίστηκαν και εκχυλίστηκαν σύμφωνα με την πορεία εργασίας I που περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της γλυκόζης στην παραγωγή των τυχόν αντιμικροβιακών ενώσεων, τόσο ο άγριος τύπος του βακτηρίου όσο και τα μεταλλαγμένα στελέχη καλλιεργήθηκαν επίσης σε θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιούν διαφορετικές πηγές άνθρακα από τη γλυκόζη όπως τα Luria Bertani Agar (LA), Nutrient Agar (NA) και Mannitol Agar (MA). Τα δείγματα παρασκευάστηκαν σύμφωνα με την πορεία εργασίας I και μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση κάθε εκχυλίσματος χωριστά, προκειμένου να αποκτήσουμε τελικά μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για τις αιτίες που συντελούν στην ανάπτυξη του φαινομένου της παρεμπόδισης.

2.3.2. Πορεία εργασίας I

Τα βακτηριακά στελέχη *Ps. fluorescens* X1 και τα μεταλλάγματά του k36, w139, p26, B91, B163, R48 καλλιεργήθηκαν σε στερεό θρεπτικό υλικό PDA και PA και επώαστηκαν στους 28 °C.

2.3.2.1. Εμβολιασμός-Επώαση

- 5 mL καλλιέργεια σε PDB από το κάθε βακτηριακό στέλεχος με $O.D.^{600} = 1$.
- Μεταφορά 100 μ L από την παραπάνω καλλιέργεια σε τρυβλίο με PDA,
- Εμβολιασμός συνολικά 20 τρυβλίων με βακτήριο (τεχνική plating) / επώαση 4 ημέρες στους 28 ° C.
- Τεμαχισμός PDA σε μικρά τεμάχια και προσθήκη 300 mL Ακετόνης
- Ανακίνηση για 24 h στις 200 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.

2.3.2.2 Φυγοκέντρηση-Συμπύκνωση

- Φυγοκέντρηση δείγματος και παραλαβή υπερκείμενου διαλύματος.
- Συμπύκνωση διαλύματος σε περιστροφικό συμπυκνωτή στους 40 ° C περίπου μέχρι τα 100 mL.
- Μέτρηση και καταγραφή pH
- Προσθήκη άλατος KCl

2.3.2.3 Εκχύλιση-Παραλαβή

- Εκχύλιση υδατικού συμπυκνώματος 2 φορές με προσθήκη 40 mL οξικού αιθυλεστέρα (Ethylacetate) σε διαχωριστική χοάνη, πολύ καλή ανακίνηση
- Φυγοκέντρηση και παραλαβή οργανικής φάσης.
- Διαβίβαση δείγματος από 100 g άνυδρου θειικού νατρίου (Sodium Sulfate Anhydrite)
- Συλλογή σε ποτήρι ζέσεως και εξάτμιση μέχρι ξηρού σε ανακινητήρες στους 40 ° C μέχρι ξηρού.

2.3.2.4 Ανασύσταση

- Ανασύσταση ξηρού υπολείμματος με μεθανόλη (Methanol), φιλτράρισμα εκχυλίσματος με φίλτρο PVDF, 0,45 μ m.
- Παραλαβή μεθανολικού διαλύματος (2 mL) σε φιαλίδια με πώμα από Teflon (PTFE) και φύλαξη στην κατάψυξη.

2.4. *In vitro* βιοδοκιμή εκχυλισμάτων

Αναπτύχθηκε μια ποιοτική μέθοδος για την *in vitro* μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων του *Ps. fluorescens* X1, και των μεταλλαγμάτων, στο φυτοπαθογόνο μύκητα *P. ultimum*. Το κάθε εκχύλισμα από την καλλιέργεια των βακτηρίων (100 μ L) εναποτέθηκε γραμμικά, σε απόσταση 2 cm περίπου από το κέντρο ενός τρυβλίου, με θρεπτικό υλικό PDA. Κατόπιν, στο κέντρο του τρυβλίου τοποθετήθηκε ένα δισκίο PDA, διαμέτρου 7 mm, που αποκόπηκε με φελλοτρυπητήρα από μητρική καλλιέργεια του *P. ultimum* σε PDA. Ακολούθησε επώαση, σε θερμοκρασία 28 °C, και μέτρηση της ακτινικής ανάπτυξης του μύκητα την 2^η ημέρα, μετά τον εμβολιασμό του. Όλοι οι παραπάνω χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε *in vitro* μελέτη με σκέτο διαλύτη μεθανόλη σύμφωνα με την παραπάνω περιγραφόμενη πορεία, ώστε να αποκλειστεί η τυχόν επίδραση του σκέτου διαλύτη στην ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα.

2.5. RP-HPLC ανάλυση εκχυλισμάτων.

2.5.1. Οργανολογικός εξοπλισμός

Η ανάλυση των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή της τεχνικής της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε σύστημα (Agilent 1090 series). Για την χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφική στήλη Discovery C18 column (5 μ m, 250 \times 4,6 mm id, supelco) με την αντίστοιχη προστήλη. Η θερμοκρασία της στήλης ορίστηκε στους 40 ° C και ο όγκος εισαγόμενου δείγματος στα 5 μ L. Για την ανίχνευση των ουσιών χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού UV-Vis, που ρυθμίστηκε σε μήκος κύματος 254 nm. Το πρόγραμμα έκλουσης των διαλυτών ήταν συνδυασμός ισοκρατικής και βαθμιδωτής (gradient elution) έκλουσης με ροή 0,5 mL/min και σύσταση κινητής φάσης: υδατικό διάλυμα οξικού οξέος, 0.1M (Α), μεθανόλη (Β) και ακετονιτρίλιο (Γ).

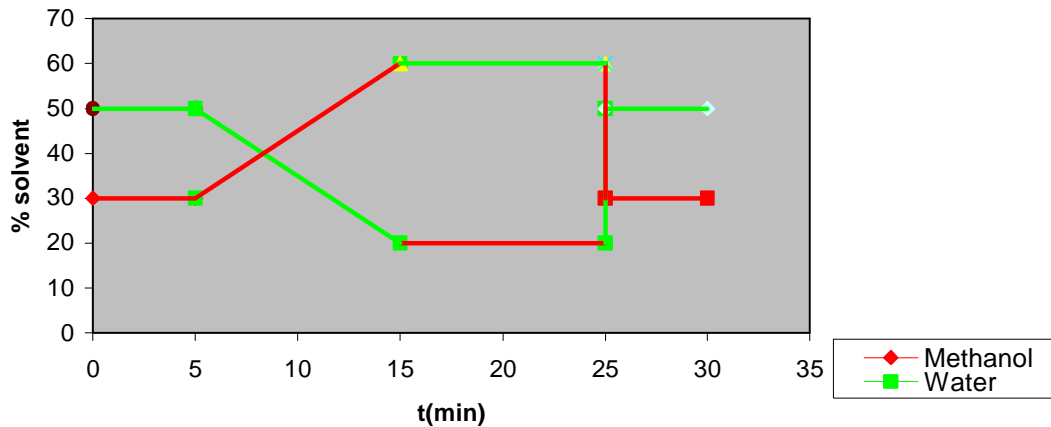
Τα κριτήρια επιλογής των διαλυτών σχετίστηκαν με την ισχύ και την εκλεκτικότητα της κινητής φάσης. Το νερό και η μεθανόλη επιλέχθηκαν γιατί καθορίζουν την ισχύ της κινητής φάσης, ώστε να επιτυγχάνονται ικανοποιητικοί χρόνοι έκλυσης των αναλυτών και με τιμές του παράγοντα χωρητικότητας, k από 2 έως 10. Η προσθήκη μικρής ποσότητας οξικού οξέος στο νερό βελτιώσε την ποιότητα των χρωματογραφικών κορυφών βοηθώντας να απενεργοποιηθούν οι θέσεις ισχυρής προσρόφησης της στατικής φάσης, που προκαλούν ουρά στις χρωματογραφικές κορυφές. Το ακετονιτρίλιο προστέθηκε με σκοπό να βελτιώσει την εκλεκτικότητα της κινητής φάσης χωρίς να μειωθεί η ισχύς της.

Αναλυτική περιγραφή του χρωματογραφικού προγράμματος έκλυσης των διαλυτών δίνεται στον πίνακα 2.4. Στην εικόνα 2.1 παριστάνεται γραφικά η επί τοις εκατό σύσταση των διαλυτών (Α) και (Β) σε σχέση με το χρόνο.

- **Χρωματογραφικό πρόγραμμα I**

Πίνακας 2.4. Χρωματογραφικό πρόγραμμα έκλυσης διαλυτών για την HPLC ανάλυση, με ροή κ. φ. 0.5 mL / min.

Χρόνος (min)	% H ₂ O- Ac. ac. 0.1M (Α)	% Methanol (Β)	% Acetonitrile (Γ)
0-5	50	30	20
5-15	20	60	20
15-25	20	60	20
25.01	50	30	20
30	50	30	20



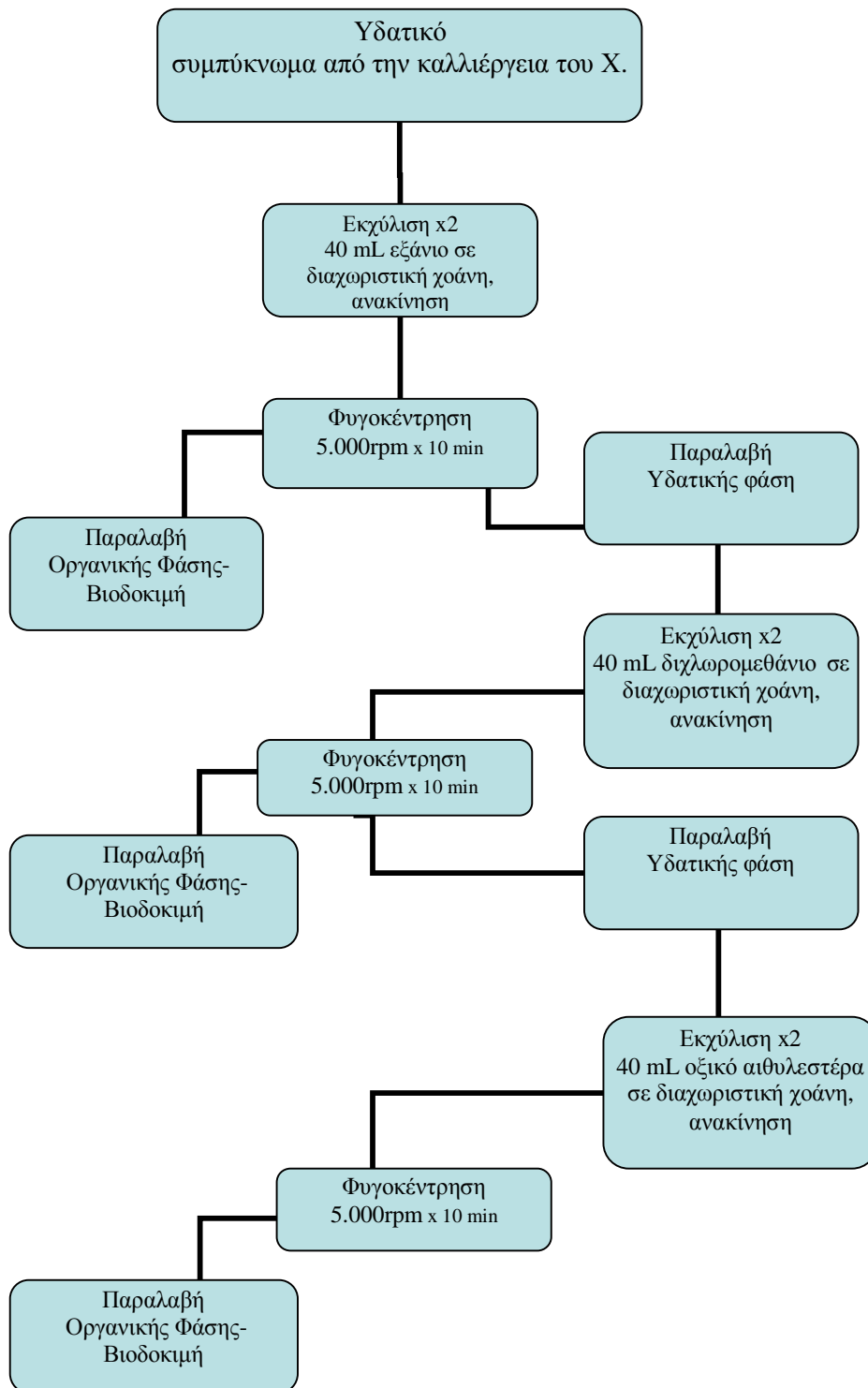
Εικόνα 2.1. Διάγραμμα μεταβολής της επί τοις εκατό σύστασης των διαλυτών (Α) και (Β) σε σχέση με το χρόνο

2.6. Πορεία εργασίας II

Η αρχική μελέτη του χρωματογραφήματος του *Ps. fluorescens* X1, έδωσε ένα χρωματογράφημα ιδιαίτερα σύνθετο στη μελέτη του. Αποφασίστηκε, συνεπώς, η καλλιέργεια του βακτηρίου να εκχυλιστεί εκλεκτικά με μια σειρά διαδοχικών διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας, να μελετηθεί η αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος κάθε διαλύτη χωριστά και να ακολουθήσει χρωματογραφική ανάλυση για κάθε επί μέρους εκχύλισμα που θα παρουσίαζε αντιμικροβιακή δράση.

Η μέθοδος της εκλεκτικής εκχύλισης αποσκοπούσε στην απλοποίηση της μελέτης του χρωματογραφήματος του *Ps. fluorescens* X1, αφού όπως είναι γνωστό, με την επιλογή των κατάλληλων διαλυτών είναι δυνατόν ένα πολύ σύνθετο χρωματογράφημα να μετατραπεί σε απλούστερα χρωματογραφήματα. Στην πορεία εργασίας II συνεπώς, το μόνο στάδιο που τροποποιήθηκε ήταν το στάδιο της εκχύλισης. Τόσο ο εμβολιασμός και η επώαση όσο και η φυγοκέντρηση και η συμπύκνωση πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις παραγράφους 2.3.2.1. και 2.3.2.2. Το στάδιο της εκχύλισης περιγράφεται αναλυτικά στην εικόνα 2.2.

Εικόνα 2.2. Παρασκευαστική πορεία εργασίας II



Ακολούθησε ανασύσταση σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.2.4 και τα δείγματα στη συνέχεια φυλάχθηκαν στο ψυγείο.

2.7. Απομόνωση αντιμικροβιακών ενώσεων

2.7.1. Ανάπτυξη μεθόδου απομόνωσης δευτερογενών μεταβολιτών με Ημιπαρασκευαστική Χρωματογραφία (RP-HPLC).

2.7.1.1. Οργανολογικός εξοπλισμός

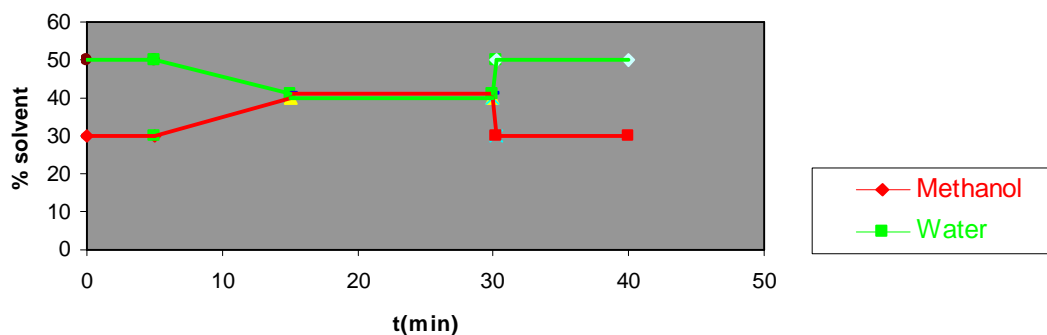
Η απομόνωση των παρεμποδιστικών ενώσεων έγινε στο ίδιο σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (Agilent 1090 series) έπειτα από αλλαγή του συστήματος εισαγωγής δείγματος (loop), ώστε να δέχεται μεγαλύτερη ποσότητα ουσίας από 5μL σε 50 μL. Τα κλάσματα απομονώθηκαν από μια ημιπαρασκευαστική στήλη, PhenomeneX1 C18 column (5 μm, 250×10 mm), χωρίς τη χρήση προστήλης, με τη χρήση ανιχνευτή UV-Vis, σε μήκος κύματος 254 nm.

Το 45 min χρωματογραφικό πρόγραμμα έκλουσης των διαλυτών ήταν συνδυασμός βαθμιδωτής (gradient elution) και ισοκρατικής έκλουσης (isocratic elution) (διάγραμμα 1), με σύσταση κινητής φάσης υδατικό διάλυμα οξικού οξέος, 0.1M (Α), μεθανόλη (Β) και ακετονιτρίλιο (Γ) και ροή κινητής φάσης στα 1,8 mL / min. Αναλυτικά περιγραφή του προγράμματος δίνεται στον πίνακα 2.5. Στην εικόνα 2.3 παριστάνεται γραφικά η επί τοις εκατό σύσταση των διαλυτών (Α) και (Β) σε σχέση με το χρόνο.

- Χρωματογραφικό πρόγραμμα II

Πίνακας 2.5. Χρωματογραφικό πρόγραμμα έκλουσης διαλυτών για την HPLC ανάλυση με ροή κ. φ. 1.8 mL / min.

Χρόνος (min)	% H ₂ O- Ac. ac. 0.1M (Α)	% Methanol (Β)	% Acetonitrile (Γ)
0-5	50	30	20
5-15	40	40	20
15-35	40	40	20
35.01	50	30	20
45	50	30	20



Εικόνα 2.3. Διάγραμμα μεταβολής της επί τοις εκατό σύστασης των διαλυτών νερό και μεθανόλη σε σχέση με το χρόνο.

Πορεία εργασίας

50 μL δείγματος ενέθηκαν στον υγρό χρωματογράφο και αναλύθηκαν χρωματογραφικά σύμφωνα με τις συνθήκες που αναφέρουμε παραπάνω. Σε κάθε εργαστηριακή ημέρα συλλέγονταν τα κλάσματα από συνολικά τρεις ενέσεις σε υάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες και το χρωματογραφικό σύστημα στη συνέχεια ξεπλένονταν με τους διαλύτες της κινητής φάσης για 30 min τουλάχιστον, ώστε η ημιπαρασκευαστική στήλη να διατηρείται καθαρή. Ακολούθησε εξάτμιση κάθε κλάσματος μέχρι ξηρού σε περιστροφικό συμπυκνωτή, ώστε να απομακρυνθούν οι διαλύτες της κινητής φάσης, ανασύσταση με μεθανόλη-χλωροφόρμιο (1:2) και αποθήκευση στην κατάψυξη.

2.7.2 Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών με Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας, TLC.

2.7.2.1. Εισαγωγή

Το διαυγές υποκίτρινο εκχύλισμα του άγριου τύπου του βακτηρίου τοποθετήθηκε με τη χρήση γυάλινης τριχοειδούς πιπέτας χωρητικότητας 20 μL , σε υάλινη πλάκα χρωματογραφίας 25 x 25 cm επιστρωμένης με silica gel GF₂₅₄, πάχους 0,75 mm. Στη συνέχεια το χρωματογράφημα αναπτύχθηκε σε δοχείο χρωματογραφίας που περιείχε σύστημα διαλυτών χλωροφορμίου-μεθανόλης σε αναλογία 84:16. Σε

κάθε πλάκα παρασκευαστικής χρωματογραφίας εναποτέθηκε ποσότητα που δεν ξεπερνούσε τα 10 mg ξηρού δείγματος. Παράλληλα, με την πρώτη πλάκα στο ίδιο δοχείο αναπτύχθηκε και μια δεύτερη πλάκα χρωματογραφίας (TLC, Alumina) στην οποία εναποτέθηκε εκχύλισμα ποσότητας 10 μ L. Στο τέλος της πορείας σημειώθηκε η θέση του μετώπου του υγρού ανάπτυξης και οι πλάκες ξηράθηκαν. Η εμφάνιση του χρωματογραφήματος έγινε αρχικά με τη χρήση λυχνίας υπεριώδους ακτινοβολίας μήκους κύματος 254 nm, όπου εντοπίστηκαν οι ζώνες που αντιστοιχούσαν στα επί μέρους συστατικά του εκχυλίσματος. Για τον ευκρινέστερο εντοπισμό των ζωνών η πλάκα αλουμινίου ψεκάστηκε με εμφανιστικό διάλυμα από p-ανισαλδεύδη, θειικό και οξικό οξύ σε αιθανόλη.

Για την παρασκευή του εμφανιστικού διαλύματος αναμείχθηκαν 338 mL παγωμένης αιθανόλης με 12,5 mL θειικού οξέος (Διάλυμα A) και 9,2 mL p-ανισαλδεύδης με 3,75 mL οξικού οξέος (Διάλυμα B). Οι αναμειξίες έγιναν σε φιάλες που βρίσκονταν σε πάγο. Κατόπιν το διάλυμα A αναμείχθηκε σταδιακά με το διάλυμα B στον πάγο και υπό ανάδευση. Το υγρό τοποθετήθηκε σε σκουρόχρωμη φιάλη και φυλάχθηκε στους $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Μετά τον ψεκάσμό με το διάλυμα της ανισαλδεύδης, η πλάκα χρωματογραφίας θερμάνθηκε στους $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ με αποτέλεσμα οι ζώνες να χρωματιστούν με έντονα χρώματα. Με τον τρόπο αυτό οι ουσίες εντοπίστηκαν με ακρίβεια και εκχυλίστηκαν με 15 mL οξικού αιθυλεστέρα η καθεμία. Το silica gel απομακρύνθηκε με φυγοκέντριση στις 7500 rpm για 15 min.

2.7.2.2 Καθαρισμός δειγμάτων με Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (Solid Phase Extraction)

Χρησιμοποιήθηκε στήλη εκχύλισης στερεάς φάσης C-18, 500 mg, 3 mL. Η στήλη ενεργοποιήθηκε με 3 mL ακετόνη. Ακολούθησε προσθήκη 4 mL 20 % διαλύματος μεθανόλης καθώς και 4 mL 2,5 % διαλύματος μεθανόλης. Ακολούθησε η εισαγωγή του προς καθαρισμού δείγματος όγκου 1 mL, διαλυμένο σε μεθανόλη-χλωροφόρμιο (1:1). Η στήλη εκπλύθηκε με 4 mL διαλύματος μεθανόλης 20%. Τέλος, πραγματοποιήθηκε έκλουση με μεθανόλη μέχρι τελικού όγκου 2 mL.

2.7.2.3. *In vitro* βιοδοκιμή κλασμάτων

Κάθε ένα από τα κλάσματα στη συνέχεια μελετήθηκε ποιοτικά, ως προς την *in vitro* βιοδραστική του ικανότητα έναντι του παθογόνου μύκητα *P. ultimum*, σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρθηκε στην πρώτη βιοδοκιμή.

2.8. Χαρακτηρισμός δομής αντιμικροβιακών ενώσεων

2.8.1 Εισαγωγή

Ο χαρακτηρισμός της δομής των αντιμικροβιακών ενώσεων έγινε με τις τεχνικές της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συνδυασμένης με φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού και φασματομετρία μαζών (LC-MS) καθώς και με υπέρυθη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) και με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR).

2.8.2. Ανάλυση κλασμάτων με φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού και φασματομετρία μαζών (HPLC-UV-Vis-MS)

2.8.2.1. Οργανολογικός εξοπλισμός

Αναπτύχθηκε μέθοδος με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συνδυασμένης με φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού και φασματομετρία μαζών (HPLC-UV-Vis-MS). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Shimadzu LC/MS 2010A, το οποίο περιλαμβάνει δυαδική αντλία (LC-10ADvp), DGU-14A σύστημα απαέρωσης, αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10ADvp, ανιχνευτή διόδων (SPD-M10Avp), απλό τετραπολικό αναλυτή καθώς και πηγή APCI (+) για τον ιονισμό των αναλυόμενων μορίων.

Για την χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφική στήλη Discovery C18 column (5 μm, 250× 4,6 mm id, Supelco) και η αντίστοιχη προστήλη. Οι διαλύτες έκλουσης ήταν αυτοί που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις

χρωματογραφικές αναλύσεις: υδατικό διάλυμα οξικού οξέος (0,1M), μεθανόλη και ακετονιτρίλιο. Το εφαρμοζόμενο πρόγραμμα έκλουσης των διαλυτών ήταν αυτό που περιγράφεται κατά την απομόνωση (πίνακας 2.5), με ροή κινητής φάσης 0.5 mL/min.

Υγρός χρωματογράφος με ανιχνευτή μαζών. Ο εκλεκτικός ανιχνευτής μαζών επιτρέπει τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση των αντιμικροβιακών ουσιών με βάση το φάσμα μάζας τους, είτε με ταυτόχρονη παρακολούθηση του συνόλου των παραγόμενων ιόντων (Total Ion Chromatogram, TIC), οπότε αναφερόμαστε σε διαδικασία πλήρους σάρωσης (full scan), είτε με παρακολούθηση συγκεκριμένων ιόντων (Selected Ion Monitoring, SIM), οπότε αναφερόμαστε σε διαδικασία ελέγχου επιλεγμένων ιόντων. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία της πλήρους σάρωσης.

2.8.3. Ανάλυση κλασμάτων με Υγρή Χρωματογραφία Υπερυψηλής Πίεσης συνδεδεμένη με Υβριδικό Φασματογράφο Μάζας διαδοχικής φασματομετρίας και υψηλής διακριτικής ικανότητας (UHPLC-HRMSⁿ)

2.8.3.1. Οργανολογικός εξοπλισμός

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υπερυψηλής Πίεσης συνδεδεμένη με Υβριδικό Φασματογράφο Μάζας διαδοχικής φασματομετρίας και υψηλής διακριτικής ικανότητας (UHPLC-HRMSⁿ).

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε σύστημα Accela LC (ThermoFinnigan, San Jose, USA) το οποίο αποτελείται από αντλία UHPLC, αυτόματο δειγματολήπτη και ανιχνευτή UV-Vis πολλαπλού μήκους κύματος (PDA). Ο υβριδικός φασματογράφος μάζας αποτελείται από γραμμική παγίδα ιόντων (LTQ) σε σειρά με κυκλοτρονιακού τύπου αναλυτή μαζών μετασχηματισμού Fourier (Orbitrap) – (LTQ-Orbitrap Discovery -ThermoFinnigan, San Jose, USA). Πηγή ηλεκτροψεκασμού ESI (+) χρησιμοποιήθηκε για τον ιονισμό των αναλυόμενων μορίων.

Για την χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφική στήλη τύπου Hypersil GOLD, 50 x 2.1 mm, 1.9 μm (Thermo Scientific) και κινητή φάση αποτελούμενη από δύο συστήματα διαλυτών και συγκεκριμένα από υδατικό διάλυμα φορμικού οξέος 0.1 % (A) και μεθανόλη (B). Εφαρμόστηκε γραμμική μέθοδος έκλουσης και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: αρχικές συνθήκες A-

B (95:5), σε 8 min A-B (5:95), για 2 min A-B (5:95), επιστροφή στις αρχικές συνθήκες σε 0.1 min, Η ροή της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στα 200 mL/min. Η θερμοκρασία στο τριχοειδές της πηγής ιονισμού ESI ρυθμίστηκε στους 300 °C, σε δυναμικό ιονισμού 3.5 kV. Η ροή του αερίου αζώτου στο τριχοειδές (sheath gas) ρυθμίστηκε στα 30 arb και του βοηθητικού αερίου αζώτου στα of 10 arb. Για όλες τις μετρήσεις m/z ως όριο εμπιστοσύνης (mass tolerance) ορίστηκαν τα 5 ppm.

2.8.4. Ανάλυση κλασμάτων με αέρια χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας (GC-MS)

Το χρωματογραφικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων αποτελείται από έναν αεριοχρωματογράφο GC, (Hewlett Packard HP 6890 Series Gas Chromatograph) με ανιχνευτή μαζών (HP 5973) Inert Mass Selective Detector. Το σύστημα περιλαμβάνει αυτόματο δειγματολήπτη 7683 Series Injector και λογισμικό HP Chemstation. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι τριχοειδής DB-5 ms (20m × 0,25m × 0,25 μm (μήκος × εσωτερική διάμετρος × πάχος στατικής φάσης). Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε αέριο ήλιο, το οποίο διοχετεύθηκε με σταθερή παροχή (1,1 mL/min).

Η σύνδεση του αεριοχρωματογράφου με τον ανιχνευτή μαζών περιλάμβανε ένα θερμαινόμενο αγωγό που περιέχει την τριχοειδή στήλη. Το ένα άκρο της επιφάνειας διασύνδεσης διαπερνά την μια πλευρά του αεριοχρωματογράφου και εξέρχεται από τον κλίβανο αυτού, ενώ το άλλο άκρο της γραμμής μεταφοράς προσαρμόζεται στην πηγή ιόντων. Η θερμοκρασία στη γραμμή μεταφοράς ρυθμίστηκε στους 300 °C. Στην παρούσα εργασία επίσης χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία της πλήρους σάρωσης (Selected Ion Monitoring, SIM).

- Αναλυτικές παράμετροι:

Σύστημα εισαγωγής δείγματος:

Όγκος εισαγόμενου δείγματος: 2 μL

Θερμοκρασία συστήματος εισαγωγής δείγματος: 250 °C

Διαμερισμός συστήματος εισαγωγής δείγματος: 1:15

- Σύστημα διαχωρισμού:

Κινητή φάση: Ήλιο.

Αρχική θερμοκρασία θερμοστατούμενου κλιβάνου: 90 °C

Θερμοκρασιακό Πρόγραμμα: 90 °C για 2 min, 23 °C/min μέχρι 275 °C παραμονή 2 min, 30 °C/min μέχρι 290 °C, παραμονή 15 min.

Συνολικός χρόνος σάρωσης : 27,54 min.

- Σύστημα ανίχνευσης:

Πηγή ιονισμού: με πρόσκρουση ηλεκτρονίων

Θερμοκρασία πηγής ιονισμού: 230 °C

Θερμοκρασία επιφάνειας διασύνδεσης: 300 °C

Εύρος μαζών: 50-550

Θερμοκρασία ανιχνευτή ιόντων: 300 °C

2.8.5. Ανάλυση με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-IR

2.8.5.1. Φασματοσκοπία FT-IR

Για την καταγραφή των φασμάτων FT-IR των βακτηριακών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Nicolet (Magna IR 750). Τα φάσματα καταγράφηκαν για την περιοχή $4000-600\text{cm}^{-1}$ με διαχωριστική ικανότητα 4cm^{-1} . Για τη λήψη του κάθε φάσματος πραγματοποιηθήκαν 100 σαρώσεις του δείγματος. Τα φάσματα FT-IR εξομαλύνθηκαν και έγινε διόρθωση της βασικής γραμμής των φασμάτων. Η επεξεργασία των φασμάτων που συλλέχθηκαν έγινε με το λογισμικό OMNIC (Thermo Electron Inc., California, U.S.A.). Τις περισσότερες φορές τα φάσματα μιγμάτων ή φυσικών προϊόντων παρουσιάζουν θόρυβο και η βασική τους γραμμή αποτελείται από σημεία, των οποίων η ένταση δεν είναι μηδέν. Επίσης, υπάρχει αλληλοεπικάλυψη των κορυφών που οφείλονται σε διαφορετικές λειτουργικές (χαρακτηριστικές) ομάδες με αποτέλεσμα να εμφανίζονται ως μια κορυφή. Για τους παραπάνω λόγους είναι αναγκαία η περαιτέρω επεξεργασία τέτοιων φασμάτων (Huang *et al*, 2001). Στην παρούσα μελέτη, η επεξεργασία αυτή

περιελάμβανε την εξομάλυνση (smoothing) των φασμάτων, η οποία καταργεί τον υψηλής συχνότητας θόρυβο του οργάνου υπολογίζοντας το μέσο όρο γειτονικών μετρήσεων και τη διόρθωση βασικής γραμμής του φάσματος (baseline correction), καθώς (Lin *et al*, 2005). Για τις συγκεκριμένες μετατροπές των φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι προϋπάρχουσες εντολές του λογισμικού OMNIC.

2.8.5.2 Πορεία εργασίας

Κατά τη μέθοδο αυτή, 10 μL από το κάθε εκχύλισμα τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια δισκίου ZnSe, το οποίο χρησιμοποιείται κατά τη λήψη φασμάτων IR. Για τη δημιουργία ενός ομοιογενούς στρώματος στεγνών κυττάρων, ο δίσκος τοποθετήθηκε για 45 min σε θάλαμο νηματοειδούς ροής σε θερμοκρασία δωματίου. Πριν από τη λήψη των φασμάτων FT-IR, ελήφθη το φάσμα FT-IR καθαρού δισκίου ZnSe, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως υπόβαθρο (background).

2.8.6. Ανάλυση με τη χρήση πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Τα πειράματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) πρωτονίου, μίας και δύο διαστάσεων, ελήφθησαν σε φασματοσκόπιο NMR Bruker Avance III, 600 MHz, με χρήση ανιχνευτή 5mm (broadband inverse probe). Όλα τα δείγματα διαλύθηκαν σε δευτεριωμένη μεθανόλη, ενώ η θερμοκρασία για όλα τα πειράματα ήταν 295K (22 °C). Για το πείραμα πρωτονίου μίας διάστασης, χρησιμοποιήθηκε η παλμική ακολουθία zgpg1, κατά την οποία, εκτός από τον παλμό 90°, εφαρμόζεται και ένας συνεχής παλμός μικρής έντασης (50Hz) για την εξάλειψη της ευρείας και υψηλής έντασης κορυφής του HDO (residual water signal). Για το κάθε 1D ^1H πείραμα, συλλέχτηκαν 16 σάρωσεις, σε εύρος 7211 Hz, με συνολικό χρόνο 4.54 sec για κάθε σάρωση. Ως αναφορά για τη χημική μετατόπιση των πρωτονίων χρησιμοποιήθηκε η κορυφή της μεθανόλης στα 3.31 ppm. Επιπλέον των 1D φασμάτων, πραγματοποιήθηκαν και τα πειράματα NMR δύο διαστάσεων, ^1H ^1H COSY (Correlation Spectroscopy), ^1H ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) και ^1H ^{13}C HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation).

2.9. Σύγκριση με γνωστές αντιμικροβιακές ουσίες.

Ένα επιτακτικό ερώτημα που τέθηκε στην παρούσα διατριβή, ήταν εάν ένας ή και περισσότεροι αντιμικροβιακοί μεταβολίτες που απομονώσαμε από το *Pseudomonas fluorescens* X1, αντιστοιχούσε σε νέο μόριο ή ήταν ήδη κάποιος ταυτοποιημένος και γνωστός μεταβολίτης. Προκειμένου, να απαντηθεί το ερώτημα αυτό πραγματοποιήθηκε έρευνα και καταγραφή από τη βιβλιογραφία όλων των ταυτοποιημένων δευτερογενών μεταβολιτών με αντιμικροβιακή δράση που παράγονται από τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, δημιουργώντας τον πίνακα 2.6.

Πίνακας 2.6. Ταυτοποιημένοι δευτερογενείς μεταβολίτες με αντιμικροβιακή δράση που παράγονται από τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*

Αντιμικροβιακές Ενώσεις	Mw	Αναφορά
Φλορογλουκινόλη	126	Marchant <i>et. al.</i> , 2000
Μονοακέτυλο-φλορογλουκινόλη	168	Marchant <i>et. al.</i> , 2000
1-Ο-ακέτυλο-φλορογλουκινόλη	168	Marchant <i>et. al.</i> , 2000
2,4-διακετυλοφλορογλουκινόλη	210	Marchant <i>et. al.</i> , 2000
1,3-δι- Ο-ακέτυλ-φλορογλουκινόλη	252	Marchant <i>et. al.</i> , 2000
1-Ο-2- διακέτυλ-φλορογλουκινόλη	210	Marchant <i>et. al.</i> , 2000
5- Ο-2- διακέτυλ-φλορογλουκινόλη	210	Marchant <i>et. al.</i> , 2000
Φαιναζίνη-1-καρβοξυλικό οξύ	224	Gurusiddaiah <i>et. al.</i> ,1986
2-OH-φαιναζίνη	196	Liu <i>et.al.</i> , 2007
Φαιναζίνη	180	Marchant <i>et. al.</i> , 2000
1-OH-φαιναζίνη	196	Dyer <i>et.al.</i> , 2007
2-OH-φαιναζίνη-καρβοξυλικό οξύ	246	Raaijmakers <i>et.al.</i> ,1997
Φαιναζίνη-1-καρβοξαμίδιο	245	Mavrodi <i>et. al.</i> , 2001
1-μεθόξυ-φαιναζίνη	210	Dyer <i>et.al.</i> , 2007
Πυοκυανίνη	210	Dyer <i>et.al.</i> , 2007
Αερουτζίνη 4-υδροξυμεθύλ-2-(2-υδρολυφανύλ)-2-θειαζολίνη	209	Lee <i>et. al.</i> , 2003
Πυολουτεορίνη	271	Wang <i>et.al.</i> , 2005
Πυρρολνιτρίνη	257	Cartright <i>et.al.</i> , 1995
N-μερκάπτο-4-φορμυλοκαρβοστυρίλιο	205	Fakhouri <i>et.al.</i> , 2001
3-(1Εξενύλ)-5-μεθύλ-2-(5H)-φουρανόνη	180	Paulitz <i>et. al.</i> , 2000
2-εξύλ-5-προπύλ-ρεσορκινόλη	236	Brian Nowak-Thompson Philip <i>et. al.</i> , 2002
Ραμνολιπίδια	> 500	Gunther <i>et al.</i> , 2005
Σιδηροφόρα		
Ψευδοβακτρίνη B	989	Andriollo <i>et. al.</i> , 1992
Πυοβερνίνη	>900	Mohn <i>et al.</i> , 1990
C ₁₈ H ₃₆ NO	282	Mandryk <i>et. al.</i> , 2007
C ₂₀ H ₃₁ O ₃	319	Mandryk <i>et. al.</i> , 2007
Λιποπεπτίδια		
Sch 419558,	500	Shu-Wei Yang <i>et. al.</i> , 2004
Πουτισολβίνη I and II	1380-1394	Kuiper <i>et. al.</i> , 2004
Βισκοσιναμίδη (CLP)	1125	Nielsen <i>et. al.</i> , 1999
Αμφικίνη (CLP)	1395	Nielsen <i>et. al.</i> ,2002
Τενσίνη (CLP)	1409	Nielsen <i>et. al.</i> , 2000
Λοκισίνη(CLP)	1354	Nielsen <i>et. al.</i> ,2002

Κεφάλαιο 3^ο Αποτελέσματα

3.1. Απομόνωση αντιμικροβιακών ενώσεων

Ο άγριος τύπος του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* X1 καθώς και τα μεταλλαγμένα στελέχη k36, w139, p26, B163, B91 και r48 καλλιεργήθηκαν σε διάφορα θρεπτικά υποστρώματα και εκχυλίστηκαν εκλεκτικά με κατάλληλους διαλύτες για την παραλαβή των πιθανά δραστικών ενώσεων από τα υποστρώματα αυτά. Τα εκχυλίσματα που προέκυψαν μελετήθηκαν ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση, απουσία του βακτηρίου, με βιοδοκιμή έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *P. ultimum*. Ο σκοπός της βιοδοκιμής ήταν διπλός, Να βρεθεί το πιο κατάλληλο θρεπτικό μέσον ανάπτυξης του στελέχους X1 και να διαπιστωθεί εάν τα μεταλλαγμένα στελέχη του βακτηρίου έχασαν την ικανότητα να παρεμποδίζουν τον μύκητα *P. ultimum in vitro*.

3.1.1. Βιοδοκιμή εκχυλισμάτων ως προς την παρεμπόδιση του *P. ultimum in vitro*

Στον πίνακα 3.1. δίνονται τα αποτελέσματα της *in vitro* μελέτης για αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων του στελέχους X καθώς και των μεταλλαγμένων στελεχών επί του *P. ultimum*, που παρασκευάστηκαν σύμφωνα με την πορεία εργασίας I, μετά από την καλλιέργεια των βακτηρίων στα υποστρώματα PDA, MA, LA και NA.

Πίνακας 3.1 : Αποτελέσματα *in vitro* παρεμποδιστικής δράσης αγρίου τύπου *Ps. fluorescens* X1 και των μεταλλαγμάτων, που καλλιεργήθηκαν και αναπτύχθηκαν κανονικά σε διάφορα υποστρώματα, επί του *P. ultimum* 1308. Η εμφάνιση ζώνης παρεμπόδισης εκτιμήθηκε ποιοτικά.

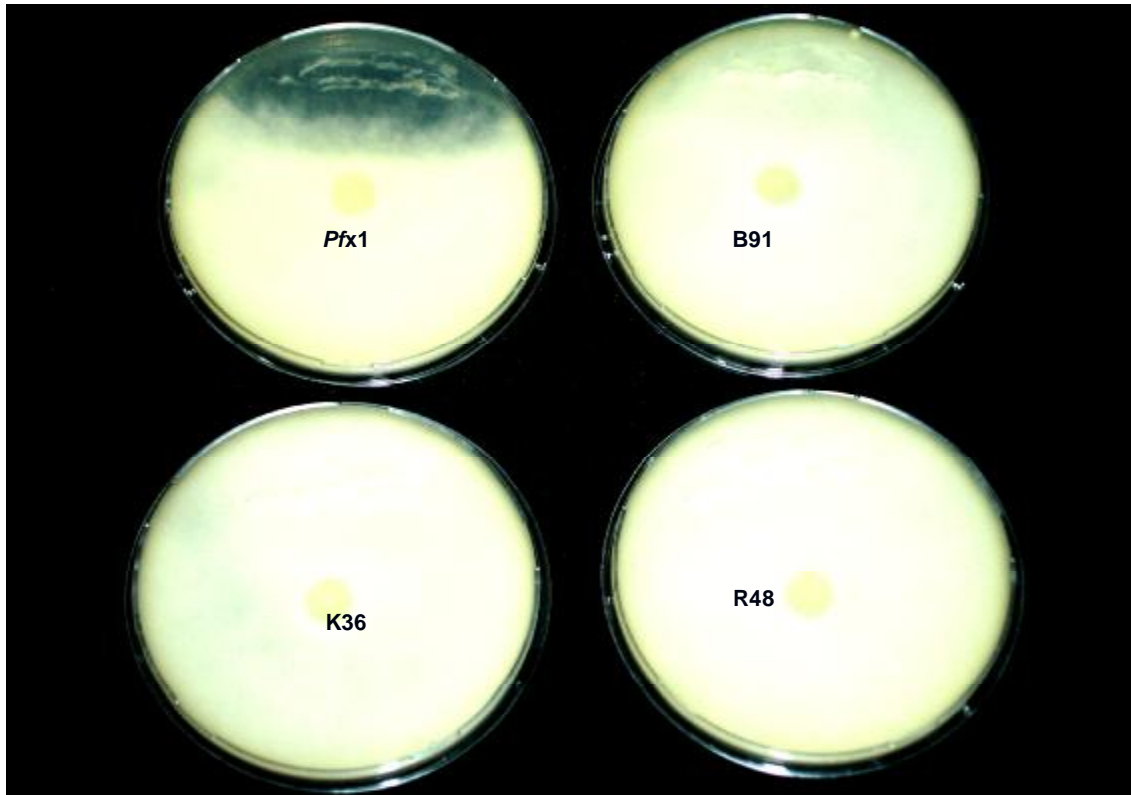
Ανάπτυξη βακτηρίων και εμφάνιση ζώνης παρεμπόδισης του <i>P. ultimum</i> , μετά από καλλιέργεια στα υποστρώματα:	Θρεπτικό υπόστρωμα			
	PDA	LA	MA	NA
Άγριος τύπος X1	+	-	-	-
Μεταλλαγμένα στελέχη R48, K36, W139, p26, B163, B91	-	-	-	-

+ :Εμφάνιση παρεμποδιστικής δράσης

- :Απώλεια παρεμποδιστικής δράσης

Σύμφωνα με τον πίνακα 3.1, τα αποτελέσματα της *in vitro* βιοδοκιμής ήταν πολύ χαρακτηριστικά για το δείγμα του *Ps. fluorescens* X1 μετά από την καλλιέργεια του βακτηρίου στο θρεπτικό υλικό PDA. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση της γραμμικής ανάπτυξης του μύκητα στην περιοχή όπου εμβολιάστηκε το εκχύλισμα του δείγματος αυτού και κανονική ανάπτυξη του μύκητα στα τρυβλία όπου είχαν εναποτεθεί τα εκχυλίσματα των μεταλλαγμένων στελεχών (εικ. 3.1.). Όσον αφορά τα υπόλοιπα θρεπτικά μέσα, MA, LA και NA δεν παρατηρήθηκε παρεμποδιστική δράση από τα εκχυλίσματα ούτε του αγρίου τύπου ούτε των μεταλλαγμάτων.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε ένας τελευταίος έλεγχος για τυχόν παρεμποδιστική δράση ενός τυφλού δείγματος που περιείχε σκέτο διαλύτη μεθανόλη.



Εικόνα 3.1.: *In vitro* παρεμπόδιση της γραμμικής ανάπτυξης του μύκητα *P. ultimum* σε υλικό παρουσία του εκχυλίσματος του αγρίου στελέχους του *Pseudomonas fluorescens* X1 (πάνω αριστερά) και τριών μεταλλαγμένων στελεχών. Παρόμοια αποτελέσματα έδωσαν τα εκχυλίσματα όλων των μεταλλαγμένων στελεχών του X1.

Από τα αποτελέσματα της βιοδοκιμής φάνηκε σαφώς ότι στο δείγμα του εκχυλίσματος του αγρίου τύπου του βακτηρίου περιέχονταν ουσίες με αντιμικροβιακή δράση στους οποίους οφείλεται η παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μύκητα. Οι ενώσεις αυτές απουσίαζαν από τα δείγματα των μεταλλαγμένων στελεχών, με αποτέλεσμα να μην επηρεάζουν καθόλου την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα. Επίσης, δεν εκδηλώθηκε αντιμικροβιακή δράση από το δείγμα που περιείχε σκέτο διαλύτη μεθανόλη. Προκειμένου να εντοπιστούν οι 'ύποπτες' ουσίες, τα δείγματα αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC.

Όλα τα βακτηριακά στελέχη στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν στο θρεπτικό υλικό PDA και μετά από τέσσερις μέρες επώασης στους 28 ° C τα δείγματα που προέκυψαν εκχυλίστηκαν με διαλύτες διαφορετικής πολικότητας. Στον πίνακα 3.2. δίνονται τα αποτελέσματα της *in vitro* μελέτης για αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος του στελέχους X καθώς και των εκχυλισμάτων των μεταλλαγμένων στελεχών, μετά από την παραλαβή τους από διαλύτες διαφορετικής πολικότητας. Στον πίνακα αυτόν με (+) αποδίδεται η θετική παρεμπόδιση ενώ το (-) αφορά τα δείγματα που δεν εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση.

Πίνακας 3.2 : Αποτελέσματα *in vitro* παρεμποδιστικής δράσης εκχυλισμάτων του αγρίου τύπου *Ps. fluorescens* X1 και των μεταλλαγμάτων, που εκχυλίστηκαν με διαλύτες διαφορετικής πολικότητας, επί του *P. ultimum* 1308. Η εμφάνιση ζώνης παρεμπόδισης εκτιμήθηκε ποιοτικά.

Διαλύτες για την εκχύλιση των PDA τρυβλίων.	Αποτελέσματα βιοδοκιμής στο <i>P. ultimum</i>	
	Καλλιέργεια <i>Ps. fluorescens</i> X1 σε PDA	Καλλιέργεια μεταλλαγμάτων <i>Ps. fluorescens</i> X1 σε PDA
Εξάνιο,	-	-
Βενζόλιο	-	-
Διχλωρομεθάνιο	+	-
Ακετόνη	+	-
Οξικός Αιθυλεστέρας	+	-

Συμπερασματικά, για το άγριο στέλεχος X, αντιμικροβιακή δράση παρουσίασαν τα εκχυλίσματα του διχλωρομεθανίου, της ακετόνης και του οξικού αιθυλεστέρα ενώ δεν παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση τα εκχυλίσματα του εξανίου και του βενζολίου. Όσον αφορά τα μεταλλαγμένα στελέχη, στον πίνακα φαίνεται ότι τα εκχυλίσματα των μεταλλαγμένων στελεχών ήταν δείγματα αρνητικά και δεν παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση. Με βάση τα αποτελέσματα των παρατηρήσεων

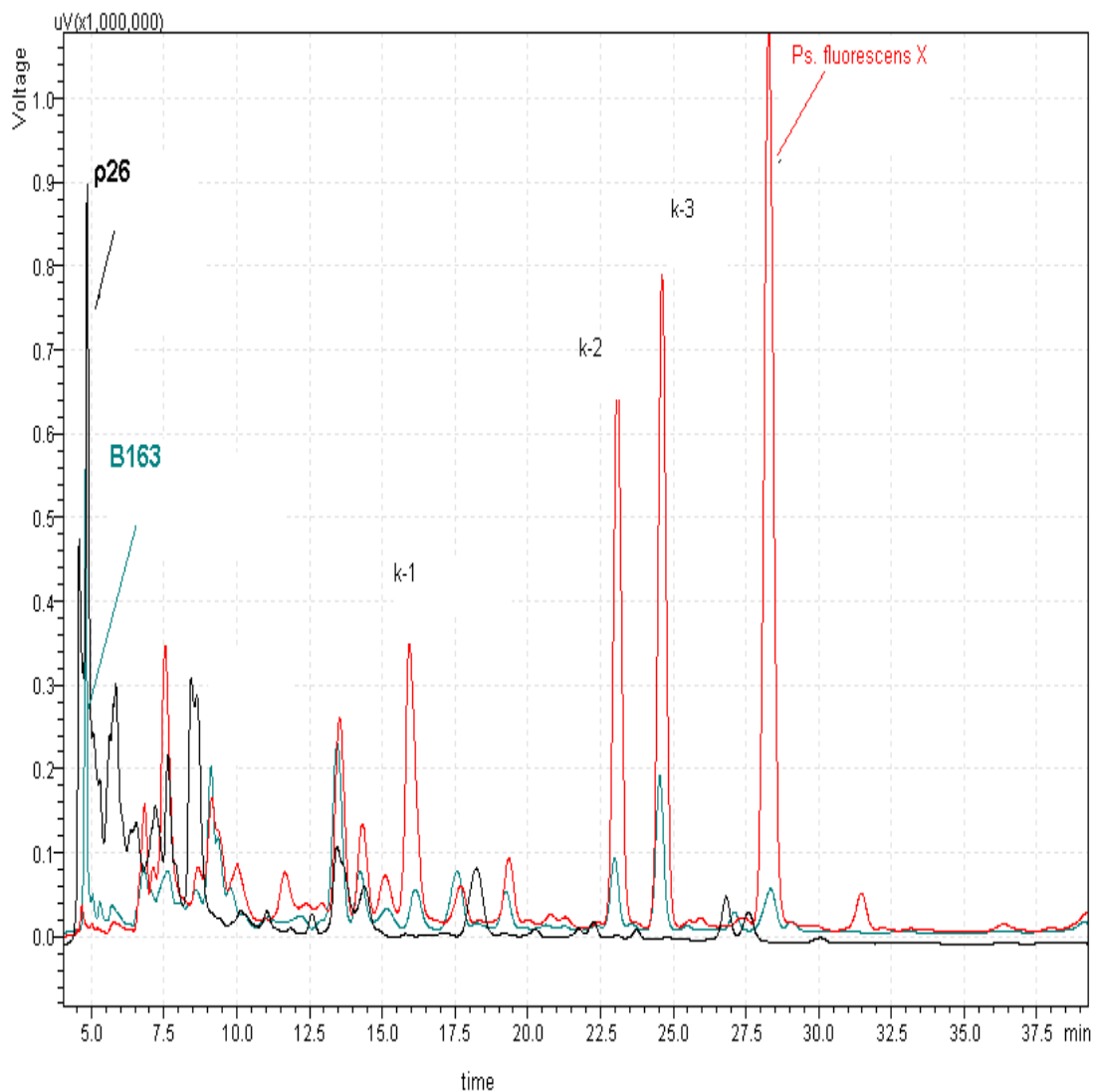
του πίνακα 3.2. διαμορφώθηκαν οι δυο παρασκευαστικές πορείες I και II που παρουσιάστηκαν αναλυτικά στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι.

3.2. Ανάλυση εκχυλισμάτων άγριου τύπου και μεταλλαγμάτων από θρεπτικό υλικό PDA με RP-HPLC.

3.2.1. Πορεία εργασίας I.

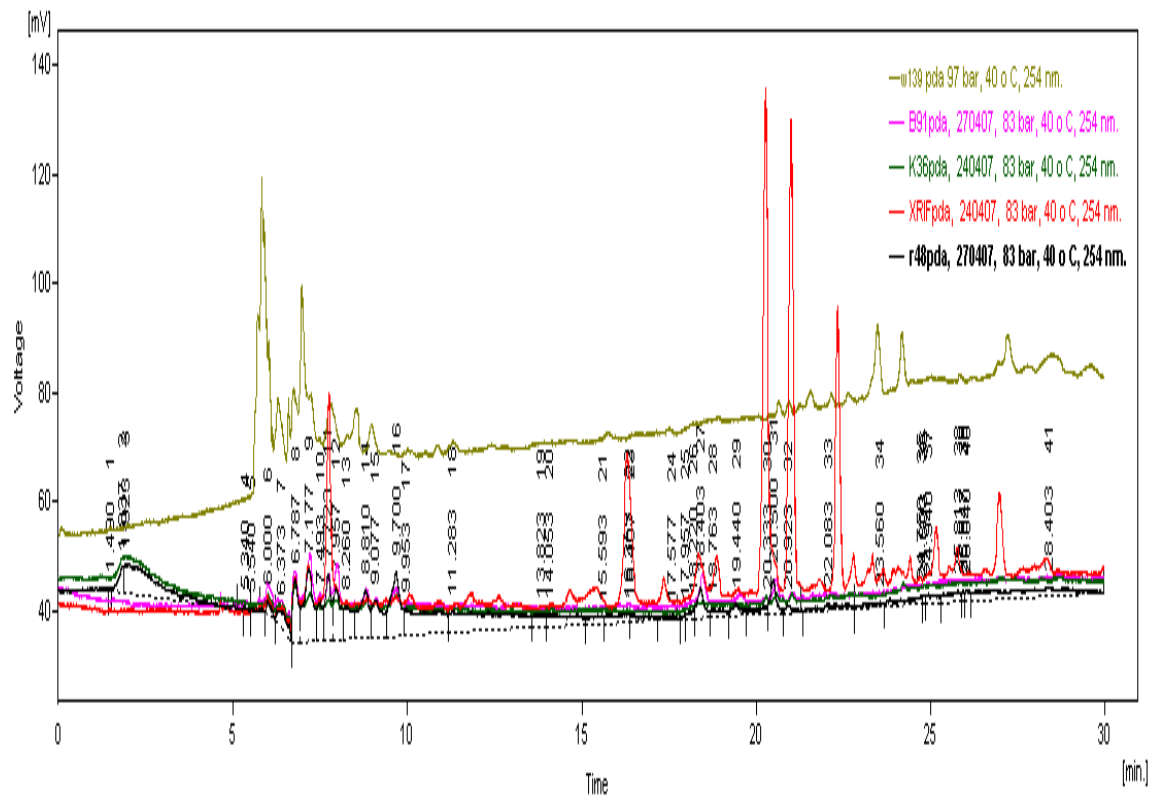
Τα μεταλλαγμένα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, είχαν χάσει την ικανότητα της παρεμπόδισης της ανάπτυξης του *P. ultimum* μετά από συγκαλλιέργεια στο PDA. Ελέγχοντας αρχικά το pH της καλλιέργειας του αγρίου τύπου του βακτηρίου και των μεταλλαγμάτων, παρατηρήθηκε μια πολύ χαρακτηριστική διαφορά. Ο άγριος τύπος όταν καλλιεργήθηκε σε PDA, μείωσε το pH του θρεπτικού υποστρώματος από pH =7 σε pH =3,6, ενώ τα μεταλλαγμένα στελέχη αύξησαν ελαφρά το pH του μέσου σε 7.5 με 8. Συγκρίνοντας στη συνέχεια τα χρωματογραφήματα του αγρίου στελέχους του βακτηρίου *Ps. fluorescens* X1 και των μεταλλαγμένων στελεχών k36, w139, p26, B163, B91 και r48, διαπιστώσαμε τα ακόλουθα. Στο χρωματογράφημα του *Ps. fluorescens* X1 απεικονίζονταν χαρακτηριστικές κορυφές σε χρόνους ανάσχεσης, (RT) 16,32 min (k-1), 23,1 min(k-2), 24,6 min(k-3) και 28,2 min(k-4) οι οποίες απουσίαζαν από όλα τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα των περισσότερων μεταλλαγμένων στελεχών, ή ήταν σημαντικά μικρότερες σε σχέση με τον άγριο τύπο.

Μελετώντας αναλυτικότερα τα αποτελέσματα αυτά, εντοπίστηκαν και άλλες μικρότερες διαφορές στα αντίστοιχα χρωματογραφήματα οι οποίες, όμως, δεν ήταν τόσο χαρακτηριστικές και δεν μελετήθηκαν περισσότερο. Στην εικόνα 3.2. παρουσιάζεται το χρωματογράφημα του εκχυλίσματος του *Ps. fluorescens* X1 (κόκκινο χρώμα) και των μεταλλαγμένων στελεχών p26 και B163.



Εικόνα 3.2 : HPLC ανάλυση του εκχυλίσματος του αγρίου τύπου του *Ps. fluorescens X1* και των μεταλλαγμένων στελεχών ρ26 και B163, με ημιπαρασκευαστική στήλη C18, 5 μm , κιν. φάση: υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,1M (A), μεθανόλη (B) και ακετονιτρίλιο (Γ), ροή κιν. φάσης = 1.8ml / min

Αντίστοιχα ήταν τα αποτελέσματα και για τα υπόλοιπα μεταλλαγμένα στελέχη. Στην εικόνα 3.3. δίνεται η συγκριτική ανάλυση του εκχυλίσματος του *Ps. fluorescens X1* και των μεταλλαγμένων στελεχών B91, K36, W139 και r48.

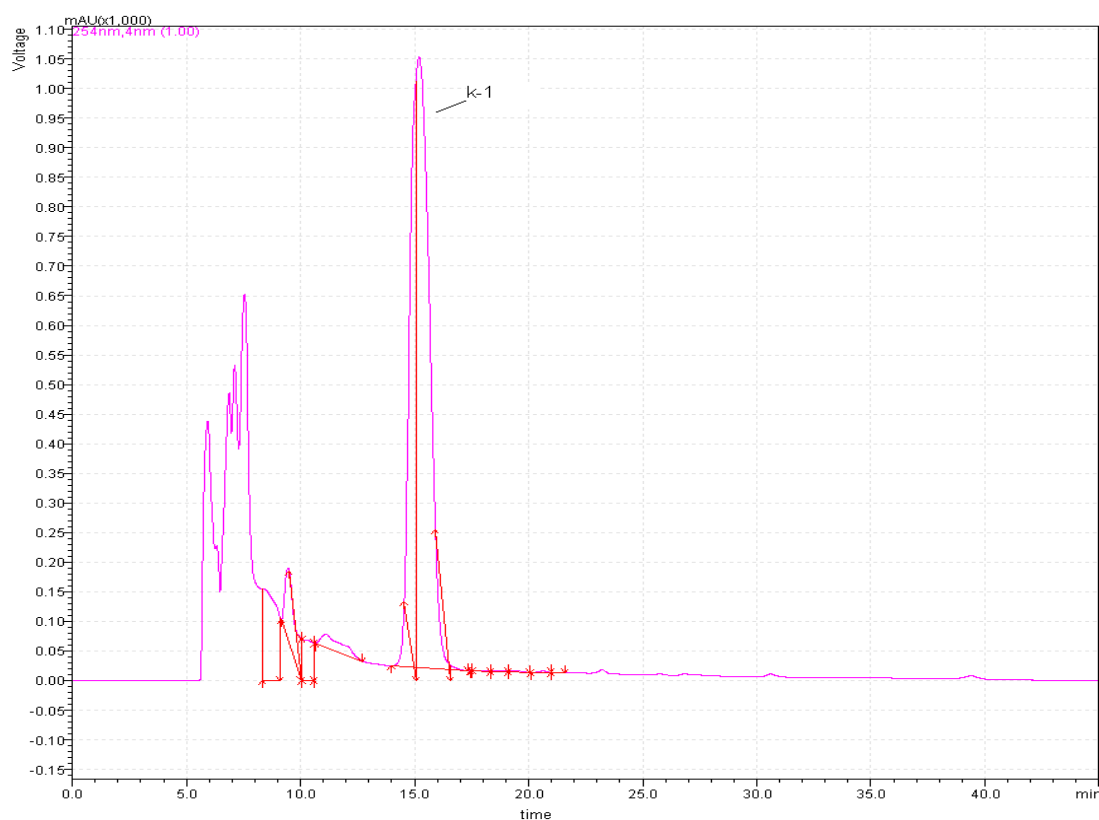


Εικόνα 3.3 : HPLC ανάλυση του εκχυλίσματος του αγρίου τύπου του *Ps. fluorescens* X1 και των μεταλλαγμένων στελεχών B91, K36, W139 και r48 με αναλυτική στήλη C18, 5 μ m, κιν. φάση : υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,1M (Α), μεθανόλη (Β) και ακετονιτρίλιο (Γ), ροή κιν. φάσης = 0.5 ml / min

Η χρωματογραφική ανάλυση του δείγματος του αγρίου τύπου του *Ps. fluorescens* X1, έδωσε ένα χρωματογράφημα αρκετά πολύπλοκο που παρουσίαζε αρκετές διαφορές σε σχέση με τα χρωματογραφήματα των μεταλλαγμένων στελεχών. Το δείγμα αυτό, περιείχε προφανώς ένα πολύ μεγάλο πλήθος από αναλύτες που συνεκχυλίστηκαν μαζί με τις αντιμικροβιακές ουσίες ‘στόχους’ της παρούσας εργασίας. Το επόμενο βήμα, συνεπώς, ήταν ο ‘καθαρισμός’ του αρχικού πλούσιου δείγματος και ο διαχωρισμός του χρωματογραφήματος σε περιοχές ενδιαφέροντος όπου θα μπορούσαν να μελετηθούν ξεχωριστά, σύμφωνα με τη μέθοδο της εκλεκτικής εκχύλισης.

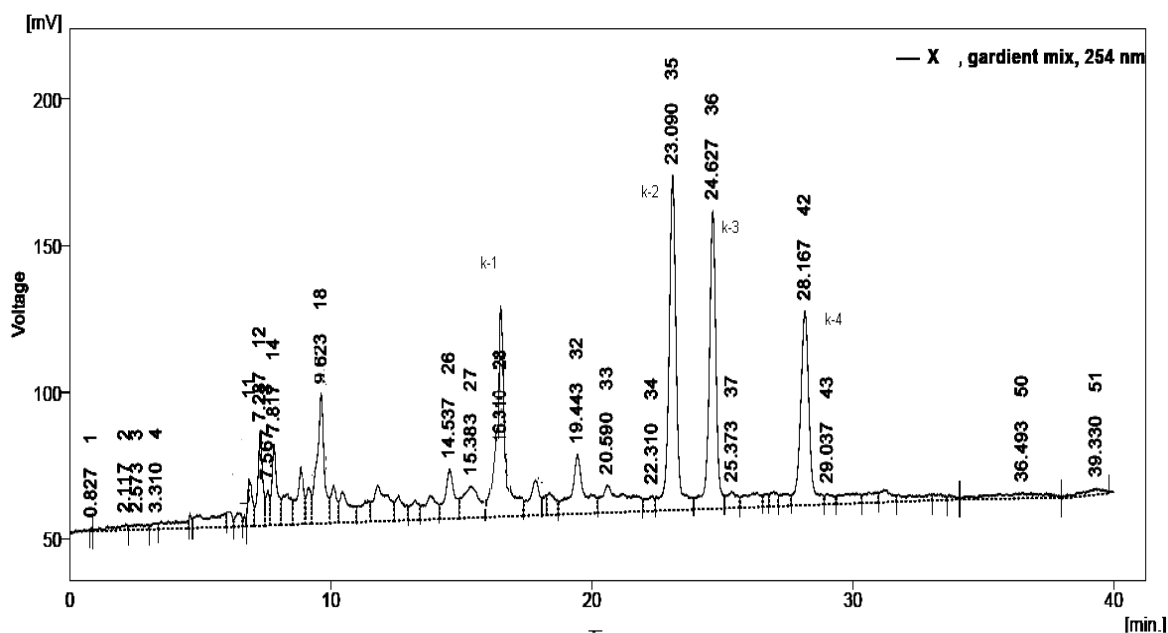
3.2.2. Πορεία εργασίας II.

Το υδατικό συμπύκνωμα από την καλλιέργεια του βακτηρίου *Ps. fluorescens* X1 εκχυλίστηκε διαδοχικά με τους διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας εξάνιο, διχλωρομεθάνιο και οξικό αιθυλεστέρα και σε κάθε ένα από τα λαμβανόμενα εκχυλίσματα πραγματοποιήθηκε μελέτη με βιοδοκιμή. Κατά τη μελέτη αυτή, το εκχύλισμα του κανονικού εξανίου έδωσε αρνητικό αποτέλεσμα και απορρίφθηκε χωρίς να αναλυθεί περαιτέρω. Το εκχύλισμα του διχλωρομεθανίου, όμως, έδωσε μια χαρακτηριστική ζώνη παρεμπόδισης της ανάπτυξης του μύκητα *P. ultimum* και για το λόγο αυτό ακολούθησε η χρωματογραφική του ανάλυση. Στην εικόνα 3.4, δίνονται τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης του εκχυλίσματος του διχλωρομεθανίου. Το δείγμα αυτό, έδωσε ένα πολύ πιο ‘καθαρό’ χρωματογράφημα, απαλλαγμένο από ένα μεγάλο πλήθος κορυφών που εμφανίζονταν κυρίως μετά τα πρώτα δεκαοκτώ λεπτά της ανάλυσης και με κυρίαρχη κορυφή την κορυφή κ-1.



Εικόνα 3.4 : HPLC ανάλυση του εκχυλίσματος του διχλωρομεθανίου του αγρίου τύπου του *Ps. fluorescens* X1 με αναλυτική στήλη C18, 5 μm , κιν. φάση: υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,1M (A), μεθανόλη (B) και ακετονιτρίλιο (Γ), ροή κιν. φάσης = 1.8 ml / min

Αντίστοιχα, μελετήθηκε με βιοδοκιμή το προϊόν της εκλεκτικής εκχύλισης με οξικό αιθυλεστέρα και το αποτέλεσμα της ανάλυσης έδωσε επίσης μια χαρακτηριστική ζώνη παρεμπόδισης. Το δείγμα αναλύθηκε στη συνέχεια χρωματογραφικά. Τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης δίνονται στην εικόνα 3.5.



Εικόνα 3.5 : HPLC ανάλυση του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα του άγριου τύπου του *Ps. fluorescens* X1 με αναλυτική στήλη C18, 5 μ m, κιν. φάση.: υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,1M (Α), μεθανόλη (Β) και ακετονιτρίλιο (Γ), ροή κιν. φάσης = 1.8 ml / min.

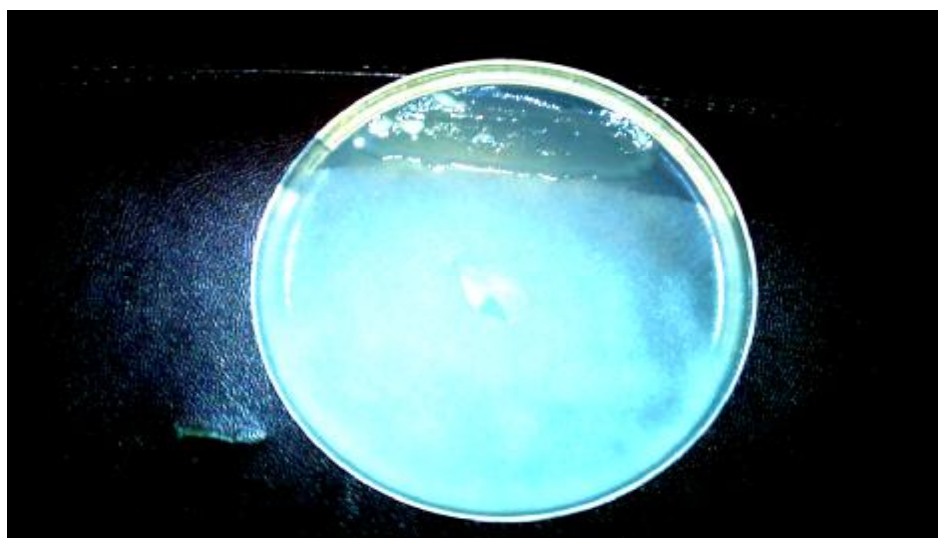
Διαπιστώθηκε ότι το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα έδινε ένα απλούστερο χρωματογράφημα, απαλλαγμένο κυρίως από το πλήθος των αναλυτών που συνεκλούνταν κατά τα πρώτα δέκα λεπτά της ανάλυσης. Στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα απομονώθηκαν και οι τέσσερις χαρακτηριστικές κορυφές κ-1 έως και κ-4.

3.2.3. Ανάλυση εκχυλισμάτων άγριου τύπου και μεταλλαγμάτων από θρεπτικό υλικό PA με RP-HPLC.

Ο άγριος τύπος του βακτηρίου του *Ps. fluorescens* X1 καλλιεργήθηκε επίσης σε θρεπτικό μέσον PA (PDA χωρίς προσθήκη δεξτρόζης) και μετά από επώαση για

πέντε ημέρες στους 28 °C η στερεή καλλιέργεια εκχυλίστηκε σύμφωνα με την παρασκευαστική πορεία εργασίας I. Τέλος, μελετήθηκαν οι ιδιότητες του λαμβανόμενου δείγματος με βιοδοκιμή και ακολούθησε η χρωματογραφική του ανάλυση.

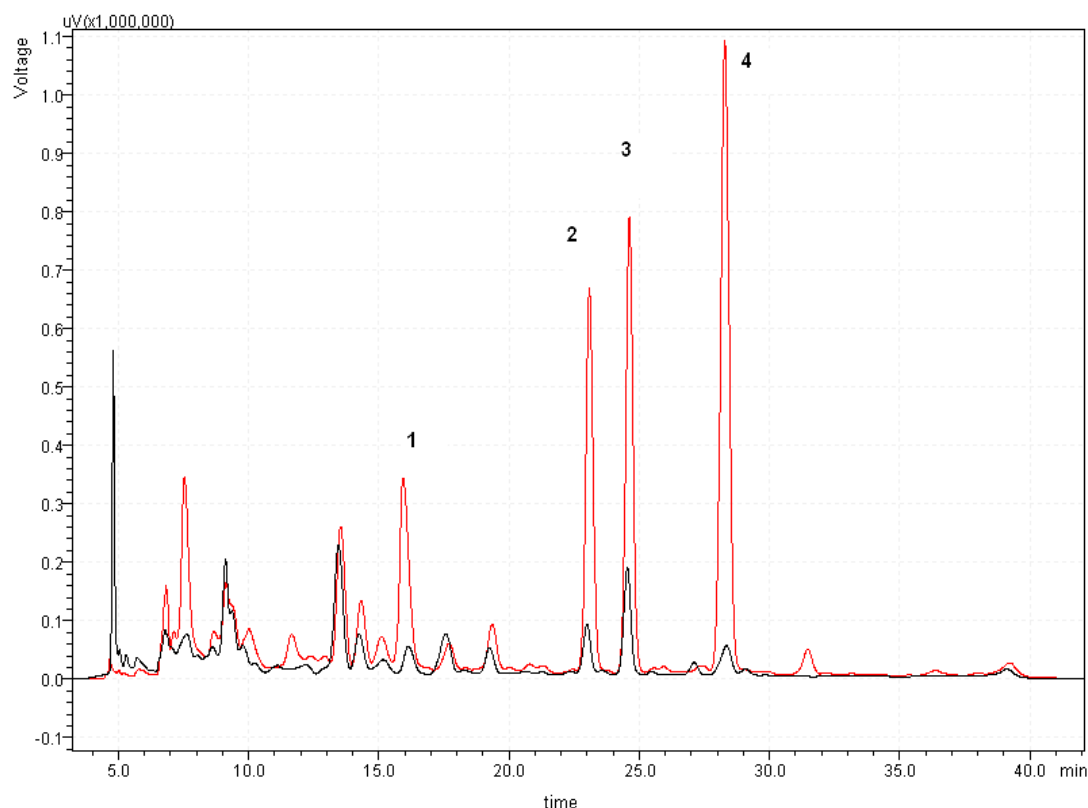
Κατά τη μελέτη με βιοδοκιμή διαπιστώθηκε ότι το δείγμα από την καλλιέργεια σε υλικό απουσία γλυκόζης προκαλούσε σχεδόν μηδενική *in vitro* παρεμπόδιση στη γραμμική ανάπτυξη του μύκητα *P. ultimum*. Συγκεκριμένα αρχικά παρατηρήθηκε πολύ μικρή μείωση της γραμμικής ανάπτυξης του μύκητα στην περιοχή όπου εμβολιάστηκε το εκχύλισμα του PA (Εικ. 3.6), η οποία χάνονταν σταδιακά μέσα σε λίγες ώρες, με τελικό αποτέλεσμα την κανονική ανάπτυξη του μύκητα στο τρυβλίο της βιοδοκιμής. Επιπλέον, το pH της καλλιέργειας του X1 σε PA όταν μετρήθηκε σύμφωνα με την παρασκευαστική πορεία I, βρέθηκε να έχει αυξηθεί σε 7.5 με 8 σε αντίθεση με το pH 3.6 της καλλιέργειας του X1 σε στερεό θρεπτικό μέσον PDA.



Εικόνα 3.6 : *In vitro* παρεμπόδιση της γραμμικής ανάπτυξης του μύκητα *P. ultimum* σε υλικό παρουσία του εκχυλίσματος του αγρίου στελέχους *Ps. fluorescens* X1 που αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσον PA.

Για να εξηγήσουμε τη φύση της επίδρασης της γλυκόζης στην παρεμπόδιση του μύκητα από τον άγριο τύπο, τα εκχυλίσματα του βακτηρίου *Ps. fluorescens* X1 από τα δύο θρεπτικά μέσα αναλύθηκαν χρωματογραφικά. Στην εικόνα 3.7 παρουσιάζεται η συγκριτική ανάλυση των φασμάτων του *Ps. fluorescens* X1 καλλιεργημένο σε PDA

(κόκκινο χρωματογράφημα) και του *Ps. fluorescens* X1 καλλιεργημένο σε PA (μαύρο χρωματογράφημα). Η παραγωγή της κορυφής 1, εξαρτάτο άμεσα από την παρουσία της γλυκόζης στο δείγμα. Σε συγκεντρώσεις γλυκόζης μικρότερες από το 0.06% (ενδογενής ποσότητα γλυκόζης στο PA), η κορυφή 1 δεν παρατηρήθηκε. Αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα για τις κορυφές 2, 3 και 4, οι οποίες απουσία γλυκόζης παρήχθησαν σε εμφανώς μειωμένες συγκεντρώσεις.



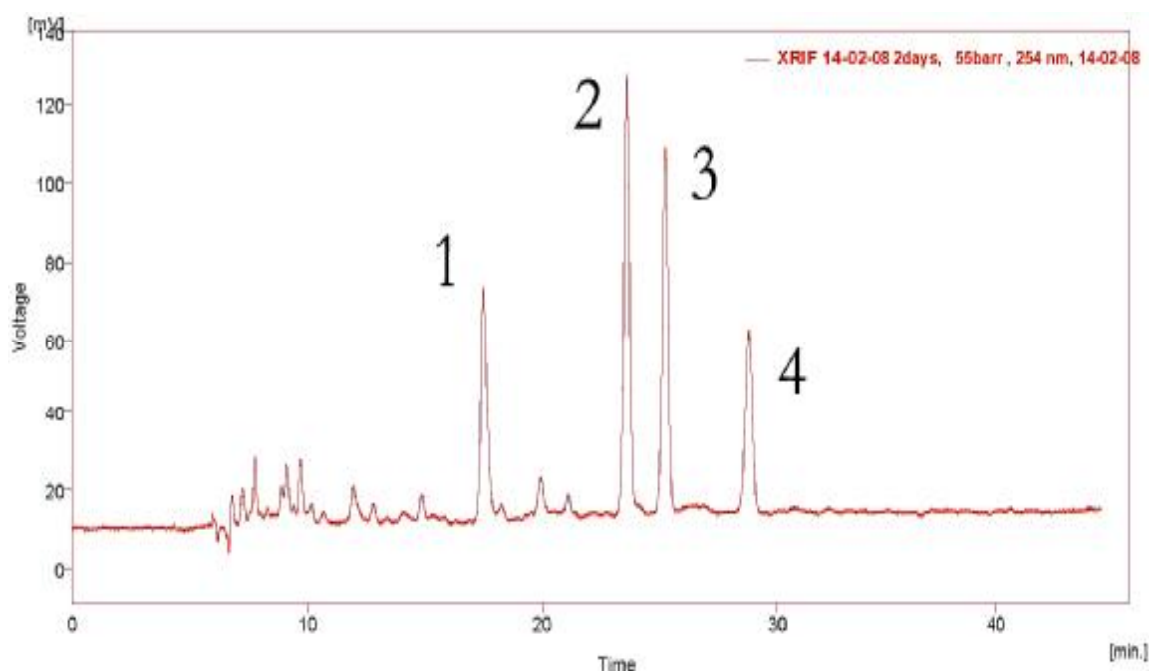
Εικόνα 3.7 : HPLC ανάλυση του εκχυλίσματος του αγρίου τύπου του *Ps. fluorescens* X1 σε θρεπτικό υλικό PDA (κόκκινο χρωματογράφημα) και σε θρεπτικό μέσον PA (μαύρο χρωματογράφημα), με ημιπαρασκευαστική στήλη C18, 5 μm κιν. φάση υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,1M (Α), μεθανόλη (Β) και ακετονιτρίλιο (Γ), ροή κιν. φάσης = 1.8 ml / min.

3.3. Απομόνωση κλασμάτων

3.3.1. Μέθοδος απομόνωσης με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC

Υποθέτοντας ότι κάποια ή κάποιες από τις ουσίες που αντιστοιχούν στις κορυφές 1, 2, 3 και 4 ήταν υπεύθυνες για την αντιμικροβιακή δράση που παρουσίαζε το εκχύλισμα του *Ps. fluorescens* X1, ακολούθησε η απομόνωση των ουσιών αυτών. Η

απομόνωση καθαρών κλασμάτων από κάθε κορυφή και η μελέτη της βιοδραστικής τους ικανότητας *in vitro*, θα μπορούσε να δώσει πληροφορίες σχετικά με τη δράση του κάθε κλάσματος ως προς την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του *P. ultimum*. Η διαδικασία της απομόνωσης πραγματοποιήθηκε στο δείγμα του οξικού αιθυλεστέρα που παραλήφθηκε σύμφωνα με τα παρασκευαστικά της πορείας II, με τη χρήση ημιπαρασκευαστικής στήλης C₁₈, ενώ ο χρόνος κάθε αναλυτικού κύκλου ήταν συνολικά 45 min (παράγραφος 2.7.1.).



Εικόνα 3.8 : Χρωματογραφική ανάλυση του εκχυλίσματος του άγριου τύπου του *Ps. fluorescens* X με ημιπαρασκευαστική στήλη C₁₈, κιν. φάση υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,1M (Α), μεθανόλη (Β) και ακετονιτρίλιο (Γ), ροή κιν. φάσης = 1.8 ml / min, θερμοκρασία στήλης 40 °C.

Μελετώντας το χρωματογράφημα του εκχυλίσματος του *Ps. fluorescens* X1 παρατηρήσαμε ότι οι κορυφές 2 και 3 (Εικ. 3.8) βρίσκονταν σε πολύ κοντινούς χρόνους ανασχεσης με $RT_2 = 23.1$ min και $RT_3 = 24.6$ min, γεγονός που θα μπορούσε να επηρεάσει την καθαρότητα των συλλεχθέντων κλασμάτων κατά τη διαδικασία της απομόνωσης και να καταστήσει τη μέθοδο που επιλέξαμε αναποτελεσματική. Για το λόγο αυτό, πριν ξεκινήσει η διαδικασία της απομόνωσης υπολογίστηκε η διαχωριστική ικανότητα R, των κορυφών 2 και 3.

Ο υπολογισμός της διαχωριστικής ικανότητας R των κορυφών 2 και 3 έγινε με βάση τον τύπο:

$$R=2(tR_2- tR_3)/W_2+W_3 (1)$$

όπου tR_2 και tR_3 ήταν οι χρόνοι ανάσχεσης των ουσιών 2 και 3, ενώ W_2 και W_3 ήταν το εύρος των κορυφών 2 και 3 αντίστοιχα. Τιμή του R μικρότερη από $R < 1.2$ θα έδινε έναν κακό διαχωρισμό, ενώ ένας ικανοποιητικός διαχωρισμός θα έπρεπε να έχει τιμή $1.2 < R < 1.5$. (Snyder *et al.*, 1979). Με εφαρμογή του τύπου (1) και για εύρος $W_1 = W_2 = 0.5$ cm, προέκυψε ότι $R = 1.4$. Η διαχωριστική ικανότητα των κορυφών κρίθηκε ικανοποιητική και η διαδικασία της απομόνωσης ολοκληρώθηκε λαμβάνοντας περίπου 5 mg από κάθε κορυφή, κ-1, κ-2, κ-3 και κ-4.

3.3.2. Μέθοδος απομόνωσης με Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας TLC.

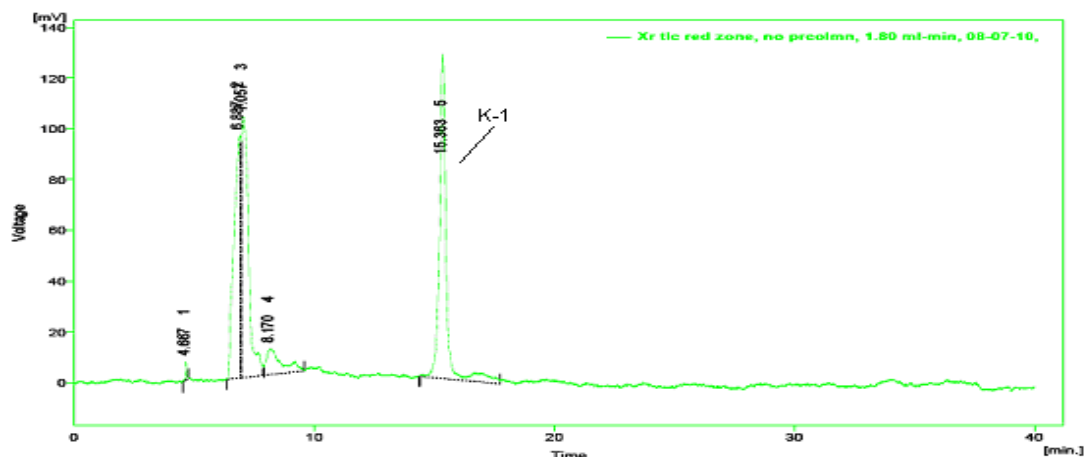
Τόσο το εκχύλισμα του διχλωρομεθανίου όσο και το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα από το βακτηρίο *Ps. fluorescens* X1 αναλύθηκαν στη συνέχεια με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Από την ανάλυση του δείγματος του διχλωρομεθανίου σε σύστημα διαλυτών χλωροφορμίου : μεθανόλης 80:20, διαπιστώθηκε η παρουσία μιας λεπτής ζώνης με συντελεστή ανάσχεσης, $R_f = 0.35$, που εμφάνιζε έντονο κόκκινο χρώμα υπό το φως της λάμπας UV μήκους κύματος 254 nm.

Αντίστοιχα, παρασκευάστηκε και αναλύθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας εκχύλισμα από το μεταλλαγμένο στέλεχος k36. Το εκχύλισμα του διχλωρομεθανίου από το k36 αναπτύχθηκε σε σύστημα διαλυτών χλωροφορμίου: μεθανόλης 80:20, χωρίς όμως να διαπιστωθεί η παρουσία της ζώνης με συντελεστή ανάσχεσης, $R_f = 0.35$.

Η ζώνη αυτή η οποία απουσίαζε από το μεταλλαγμένο στέλεχος k36, απομονώθηκε και μελετήθηκε με βιοδοκιμή στο φυτοπαθογόνο μύκητα *P. ultimum*, όπου και διαπιστώθηκε ότι προκαλούσε έντονα συμπτώματα αντιμικροβιακής δράσης.

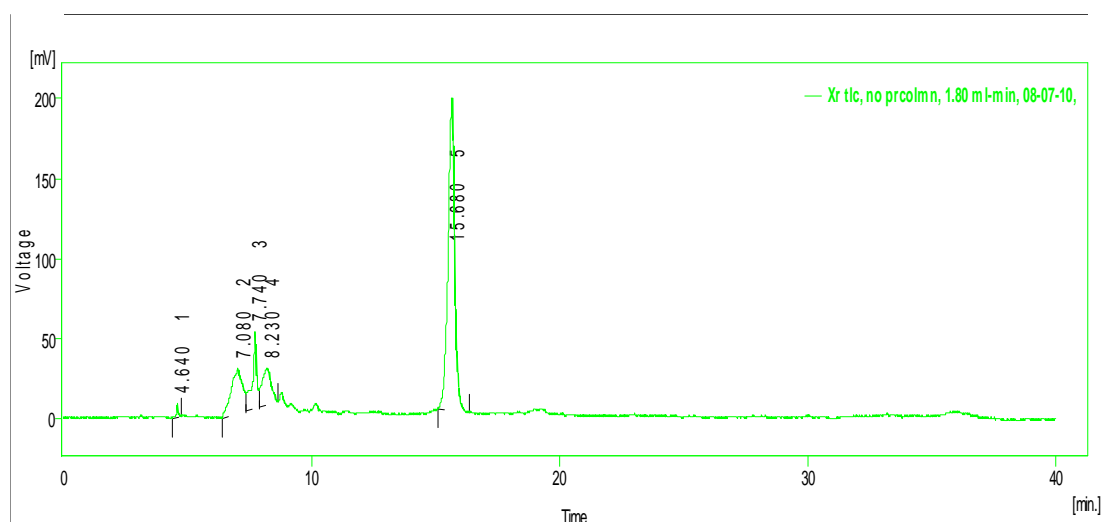
Το δείγμα αυτό στη συνέχεια αναλύθηκε με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν μεταξύ

άλλων την παρουσία μιας κορυφής που εμφανίζονταν στο χρόνο ανάλυσης της κορυφής κ-1 (εικόνα 3.9).



Εικόνα 3.9 : Χρωματογραφική ανάλυση ζώνης TLC που απομονώθηκε από το δείγμα του διχλωρομεθανίου, με αναλυτική στήλη C_{18} , κιν. φάση : υδατικό διάλυμα οξικού οξέως 0,1M (Α), μεθανόλη (Β) και ακετονιτρίλιο (Γ), ροή κιν. φάσης = 1.8 ml / min, θερμοκρασία στήλης 40 °C.

Η κορυφή αυτή απομονώθηκε περαιτέρω με τη μέθοδο της ημιπαρασκευαστικής χρωματογραφίας όπως περιγράφεται στην προηγούμενη παράγραφο. Το δείγμα που προέκυψε, αναλύθηκε στη συνέχεια χρωματογραφικά. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης δίνονται στην εικόνα 3.10.



Εικόνα 3.10 : Χρωματογραφική ανάλυση δείγματος TLC διχλωρομεθανίου που καθαρίστηκε με ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία., με αναλυτική στήλη C_{18} , κιν. φάση υδατικό διάλυμα οξικού οξέως 0,1M (Α), μεθανόλη (Β) και ακετονιτρίλιο (Γ), ροή κιν. φάσης. = 1.8 ml / min, θερμοκρασία στήλης 40 °C.

Το δείγμα στη συνέχεια αναλύθηκε με την τεχνική APCI-MS, και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κορυφή σε χρόνο ανάλυσης $RT=15,7$ min ήταν ταυτόσημη με την χαρακτηριστική κορυφή κ-1 (παραπομπή στη παράγραφο και γράφημα όπου αναφέρεται η κ-1 για πρώτη φορά). Συγκεκριμένα, η κορυφή που ταυτοποιήθηκε έδινε το ίδιο φάσμα απορρόφησης με αυτό της κ-1, εμφανίζονταν στον ίδιο σχετικό χρόνο ανάλυσης καθώς και το ίδιο φάσμα θραυσματοποίησης. Συμπερασματικά, ακολουθώντας τη μεθοδολογία της παρασκευαστικής TLC κατορθώσαμε να απομονώσουμε το ίδιο δείγμα με διαφορετικό τρόπο. Ωστόσο, με τη δεύτερη μέθοδο η ποσότητα που απομονώναμε σε κάθε TLC ήταν πολύ μικρή, ελάχιστα ng, σε σχέση με την ποσότητα του συνολικού δείγματος που χρησιμοποιούσαμε (περίπου 8-10 mg/ TLC πλάκα). Η ποσότητα αυτή στη συνέχεια, έπρεπε να καθαριστεί με τη μέθοδο της ημιπαρασκευαστικής χρωματογραφίας, με αποτέλεσμα από τη συνολική διαδικασία να παραληφθεί κλάσμα ποσότητας μόλις 2 mg.

Ακολούθησε η ανάλυση με TLC του δείγματος του *Ps. fluorescens* X1 σε οξικό αιθυλεστέρα που είχε προηγουμένως παραληφθεί σύμφωνα με τα παρασκευαστικά της πορείας εργασίας II. Από την ανάπτυξη του δείγματος αυτού σε σύστημα διαλυτών χλωροφορμίου : μεθανόλη 80:20, διαπιστώθηκε η παρουσία αρκετών ζωνών. Αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση του μεταλλάγματος k36, που είχε εκχυλιστεί με οξικό αιθυλεστέρα σύμφωνα με την πορεία εργασίας II, όπου και διαπιστώθηκε και πάλι η παρουσία ενός πλήθους ζωνών. Για τον ευκρινέστερο εντοπισμό των ζωνών οι πλάκες ψεκάστηκαν με εμφανιστικό διάλυμα από p-ανισαλδεύδη, θειικό και οξικό οξύ σε αιθανόλη.

Από τη μελέτη των πλακών TLC διαπιστώθηκε ότι οι ζώνες που εμφανίζονταν δεν ήταν αρκετά διαχωρισμένες μεταξύ τους, με αποτέλεσμα να καθίσταται δύσκολη η απομόνωση και μελέτη κάθε μιας χωριστά. Για το λόγο αυτό η αναλογία στο σύστημα ανάπτυξης των διαλυτών τροποποιήθηκε. Σε κάθε δοκιμή αυξάνονταν διαδοχικά η ποσότητα του άπολου διαλύτη ώστε να καταλήξουμε τελικά σε ένα σύστημα χλωροφορμίου : μεθανόλης 84 : 16. Με τη βοήθεια του συστήματος αυτού απομονώθηκε η ζώνη Qa (μπλε ζώνη στο uv), σε $R_f= 0.78$, και μελετήθηκε η αντιμικροβιακή της δράση στο φυτοπαθογόνο μύκητα *P. ultimum*. Όπως διαπιστώθηκε, η ζώνη Qa παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση.

Με παρόμοιο τρόπο όπως και ο άγριος τύπος του *Ps. fluorescens* X1 , παρασκευάστηκε και αναλύθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, το μεταλλάγμα k36 σε οξικό αιθυλεστέρα. Κατά την TLC ανάλυση του μεταλλαγμένου στελέχους σε σύστημα διαλυτών χλωροφορμίου : μεθανόλης 84 : 16, εντοπίστηκαν και πάλι μια σειρά από αρκετές ζώνες που δεν ήταν επαρκώς διαχωρισμένες μεταξύ τους όπως και στον άγριο τύπο. Ωστόσο κατά τη συγκριτική ανάλυση των TLC αποτελεσμάτων του αγρίου δείγματος και του μεταλλάγματος k36, στην TLC του μεταλλαγμένου στελέχους δεν εντοπίστηκε η ζώνη Qa (μπλε ζώνη στο υν), σε $R_f = 0.78$.

Το κλάσμα αυτό ακολούθως αναλύθηκε χρωματογραφικά με HPLC, όπου και διαπιστώθηκε ότι δεν επρόκειτο για κάποιο από τα γνωστά κλάσματα κ-1, κ-2, κ-3 και κ-4. Για το λόγο αυτό η μελέτη του παρουσιάζεται χωριστά στην παράγραφο 3.5..

3.4. Χαρακτηρισμός δομής αντιμικροβιακών ενώσεων

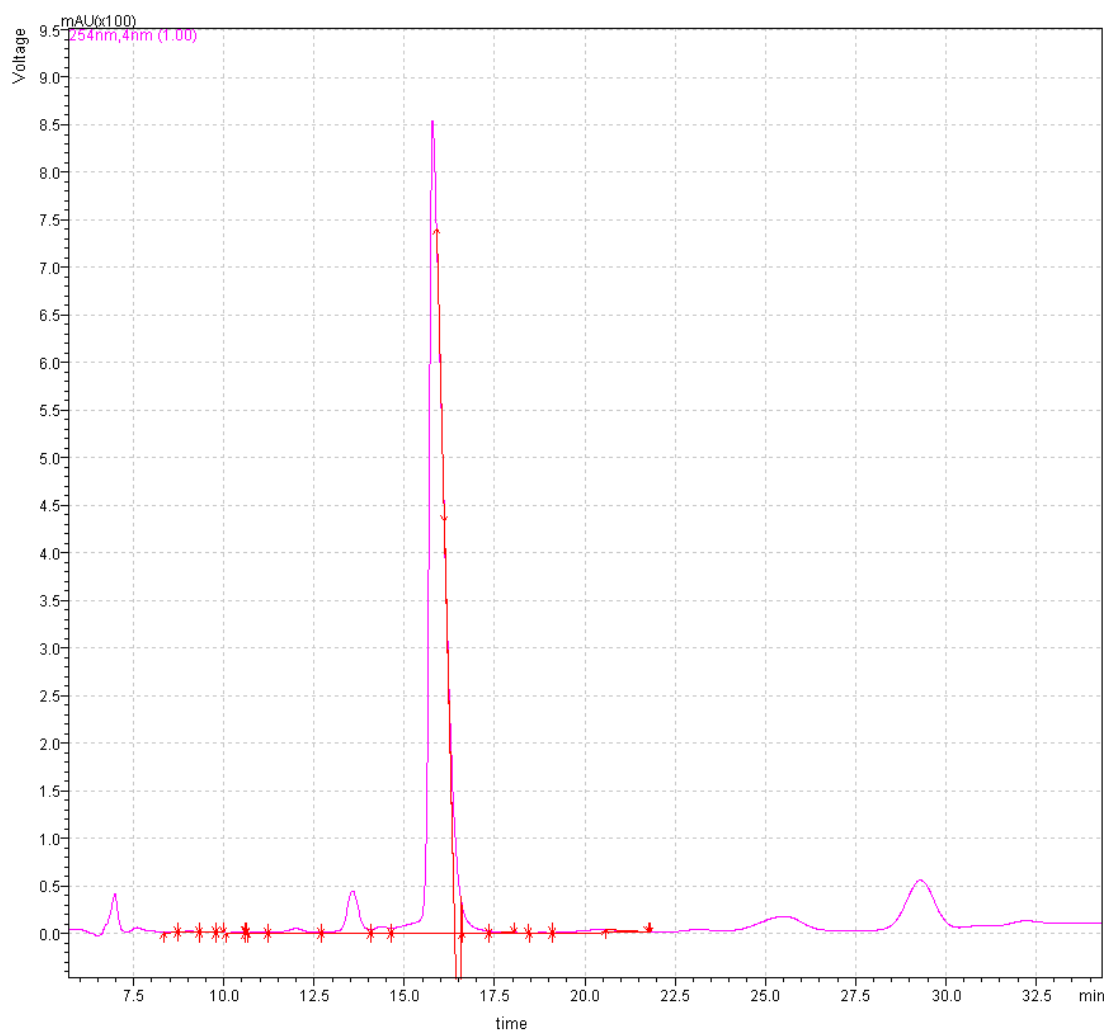
Προκειμένου να βρεθεί η δομή, αλλά και να απαντηθεί το ερώτημα εάν οι απομονωθείσες ουσίες αντιστοιχούν σε ήδη γνωστές αντιμικροβιακές ενώσεις που παράγουν τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* ή πρόκειται για νέες, μη χαρακτηρισμένες αντιμικροβιακές ενώσεις, ακολούθησε ο χαρακτηρισμός της δομής των τριών κλασμάτων κ-1, κ-2 και κ-3 καθώς και του κλάσματος Qa. Το τέταρτο κλάσμα, κ-4, δεν εμφάνιζε αντιμικροβιακή δράση. Ωστόσο κρίθηκε σκόπιμος ο χαρακτηρισμός του, επειδή η παρουσία του εκτιμήθηκε ότι μπορεί να σχετίζεται με κάποιο τρόπο με την παρουσία των υπολοίπων κλασμάτων.

Ο χαρακτηρισμός της δομής έγινε με συνδυασμό των τεχνικών της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συνδυασμένη με φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού και φασματομετρία μαζών (HPLC-UV-Vis-MS), με υπέρυθη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR), με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (GC-MS) και με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR).

3.4.1. Χαρακτηρισμός δομής των κλασμάτων κ-1, κ-2 κ-3 και κ-4

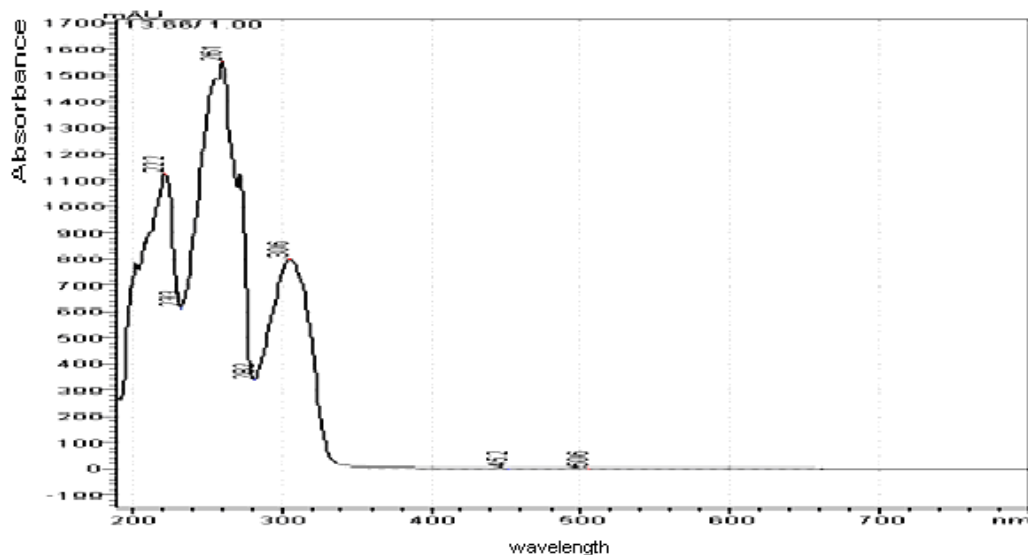
- Χαρακτηρισμός κορυφής κ-1

Η πρώτη κύρια κορυφή εμφανίστηκε σε χρόνο ανάσχεσης $RT=16.3$ min. Στην εικόνα 3.11 παρουσιάζεται η χρωματογραφική ανάλυση της κορυφής κ-1 μετά την απομόνωση της από το εκχύλισμα του αγρίου τύπου του βακτηρίου, με τη χρήση της ημιπαρασκευαστικής στήλης C-18.



Εικόνα 3.11 : Χρωματογραφική ανάλυση του κλάσματος κ-1 με αναλυτική στήλη $C_{18}, 5 \mu m$, κιν. φάση: υδατικό διάλυμα οξικού οξέως $0,1M$ (A), μεθανόλη (B) και ακετονιτρίλιο (Γ), ροή . φάση = $1.8 ml / min$, θερμοκρασία στήλης $40 \text{ }^\circ C$, μήκος κύματος $\lambda = 254 nm$.

Το φάσμα απορρόφησης του κλάσματος αυτού έδωσε τρία χαρακτηριστικά μέγιστα σε μήκη κύματος $\lambda_1 = 222 nm$, $\lambda_2 = 261 nm$ και $\lambda_3 = 306 nm$ (Εικ. 3.12).



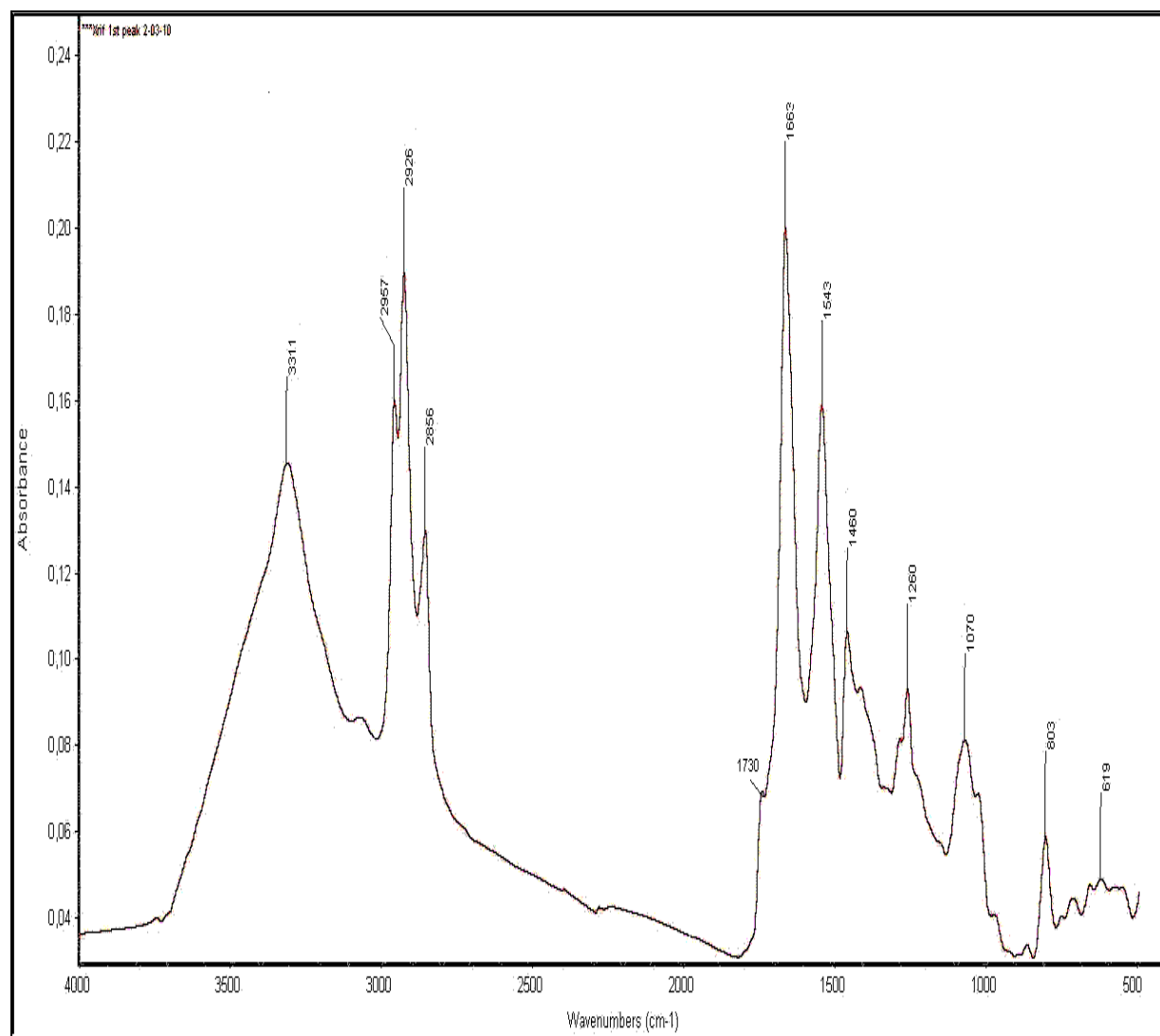
Εικόνα 3.12. : Φάσμα απορρόφησης κλάσματος κ-1

Το φάσμα FT-IR ($4000-600\text{cm}^{-1}$) του εκχυλίσματος κ-1 δίνεται στην εικόνα 3.13. Το φάσμα αυτό παρουσίασε έντονη απορρόφηση στις τρεις χαρακτηριστικές περιοχές του υπερόυθρου. Η πρώτη χαρακτηριστική περιοχή του φάσματος (Περιοχή I, $4000-1750\text{ cm}^{-1}$) διαμορφώνεται κυρίως από τις απορροφήσεις των υδρογονανθρακικών αλυσίδων του μορίου, οι οποίες έχουν αποδοθεί στις δονήσεις τάσης δεσμών άνθρακα-υδρογόνου. Στην παρούσα μελέτη, οι κορυφές που παρατηρήθηκαν στα $3500-3300\text{ cm}^{-1}$ αποδόθηκαν σε δονήσεις τάσης ομάδων υδροξυλίου (-OH) ή σε απορρόφηση της αμινομάδας (-NH₂-), των πρωτοταγών αμινών. Οι κορυφές που παρατηρήθηκαν στα 2957 cm^{-1} και στα 2925 cm^{-1} οφείλονταν σε ασύμμετρες δονήσεις τάσης των δεσμών άνθρακα-υδρογόνου των μεθυλίων (-CH₃) και των μεθυλενομάδων (>CH₂) αντίστοιχα, ενώ οι κορυφές στα $\sim 2860\text{ cm}^{-1}$ στις συμμετρικές δονήσεις των ίδιων ομάδων (Socrates 1997, Mc Murry, 2004).

Η δεύτερη περιοχή του φάσματος (Περιοχή II, $1750-800\text{ cm}^{-1}$) περιλαμβάνει την απορρόφηση των χαρακτηριστικών ομάδων ($1750 - 1500\text{ cm}^{-1}$) και την περιοχή των ‘δακτυλικών αποτυπωμάτων’ που εκτείνεται έως και τα 800cm^{-1} . Στο φάσμα του αγνώστου κλάσματος κ-1 παρατηρήθηκαν δύο έντονες απορροφήσεις στα 1663 cm^{-1} και στα 1544 cm^{-1} . Η πρώτη είναι χαρακτηριστική για τους αμιδικούς δεσμούς I και προκύπτει από τη δόνηση τάσης του δεσμού >C=O και από τη δόνηση κάμψης του δεσμού C-N (Zoumproulou *et al.*, 2010). Η δεύτερη είναι χαρακτηριστική για τους αμιδικούς δεσμούς II και προκύπτει από τη δόνηση κάμψης του δεσμού N-H και από

τη δόνηση τάσης του δεσμού C-N. (Ζουμπρούλου *et al.*, 2010, Βαλαβανίδης, 2008, George *et al.*, 1987).

Η κορυφή στα 1460 cm^{-1} αποδόθηκε κυρίως σε ασύμμετρες δονήσεις παραμόρφωσης των δεσμών άνθρακα-υδρογόνου των μεθυλίων και των μεθυλενομάδων, ενώ η κορυφή στα 1400 cm^{-1} συνδέθηκε με τις συμμετρικές δονήσεις παραμόρφωσης των ίδιων δεσμών. Επίσης, μια ισχυρή δόνηση στα 1260 cm^{-1} αποδόθηκε σε δονήσεις τάσης της ομάδας $(-\text{C}[\text{O}]-\text{O}-)$ στους αλειφατικούς εστέρες, ενώ η μέτριας έντασης απορρόφηση στα 1070 cm^{-1} συνδέθηκε με δονήσεις τάσης της ομάδας $(-\text{O}-\text{CH}_2-)$ στους αλειφατικούς εστέρες (Erukhimovitch *et al.* 2005). Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύθηκαν και από την παρουσία ενός ώμου στα 1730 cm^{-1} που είναι ενδεικτικός της τάσης του καρβονυλίου στους αλειφατικούς εστέρες (Πίν. 3.3.).



Εικόνα 3.13 : Χαρακτηριστικό φάσμα FT-IR του κλάσματος κ-1. Η περιοχή $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$ χωρίζεται σε τρεις ενδιακριτές περιοχές ($4000 - 1750\text{ cm}^{-1}$, $1750 - 800\text{ cm}^{-1}$ και $800 - 400\text{ cm}^{-1}$).

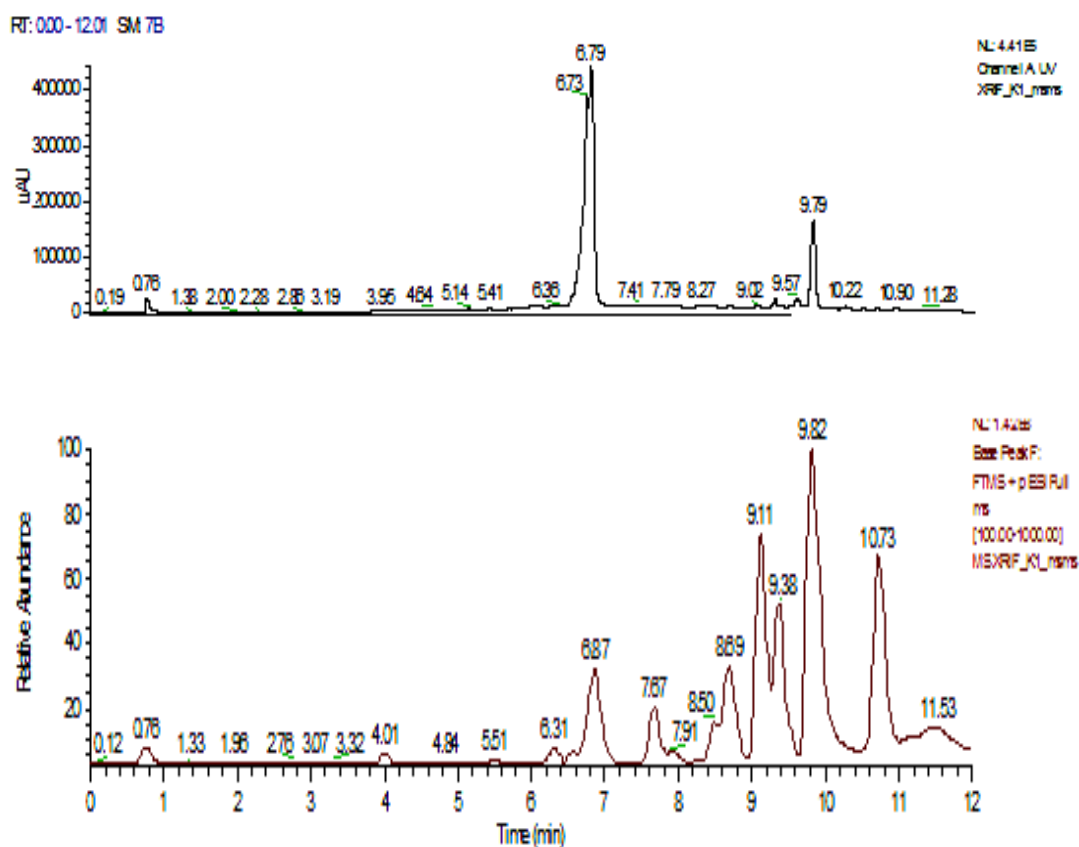
Πίνακας 3.3. Απόδοση κορυφών, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία

Κυματαριθμοί (cm⁻¹)	Απόδοση	Βιβλιογραφία
3500 - 3300	Δόνηση τάσης υδροξυλίου (-OH) ή αμινομάδας (-NH ₂) στις πρωτοταγείς αμίνες.	Socrates 1997, Mc Murry, 2004 Ταραντίλης & Πολυσίου 2008
2975 -2957	Ασύμμετρες δονήσεις τάσης των δεσμών άνθρακα-υδρογόνου των μεθυλενίων και μεθυλίων (-CH ₂ -, -CH ₃)	Socrates 1997, Mc Murry, 2004 Ταραντίλης & Πολυσίου 2008
2940 -2926	Ασύμμετρες δονήσεις τάσης των δεσμών άνθρακα-υδρογόνου των μεθυλενομάδων (>CH ₂)	Socrates 1997, Mc Murry, 2004 Ταραντίλης & Πολυσίου 2008
2885 -2850	Συμμετρικές δονήσεις τάσης των δεσμών άνθρακα-υδρογόνου των μεθυλίων (-CH ₃)	Socrates 1997, Mc Murry, 2004 Ταραντίλης & Πολυσίου 2008
2870 -2845	Συμμετρικές δονήσεις τάσης των δεσμών άνθρακα-υδρογόνου των μεθυλενομάδων (>CH ₂)	Socrates 1997, Mc Murry, 2004 Ταραντίλης & Πολυσίου 2008
1730	Δόνηση τάσης καρβονυλίου στους εστέρες	Mc Murry, 2004
1663	Αμίδιο I (τάση των CO και CN, κάμψη NH)	Βαλαβανίδης, 2008 George B & McIntyre P, 1987
1543	Αμίδιο II (κάμψη NH, τάση CN)	Βαλαβανίδης, 2008 George B & McIntyre P, 1987
1460	Ασύμμετρες δονήσεις παραμόρφωσης των δεσμών άνθρακα-υδρογόνου των μεθυλίων	Mc Murry, 2004 Βαλαβανίδης, 2008
1260	Ισχυρή δονήση τάσης της ομάδας -C[O]-O- στους αλειφατικούς εστέρες.	Mc Murry, 2004 Βαλαβανίδης, 2008 Erukhimovitch <i>et al.</i> 2005
1070	Μετρίως έντασης απορρόφηση από δονήσεις τάσης της ομάδας -O-CH ₂ - στους αλειφατικούς εστέρες.	Mc Murry, 2004 Βαλαβανίδης, 2008

Η UHPLC ανάλυση του κλάσματος κ-1 (Εικ. 3.14), έδειξε ότι η κορυφή αυτή δεν αντιστοιχούσε σε έναν μόνο αναλύτη, αλλά υπήρχε σχάση της απλής κορυφής σε δυο κορυφές με πολύ κοντινούς χρόνους ανάσχεσης RT= 6.79 min και RT= 6.73 min. Η κορυφή σε χρόνο ανάσχεσης RT= 6.73 min εμφάνιζε μοριακό ιόν [M+H]⁺

=237.1090 και κατά τη στοιχειακή ανάλυση του δείγματος του αποδόθηκε ο πιθανός μοριακός τύπος $C_8H_{17}N_2O_6$ (Εικ. 3.15). Αντίστοιχα η κορυφή που εμφανιζόταν σε χρόνο ανάσχεσης $RT= 6.79$ min εμφάνιζε μοριακό ιόν $[M+H]^+ = 206.0440$ και σε αυτήν αποδόθηκε ο πιθανός μοριακός τύπος $C_8H_6O_3N_4$ (Εικ. 3.16).

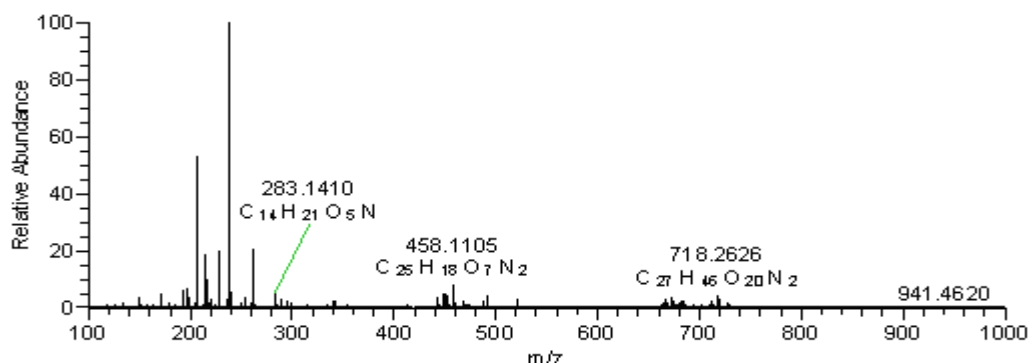
Παράλληλα με τη διπλή κορυφή, εμφανίστηκαν και άλλες χαρακτηριστικές κορυφές σε χρόνους ανάσχεσης $RT= 8.69$ min, 9.11 min, 9.38 min, 9.82 min και 10.73 min, οι οποίες σύμφωνα με τα φάσματα μάζας τους ενδέχεται να αντιστοιχούν κατά κύριο λόγο σε λιπίδια. Η παρουσία των λιπιδίων δεν θεωρήθηκε αδικαιολόγητη, διότι τα λιπίδια απαντώνται στις κυτταρικές μεμβράνες των βακτηρίων και αυτά περιήλθαν στο δείγμα, συνεκχυλίστηκαν με τις αντιμικροβιακές ενώσεις και συμπαρασύρθηκαν στη στήλη χρωματογραφίας κατά την απομόνωση μαζί με τα συλλεχθέντα κλάσματα.



Εικόνα 3.14 : Χρωματογραφική ανάλυση κλάσματος κ-1 με αναλυτική τύπου Hypersil GOLD, 50×2.1 mm, $1.9 \mu m$, κιν. φάση υδατικό διάλυμα φορμικού οξέος 0.1 % (A) και μεθανόλη (B), ροή κιν. φάσης = $200 \mu l/min$

m/z	Theo. Mass	Delta (mmu)	RDB equiv. Composition
237.1091	237.1087	0.43	7.0 C8 H17 O6 N2
	237.1073	1.77	2.0 C6 H15 O5 N5
	237.1113	-2.25	6.0 C11 H15 O3 N3
	237.1154	-6.27	10.0 C16 H15 O N
	237.1014	7.64	11.0 C13 H11 N5
	237.1001	8.98	6.0 C12 H15 O4 N
	237.1186	-9.46	2.0 C5 H15 O4 N7
	237.0974	11.67	7.0 C8 H11 O2 N7
	237.1212	-12.15	1.0 C9 H19 O6 N
	237.0961	13.00	2.0 C7 H15 O6 N3

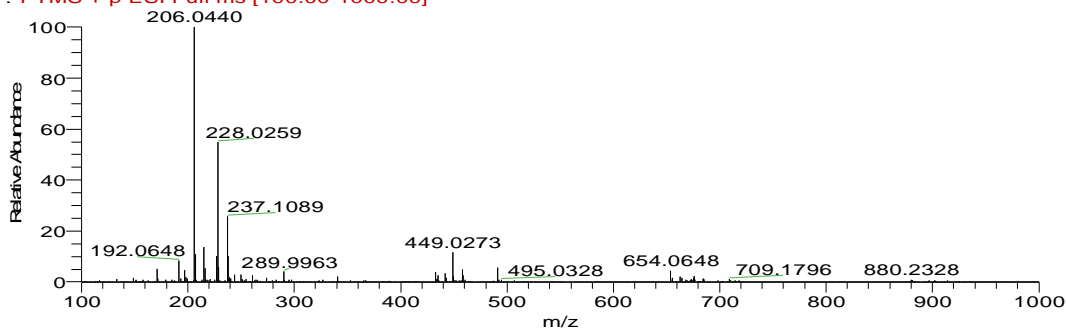
XRIF K1 msms #1249 RT: 6.76 AV: 1 NL: 2.66E7
 F: FTMS + p ESI Full ms [100.00-1000.00]
 237.1090



Εικόνα 3.15 : ESI(+)-HRMS φάσμα μάζας του κλάσματος κ-1 , με μοριακό ιόν [M+H]⁺
 =237.1090

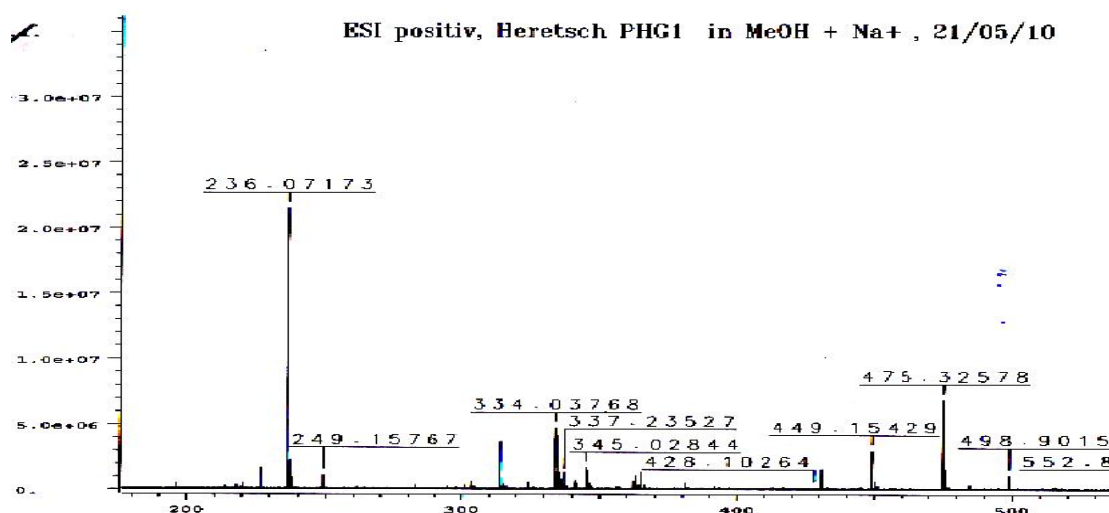
m/z	Theo. Mass	Delta (mmu)	RDB equiv. Composition
206.0441	206.0440	0.14	8.0 C8 H6 O3 N4
	206.0427	1.48	3.0 C7 H10 O7
	206.0413	2.83	9.0 C4 H2 O N10
	206.0480	-3.88	12.0 C13 H6 O N2
	206.0400	4.16	4.0 C3 H6 O5 N6
	206.0386	5.50	-1.0 C2 H10 O9 N2
	206.0499	-5.73	-1.0 C H10 O8 N4
	206.0512	-7.07	4.0 C2 H6 O4 N8
	206.0368	7.35	12.0 C14 H6 O2
	206.0539	-9.76	3.0 C6 H10 O6 N2

XRIF_K1_msms #1269 RT: 6.84 AV: 1 NL: 4.72E7
 F: FTMS + p ESI Full ms [100.00-1000.00]



Εικόνα 3.16 : ESI(+)-HRMS φάσμα μάζας του κλάσματος κ-1 , με μοριακό ιόν [M+H]⁺
 =206.0440

Ωστόσο, παρόμοια ανάλυση του δείγματος κ-1 που είχε προηγουμένως απομονωθεί με συνδυασμό των τεχνικών της TLC και ημιπαρασκευαστική HPLC, έδωσε λίγο καλλίτερα αποτελέσματα (Εικ. 3.17). Στο δείγμα αυτό η κύρια κορυφή που ταυτοποιήθηκε εμφανίστηκε πιο καθαρή με μοριακό ιόν $[M]^+ = 236.07173$.

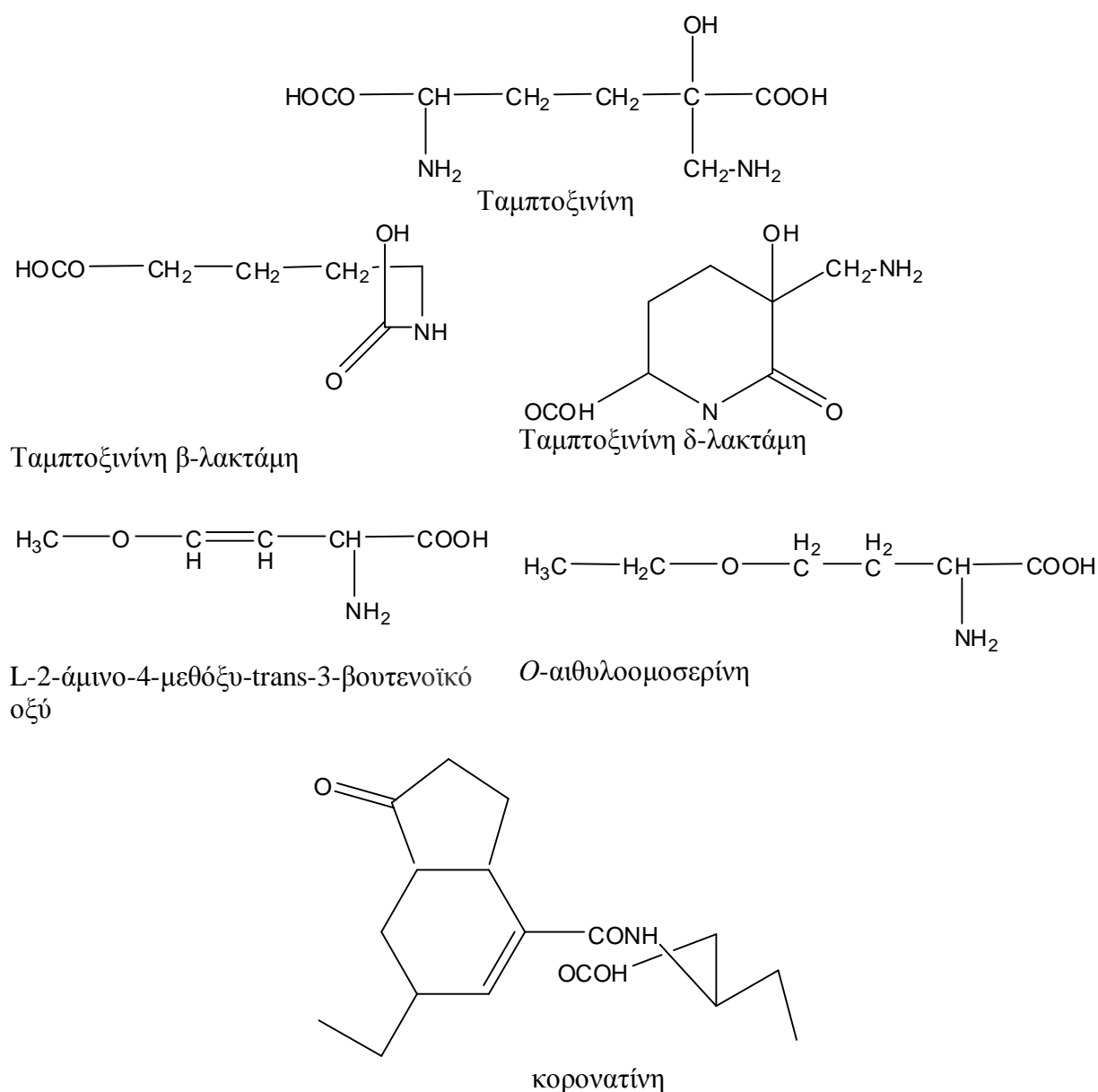


Εικόνα 3.17 : ESI(+)-HRMS φάσμα μάζας του κλάσματος κ-1 , με μοριακό ιόν $[M]^+ = 236.07173$

Το δείγμα αυτό στη συνέχεια ποσότητας 2 mg αναλύθηκε στη συνέχεια και με την τεχνική ^1H NMR (παράρτημα). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης ωστόσο δεν ήταν σαφή και ικανοποιητικά καθώς η ποσότητα του δείγματος που αναλύθηκε ήταν πολύ μικρή.

Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης με τις παραπάνω τεχνικές δεν προέκυψε η παρουσία αρωματικού δακτυλίου στην ένωση που απομονώθηκε. Επιπλέον, τα δεδομένα της FT-IR ανάλυσης αποκάλυψαν την παρουσία ομάδων αμιδίου, καθώς και παρουσία καρβοξυλομάδας στο μόριο της άγνωστης αντιμικροβιακής ένωσης. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη UHPLC-MS ανάλυση πιθανότατα παραπέμπει σε μόριο μικρού μοριακού βάρους, ενδεχομένως σε κάποιο πεπτίδιο ή αμινοξύ. Από τη βιβλιογραφία είναι ήδη καταγεγραμμένες αρκετές τέτοιες περιπτώσεις μορίων που παράγονται από βακτήρια του γένους *Pseudomonas* και εκδηλώνουν αντιμικροβιακή δράση (Εικ. 3.18). Τα μόρια αυτά είναι μικρού μοριακού βάρους φυτοτοξίνες αμινοξικής και πεπτιδικής φύσης, όπως για παράδειγμα η (2S)-5-αμινο-

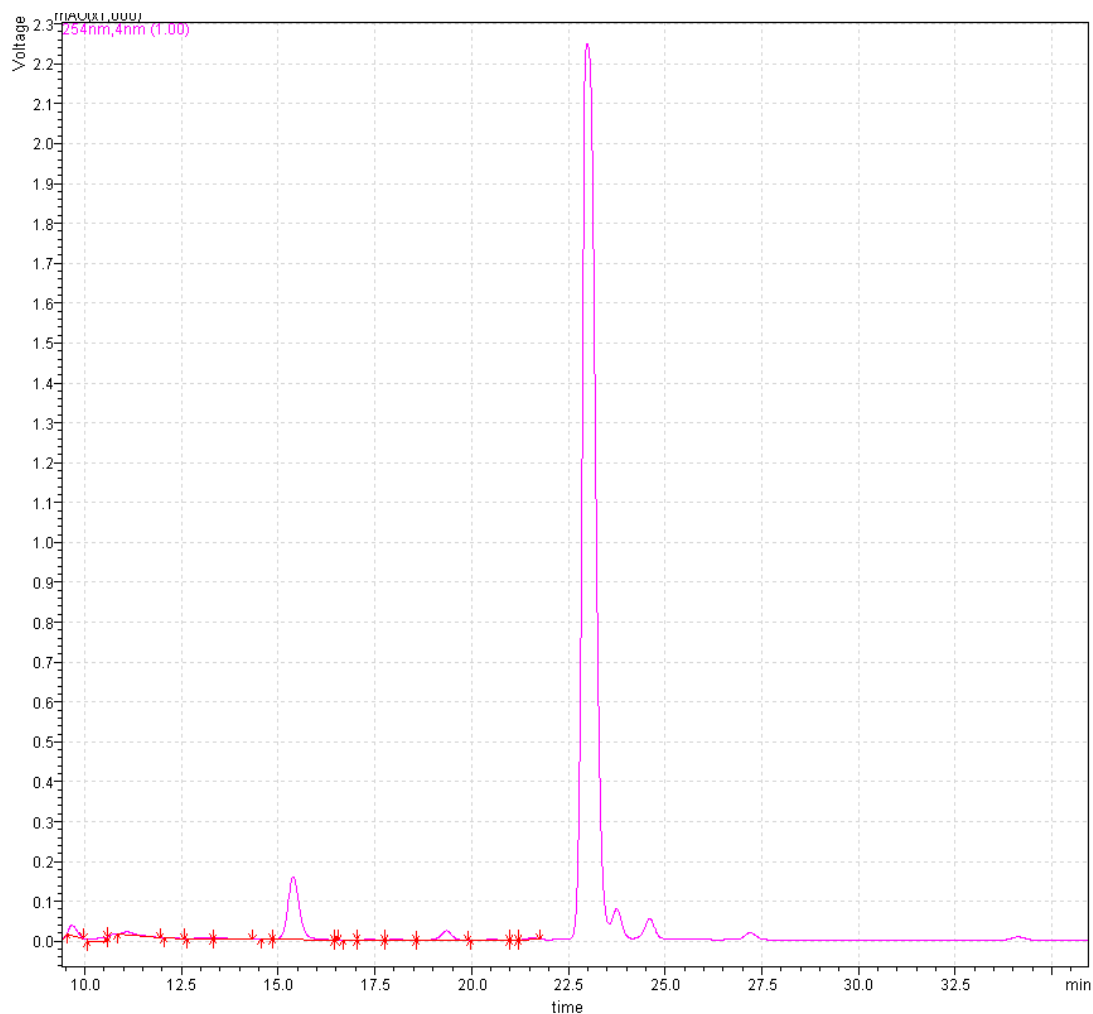
2(αμινομεθύλ)-2-υδροξεξανοδιϊκό οξύ (ταμποξινίνη), η 5-καρβοξυάμινο-πεντανοϊκό οξύ (ταμποξινίνη β-λακτάμη), (Levi *et al.*, 1986), η ταμποξινίνη δ-λακτάμη (Taylor *et.al.*, 1972), η L-2-άμινο-4-μεθόξυ-trans-3-βουτενοϊκό οξύ (Sahm *et al.* 1973, Scannel *et al.*, 1972), η 2-άμινο-4-αιθοξυβουτανοϊκό οξύ (O-αιθυλομοσερίνη), η 2-αιθύλ-1-[6-αιθύλ-1-οξο-2,3,3^α,6,7,7^α-εξαυδρουδεν-4-υλ-καρβονυλάμινο]-κυκλοπροπάν-1-καρβοξυλικό οξύ, (κορονατίνη), (Ichihara *et al.*, 1977, Robin, 1984).



Εικόνα 3.18 : Μοριακή δομή γνωστών τοξινών με αντιμικροβιακή δράση

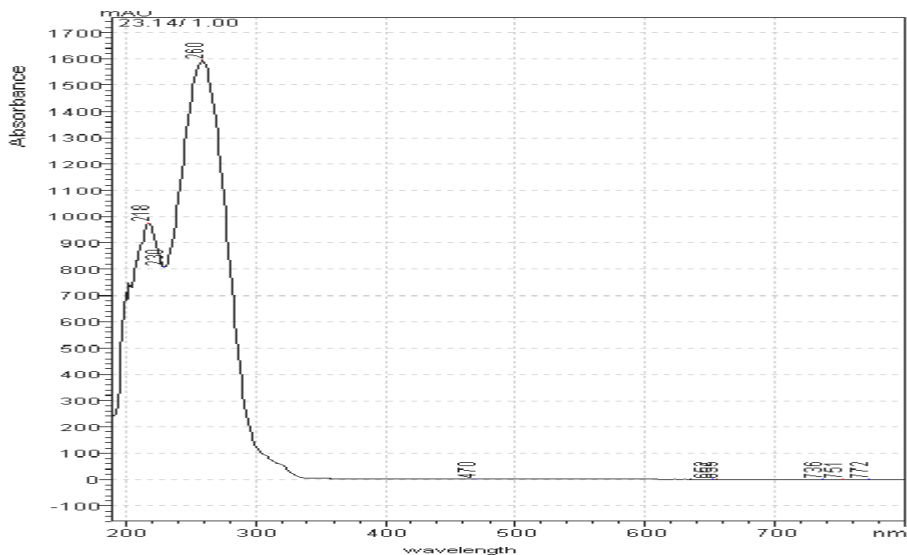
- **Χαρακτηρισμός κορυφής κ-2**

Η δεύτερη κύρια κορυφή εμφανίστηκε σε χρόνο ανάσχεσης $RT=23.1$ min. Στην εικόνα που ακολουθεί, παρουσιάζεται η χρωματογραφική ανάλυση της κορυφής κ-2 μετά την απομόνωση της από το εκχύλισμα του αγρίου τύπου του βακτηρίου, με τη χρήση της ημιπαρασκευαστικής στήλης C-18.



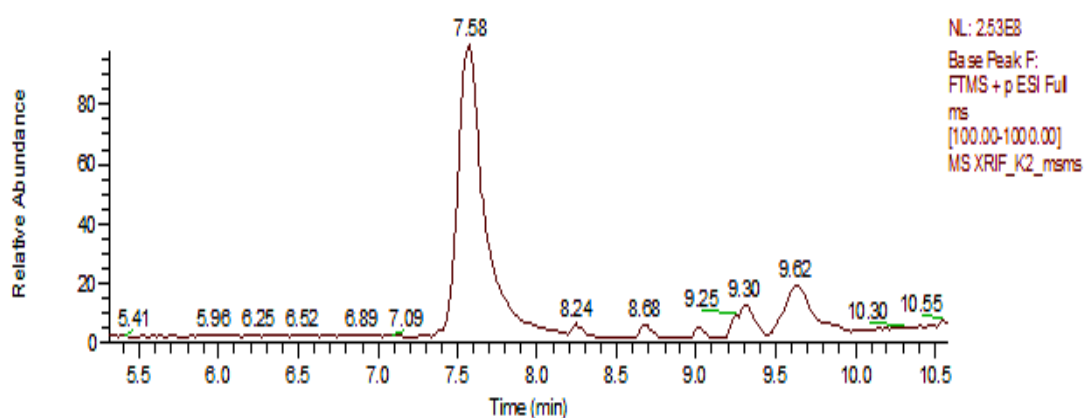
Εικόνα 3.19 : Χρωματογραφική ανάλυση του κλάσματος κ-2 με ημιπαρασκευαστική στήλη C₁₈, 5 μm , κ. φ. υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,1M (A), μεθανόλη (B) και ακετονιτρίλιο (Γ), ροή κ. φ. = 1.8 ml / min.

Το φάσμα απορρόφησης του κλάσματος αυτού έδωσε δυο χαρακτηριστικά μέγιστα σε μήκη κύματος $\lambda_1= 223$ nm και $\lambda_2=257$ nm (Εικ. 3.20).



Εικόνα 3.20 : Φάσμα απορρόφησης κλάσματος κ-2

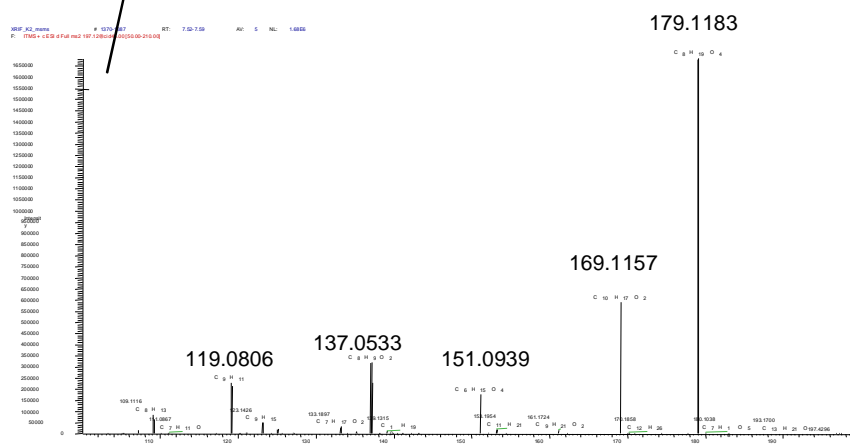
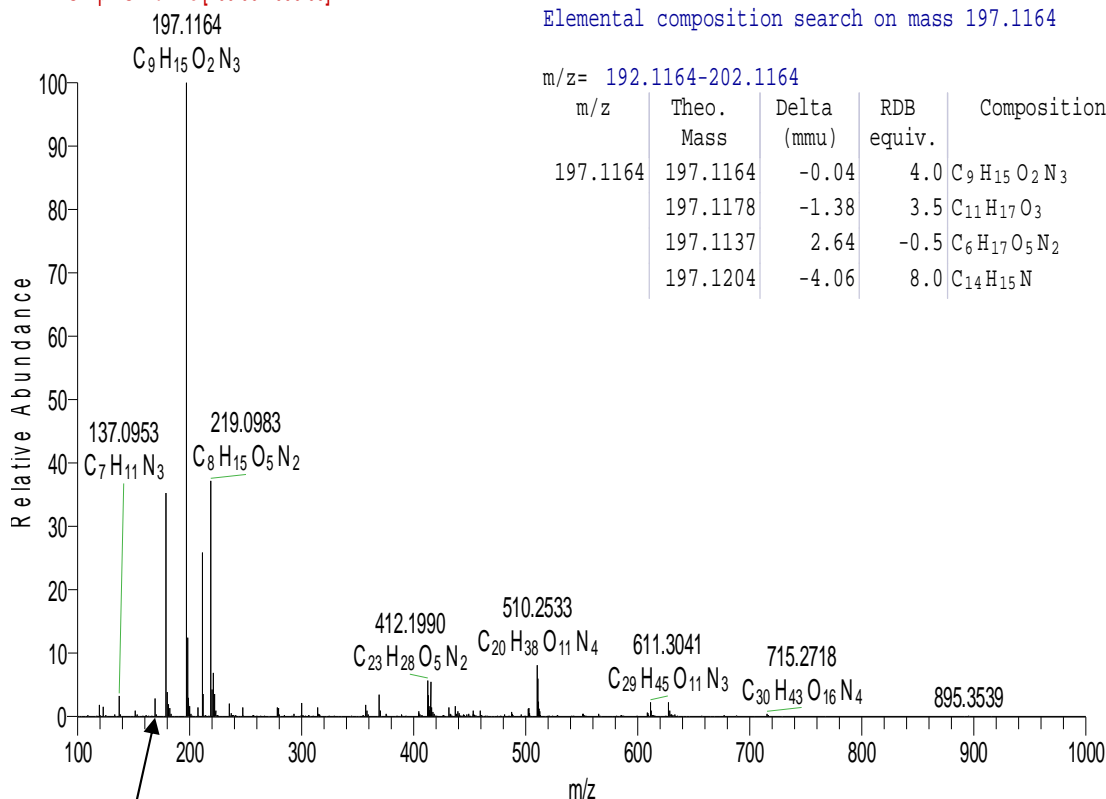
Η UHPLC – ανάλυση του δεύτερου κλάσματος έδωσε μια κύρια κορυφή, σε χρόνο ανάσχεσης $RT=7.58\text{min}$ και κάποιες μικρότερες κορυφές σε χρόνους ανάσχεσης $RT= 9.25\text{ min}, 9.30\text{ min}, 9.62\text{ min}$, οι οποίες ενδέχεται και πάλι να αντιστοιχούν σε λιπίδια σύμφωνα με τα φάσματα μάζας τους (Εικ. 3.21). Τα HR-MS αποτελέσματα, επέδειξαν ένα πρωτονιωμένο μοριακό ιόν $[M+H]^+ =197.1164$ στο οποίο κατά τη στοιχειακή του ανάλυση αποδόθηκε ο πιθανός μοριακός τύπος $C_9H_{15}O_2N_3$ (Εικ. 3.22).



Εικόνα 3.21 : Χρωματογραφική ανάλυση κ-2 με αναλυτική τύπου *Hypersil GOLD, 50 x 2.1 mm, 1.9 μm*, κ. φ. υδατικό διάλυμα φορμικού οξέος 0.1 % (A) και μεθανόλη (B), ροή κ. φ. = $200\ \mu\text{l}/\text{min}$

XRIF_K2_msms#1389 RT: 7.60 AV: 1 NL: 2.33E8
 F: FTMS + p ESI Full ms [100.00-1000.00]

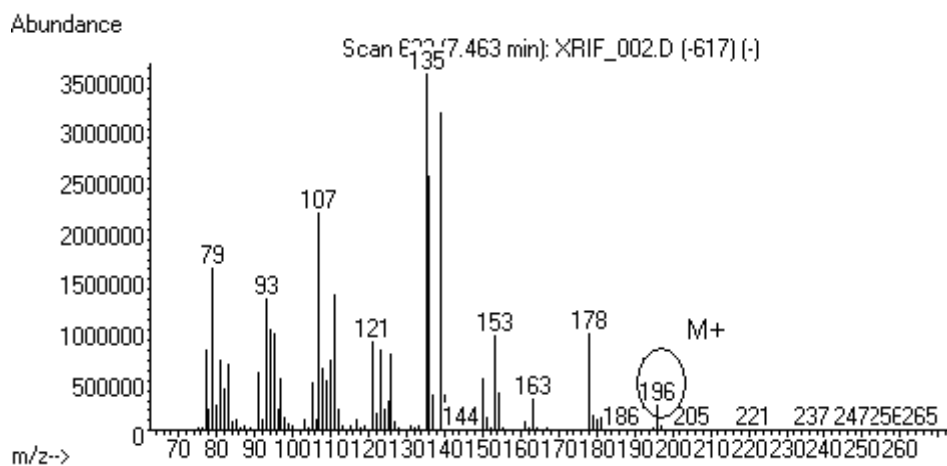
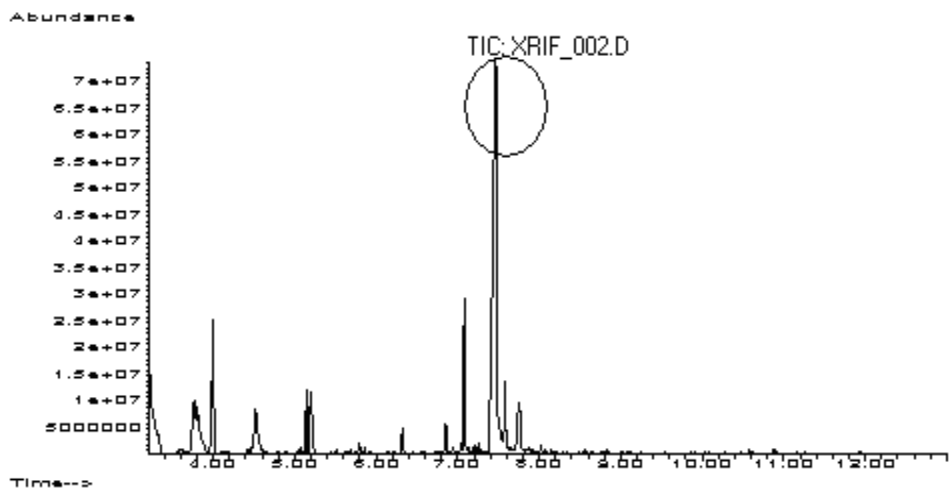
Elemental composition search on mass 197.1164



Εικόνα 3.22 : ESI(+)-HRMS φάσμα μάζας του κλάσματος κ-2.

Παρά το γεγονός ότι η χρωματογραφική ανάλυση του κλάσματος 2 έδινε ένα αρκετά καθαρό προϊόν, η αεριοχρωματογραφική ανάλυση της κορυφής αποκάλυψε ότι το δείγμα ήταν αρκετά πιο σύνθετο. Η GC-MS ανάλυση του δεύτερου κλάσματος έδωσε μια κύρια κορυφή να εμφανίζεται σε χρόνο $t = 7.42$ min με κύριες θραύσεις τις

m/z 196, 178, 135 και 139. Η κορυφή με m/z 197 αντιστοιχεί στην ουσία κ-2 η οποία έχει μοριακό ιόν $M^+=196$ (Εικ. 3.23).

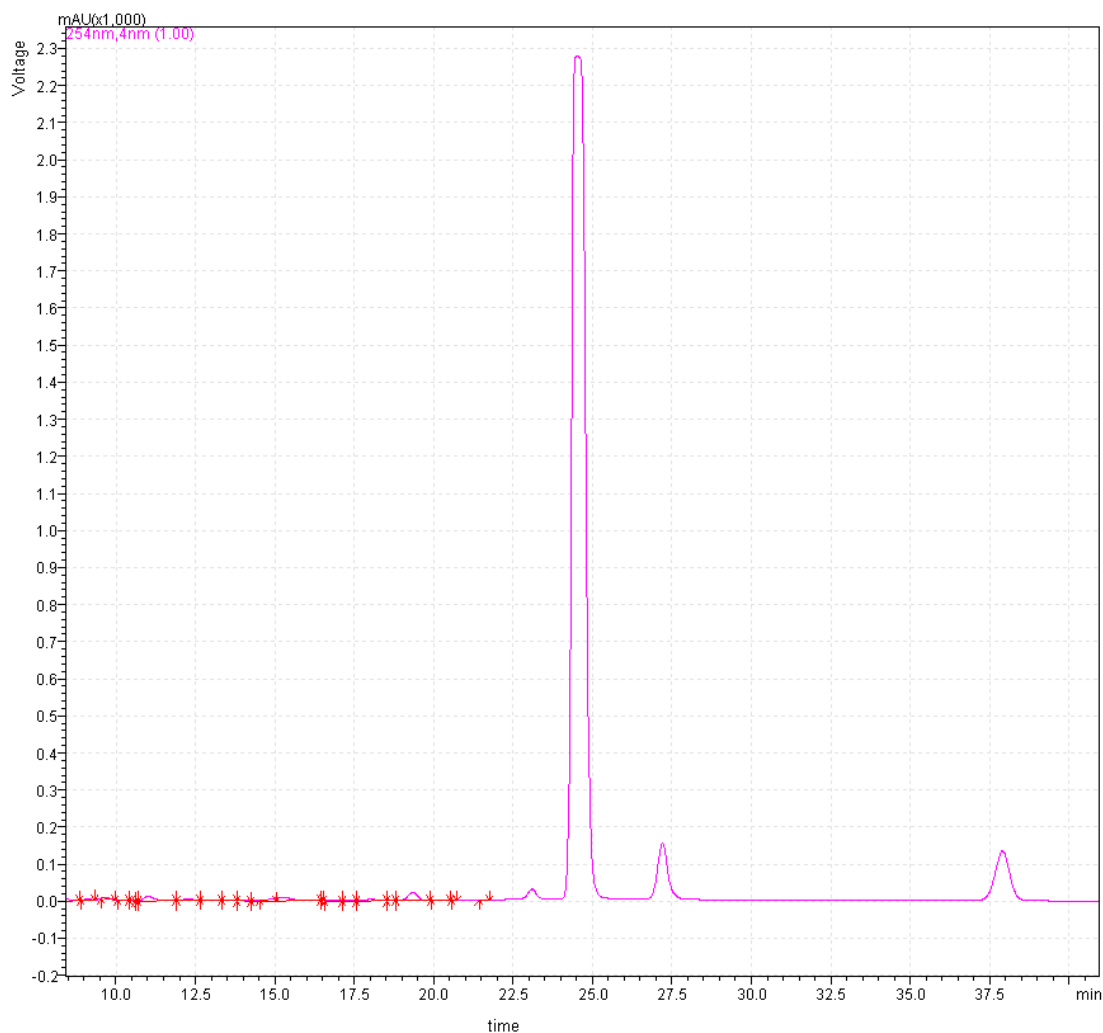


Εικόνα 3.23 : Τυπικό χρωματογράφημα ιόντων του κλάσματος 2.

Το χρωματογράφημα, όμως δεν ήταν και πάλι καθαρό γεγονός που τελικά δεν μας έδωσε τη δυνατότητα να ταυτοποιήσουμε την άγνωστη ουσία μας με την τεχνική ^1H NMR.

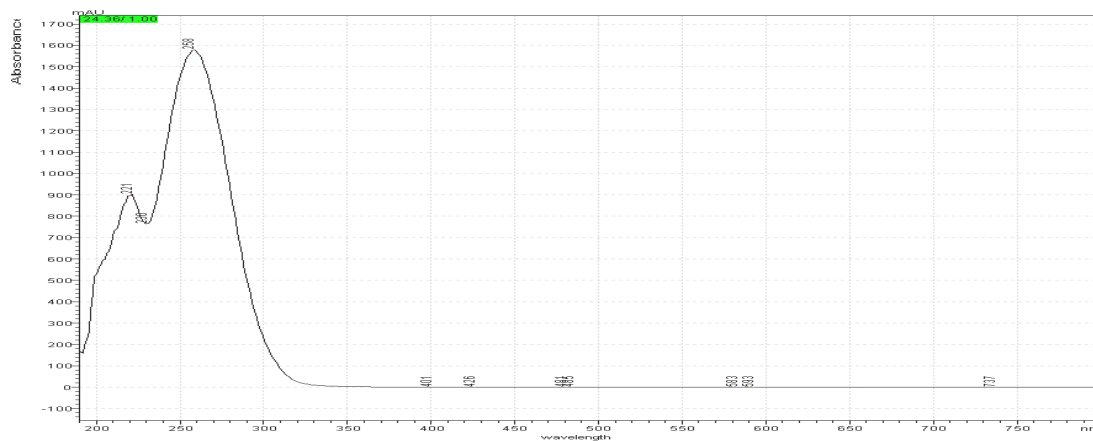
- **Χαρακτηρισμός κορυφής κ-3**

Η τρίτη κύρια κορυφή εμφανίστηκε σε χρόνο ανάσχεσης $RT=24.5$ min. Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται η χρωματογραφική ανάλυση της κορυφής κ-3 μετά την απομόνωση της από το εκχύλισμα του αγρίου τύπου του βακτηρίου, με τη χρήση της ημιπαρασκευαστικής στήλης C-18.



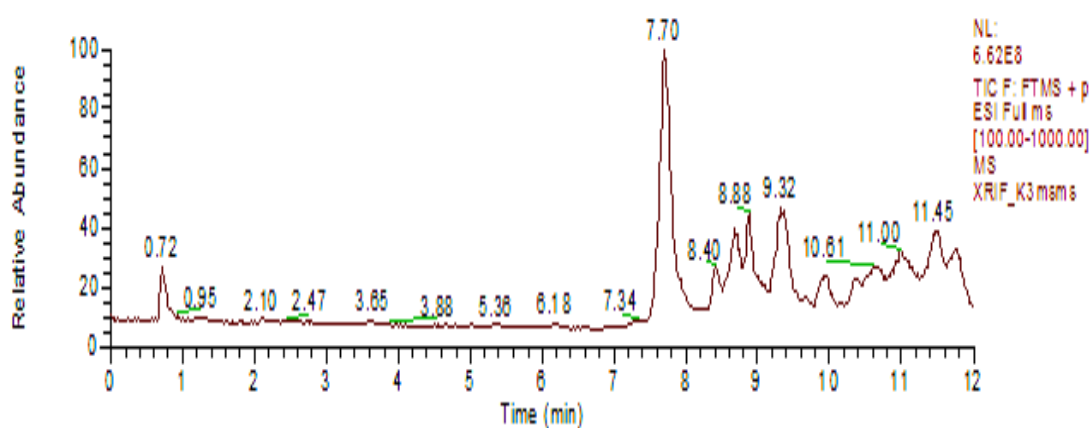
Εικόνα 3.24 : Χρωματογραφική ανάλυση του κλάσματος κ-3 με ημιπαρασκευαστική στήλη C₁₈, 5 μ m, κ. φ. = υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,1M (Α), μεθανόλη (Β) και ακετονιτρίλιο (Γ), ροή κ. φ. = 1.8 ml / min.

Το φάσμα απορρόφησης του κλάσματος αυτού εμφάνιζε τα ίδια χαρακτηριστικά μέγιστα σε μήκη κύματος $\lambda_1=223$ nm και $\lambda_2=257$ nm όπως ακριβώς και το δεύτερο κλάσμα (Εικ. 3.25).



Εικόνα 3.25. : Φάσμα απορρόφησης κλάσματος κ-3

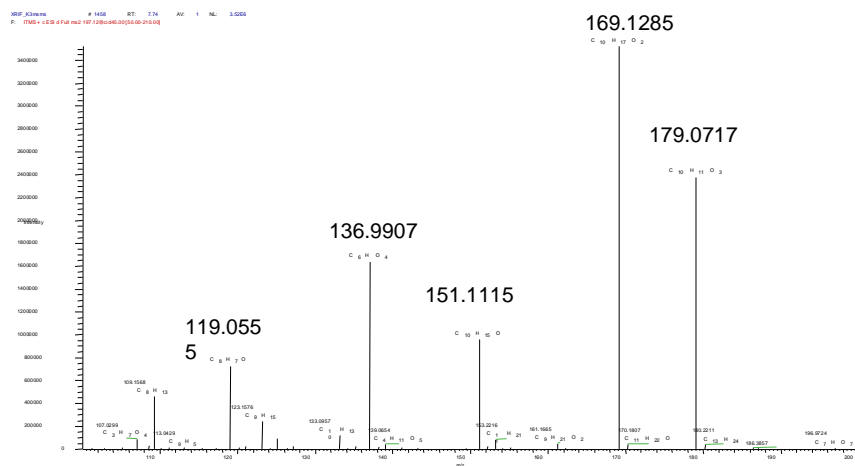
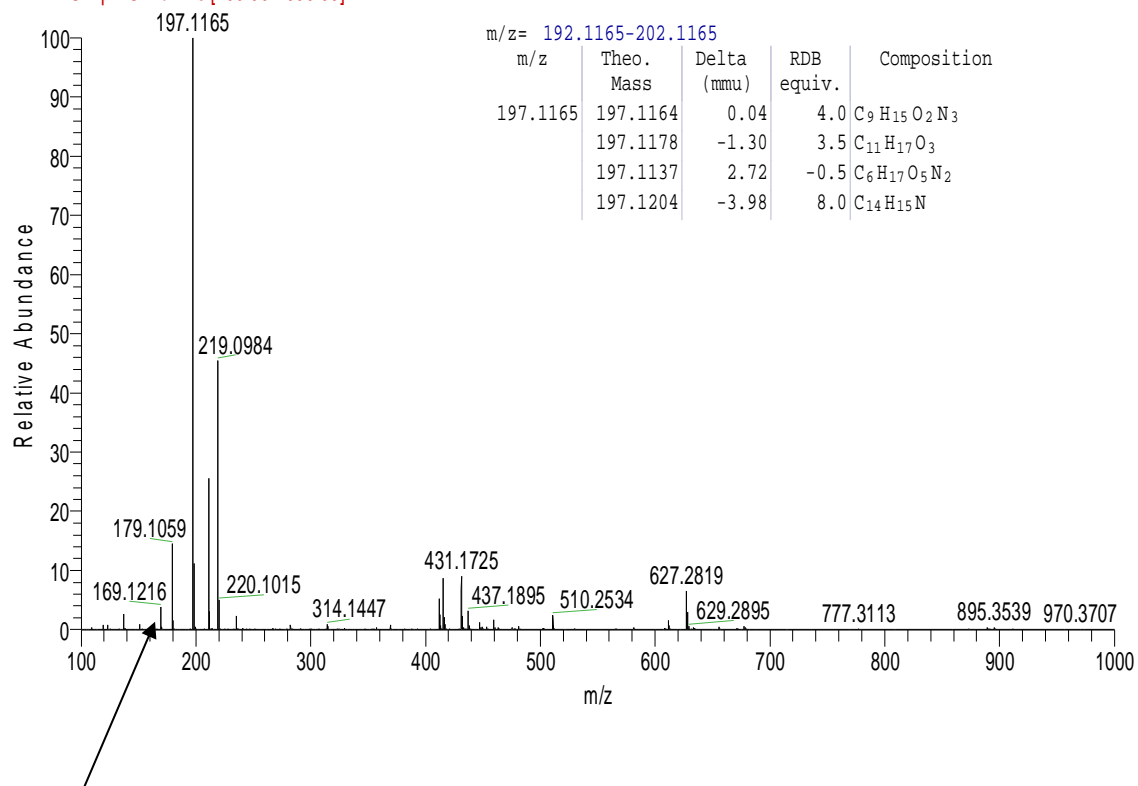
Η ανάλυση του τρίτου κλάσματος έδωσε μια κύρια κορυφή, σε χρόνο ανάσχεσης $RT=7.70$ min με κάποιες μικρότερες κορυφές σε χρόνους ανάσχεσης $RT=8.40$ min, 8.88 min, 9.32 min (Εικ. 3.26). Τα HR-MS αποτελέσματα, επέδειξαν ένα πρωτονιωμένο μοριακό ιόν $[M+H]^+ =197.1164$ στο οποίο κατά τη στοιχειακή του ανάλυση, αποδόθηκε και πάλι ο πιθανός μοριακός τύπος $C_9H_{15}O_2N_3$ (Εικ. 3.27).



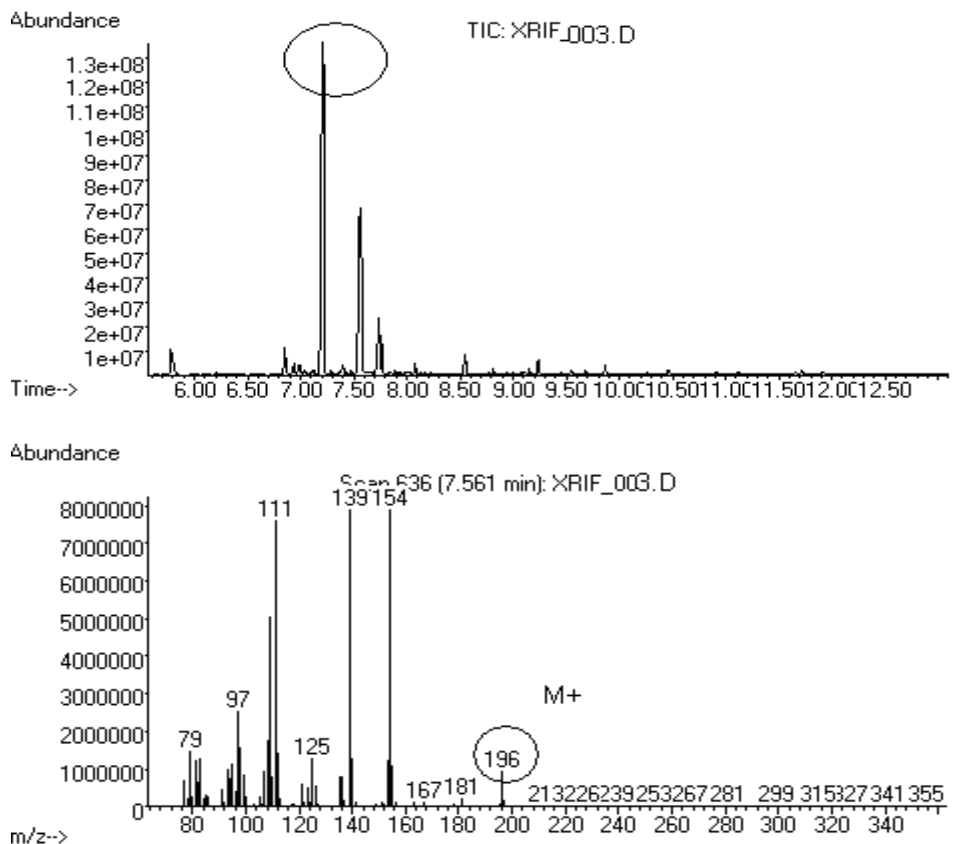
Εικόνα 3.26 : Χρωματογραφική ανάλυση κ-3 με αναλυτική τύπου Hypersil GOLD, 50 x 2.1 mm, 1.9 μ m, κιν. φάση. υδατικό διάλυμα φορμικού οξέος 0.1 % (A) και μεθανόλη (B), ροή κιν. φάσης = 200 μ l/min

XRIF_K3msms #1453 RT: 7.71 AV: 1 NL: 1.99E8
 F: FTMS + p ESI Full ms [100.00-1000.00]

Elemental composition search on mass 197.1165



Εικόνα 3.27 : ESI(+)-HRMS φάσμα μάζας του κλάσματος κ-3.



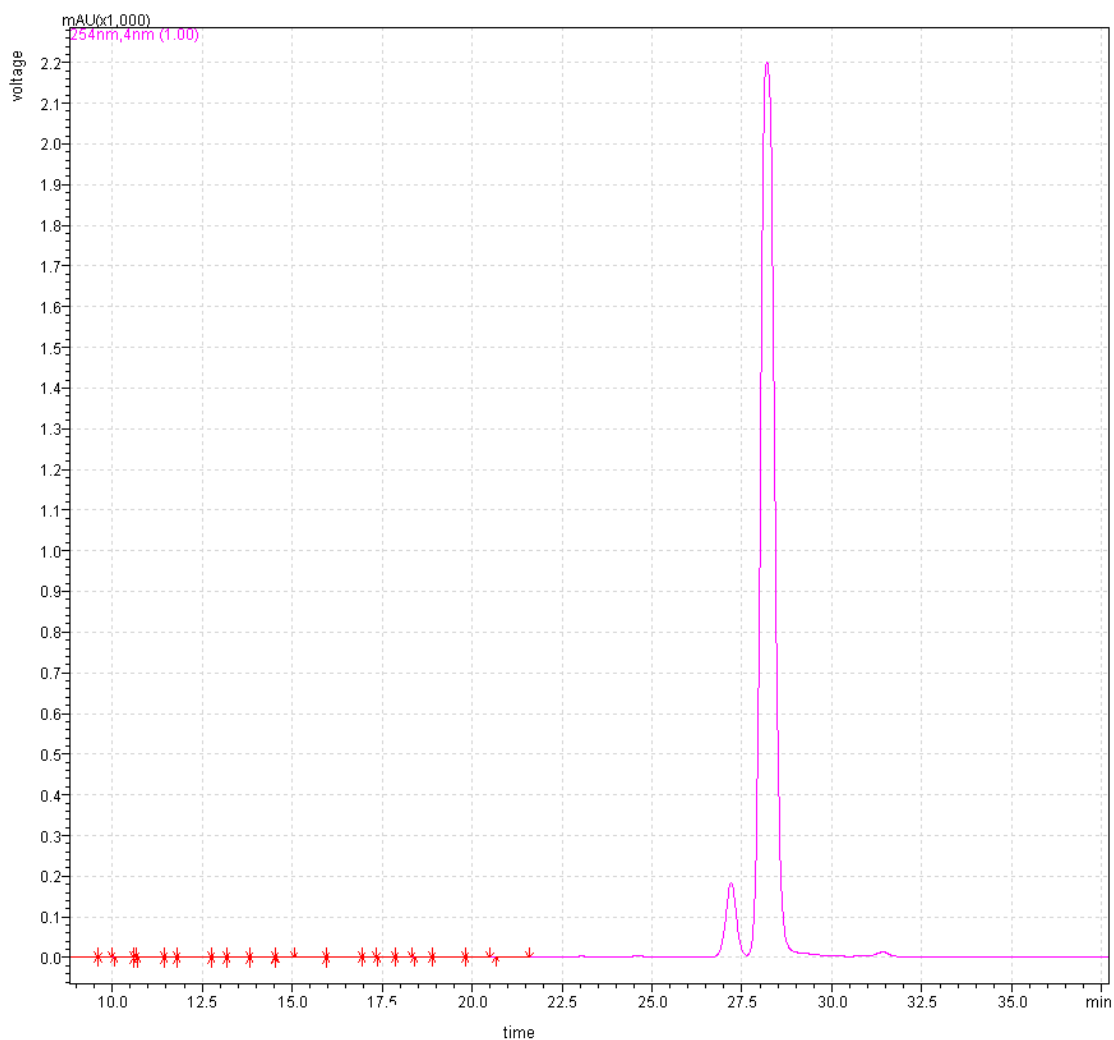
Εικόνα 3.28 :: Τυπικό χρωματογράφημα των ιόντων του κλάσματος κ-3.

Η GC-MS ανάλυση του τρίτου κλάσματος έδωσε μια κύρια κορυφή να εμφανίζεται σε χρόνο $t = 7.42$ min με κύριες θραύσεις τις m/z 196, 154, και 139, η οποία όπως αποδεικνύεται αντιστοιχεί στην ουσία με μοριακό ιόν $M^+ = 196$ (Εικ. 3.28). Το χρωματογράφημα, όμως δεν ήταν και πάλι καθαρό, γεγονός που τελικά δεν μας έδωσε τη δυνατότητα να ταυτοποιήσουμε την άγνωστη ουσία μας με την τεχνική ^1H NMR. Ωστόσο από τη GC-MS ανάλυση των δύο κλασμάτων προέκυψαν πολύ σημαντικές παρατηρήσεις που σχετίζονται με τη δομή των δύο αναλυτών.

Συγκρίνοντας τους προτεινόμενους μοριακούς τύπους που αποδόθηκαν στα κλάσματα 2 και 3, παρατηρήθηκε ότι είχαν ακριβώς τις ίδιες μοριακές δομές. Συγκρίνοντας επίσης τα φάσματα ιόντων τους, διαπιστώθηκε ότι τα δυο αυτά κλάσματα έδωσαν παρόμοιες θραύσεις ιόντων αλλά σε διαφορετική σχετική αναλογία. Τα φάσματα απορρόφησης επίσης των ουσιών αυτών ήταν πανομοιότυπα. Τα δεδομένα αυτά αναφέρονται και αναλύονται εκτενέστερα στα συμπεράσματα της παρούσας διατριβής.

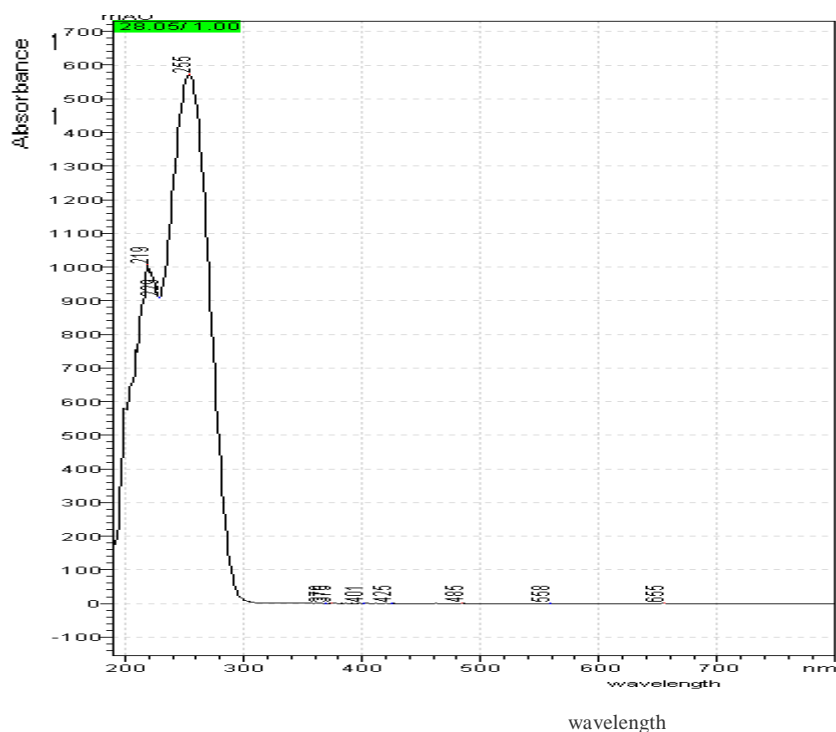
- **Χαρακτηρισμός κορυφής κ-4**

Όπως φαίνεται στο χρωματογράφημα του τέταρτου κλάσματος (Εικ.3.29), απομονώθηκε με τη χρήση της ημιπαρασκευαστικής χρωματογραφίας μια κύρια κορυφή σε χρόνο ανάσχεση $RT=28.4$ min.



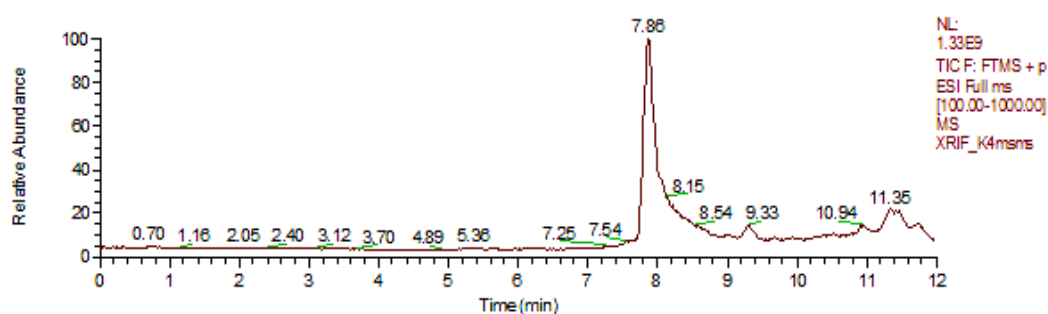
Εικόνα 3.29 :: Χρωματογραφική ανάλυση του κλάσματος κ-4 με ημιπαρασκευαστική στήλη $C_{18}, 5 \mu m$, κιν. φάση υδατικό διάλυμα οξικού οξέος $0,1M$ (Α), μεθανόλη (Β) και ακετονιτρίλιο (Γ), ροή κιν. φάσης. = $1.8 \text{ ml} / \text{min}$.

Το φάσμα απορρόφησης του κλάσματος αυτού είναι ακριβώς ίδιο με το αντίστοιχο του δεύτερου κλάσματος με δυο χαρακτηριστικά μέγιστα σε μήκη κύματος $\lambda_1=223 \text{ nm}$ και $\lambda_2=255 \text{ nm}$ (Εικ. 3.30).



Εικόνα 3.30 : Φάσμα απορρόφησης κλάσματος κ-3

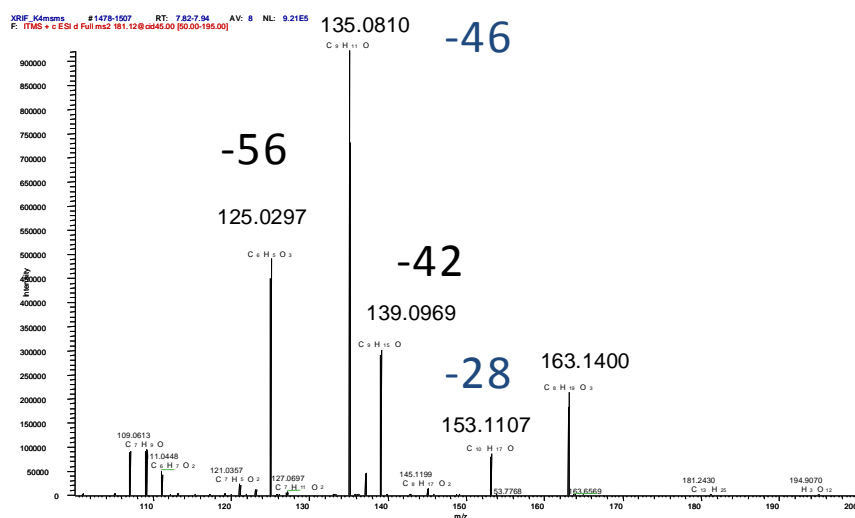
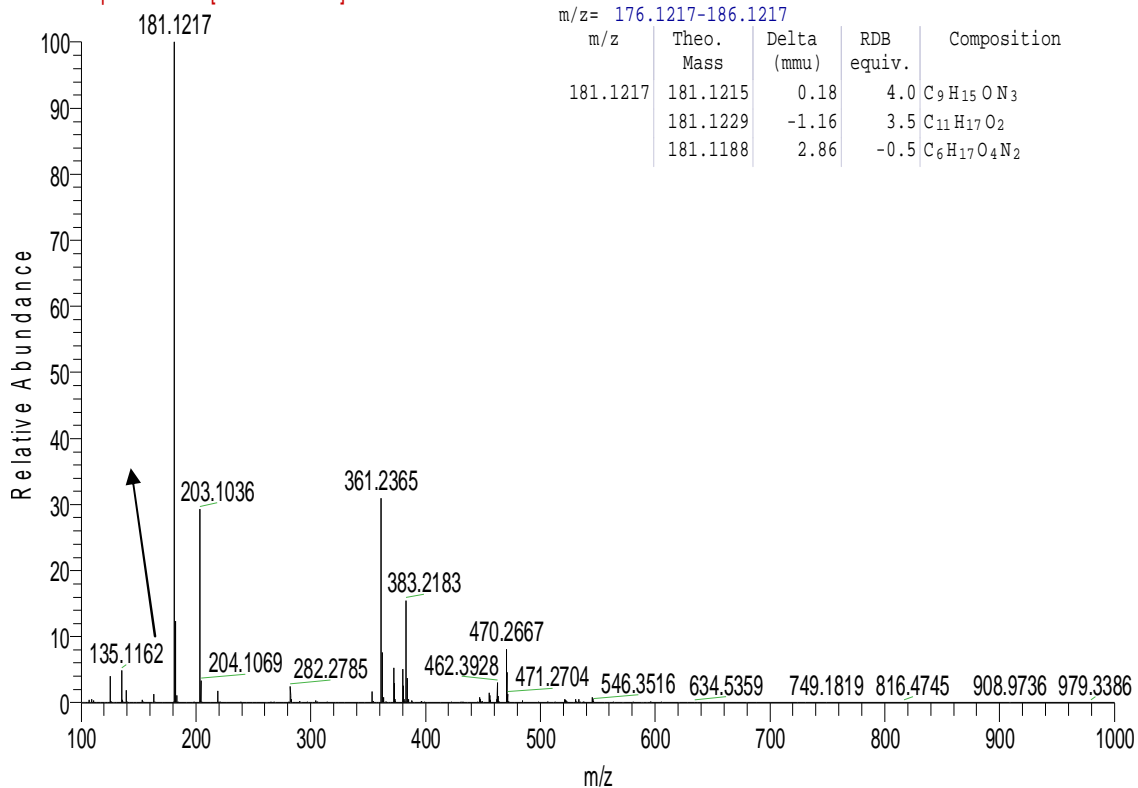
Η χρωματογραφική ανάλυση του τέταρτου κλάσματος έδωσε μια κύρια κορυφή, σε χρόνο ανάσχεσης RT= 7.86 min (Εικ. 3.31) και με μοριακό ιόν $[M+H]^+ = 181.1217$, στο οποίο, αποδόθηκε ο πιθανός μοριακός τύπος $C_9H_{15}ON_3$ (Εικ. 3.32).



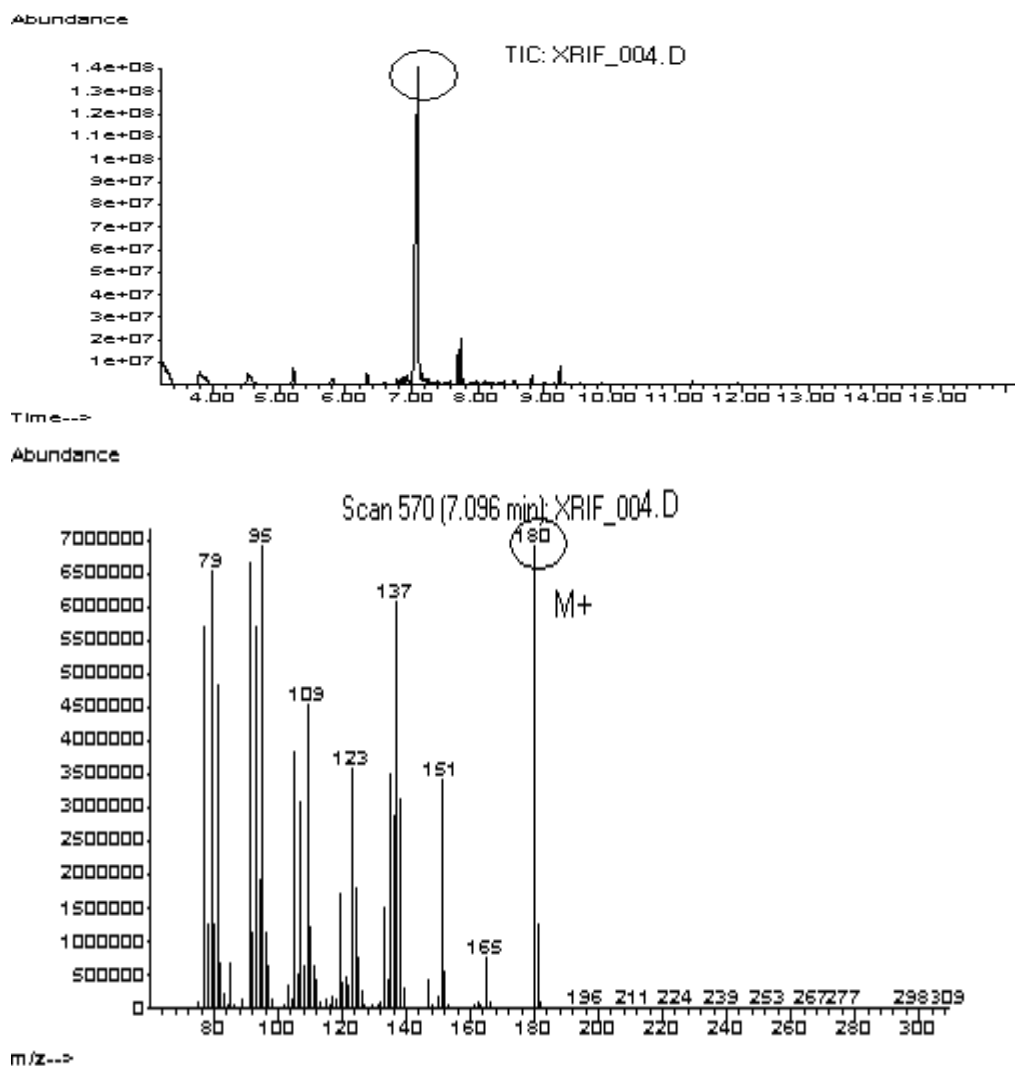
Εικόνα 3.31 : Χρωματογραφική ανάλυση κ-4 με αναλυτική τύπου Hypersil GOLD, 50 x 2.1 mm, 1.9 μm, κιν. φάση υδατικό διάλυμα φορμικού οξέος 0.1 % (A) και μεθανόλη (B), ροή κιν. φάσης = 200 μl/min

XRIF_K4msms #1489 RT: 7.86 AV: 1 NL: 4.48E8
 F: FTMS + p ESI Full ms [100.00-1000.00]

Elemental composition search on mass 181.1217



Εικόνα 3.32 : ESI(+)-HRMS φάσμα μάζας του κλάσματος κ-4.



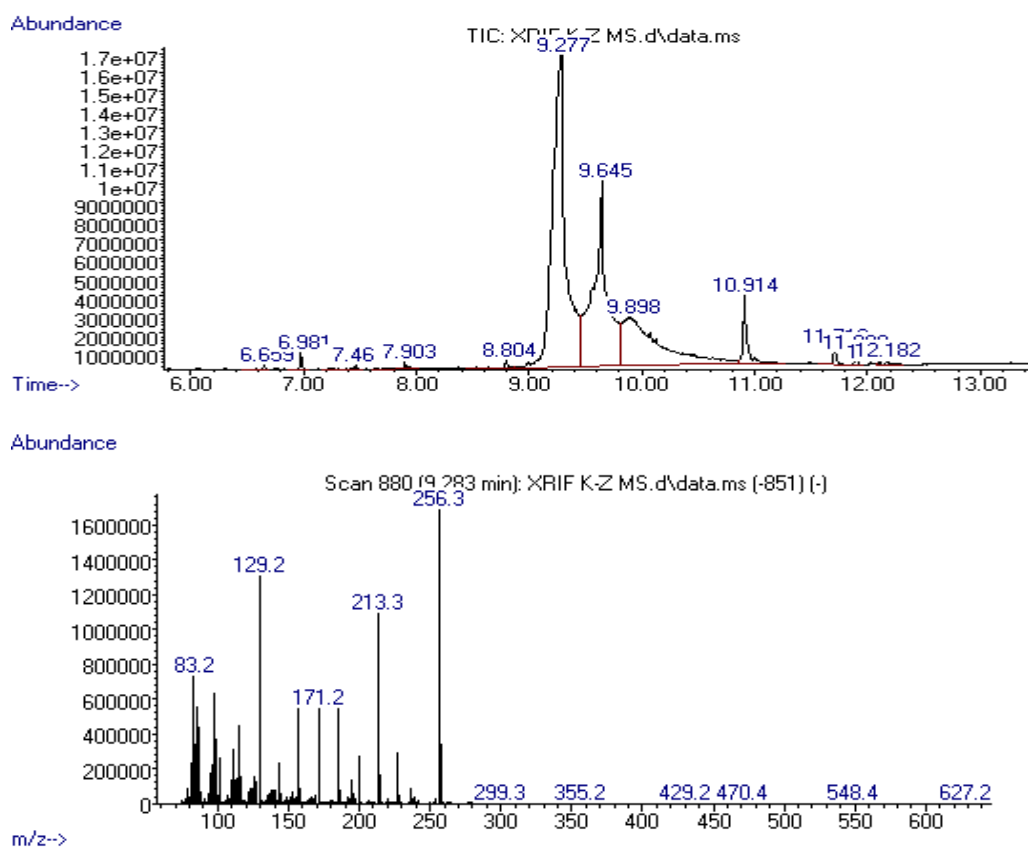
Εικόνα 3.33 : Τυπικό χρωματογράφημα ιόντων του κλάσματος κ-4

Η GC-MS ανάλυση του τέταρτου κλάσματος έδωσε μια κύρια κορυφή να εμφανίζεται σε χρόνο $t = 7.096 \text{ min}$ με κύριες θραύσεις τις m/z 180 και 137, η οποία αντιστοιχεί στην ουσία με μοριακό ιόν $M^+ = 180$ (Εικ. 3.33). Το χρωματογράφημα της ουσίας αυτής αξιολογήθηκε ως αρκετά καθαρό. Η ανάλυση του δείγματος αυτού με την τεχνική ^1H NMR έδωσε και πάλι ένα αρκετά σύνθετο φάσμα, το οποίο δεν κατορθώσαμε να το ταυτοποιήσουμε.

Παρόλα αυτά, αναλύοντας τα δεδομένα που συγκεντρώθηκαν για το τέταρτο κλάσμα προέκυψε μία πολύ σημαντική παρατήρηση. Η μάζα της τέταρτης κορυφής εμφανίστηκε ελαττωμένη σε σχέση με τις κορυφές 2 και 3 κατά 16 μονάδες και όπως αποκάλυψε η στοιχειακή ανάλυση του δείγματος αυτού και ο μοριακός τύπος που προτάθηκε για το δείγμα ($\text{C}_9\text{H}_{15}\text{ON}_3$). Σε σχέση, δηλαδή, με τα κλάσματα 2 και 3 όπου είχαν τον προτεινόμενο μοριακό τύπο $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}_3$, το μόριο έδειξε να χάνει ένα άτομο οξυγόνου.

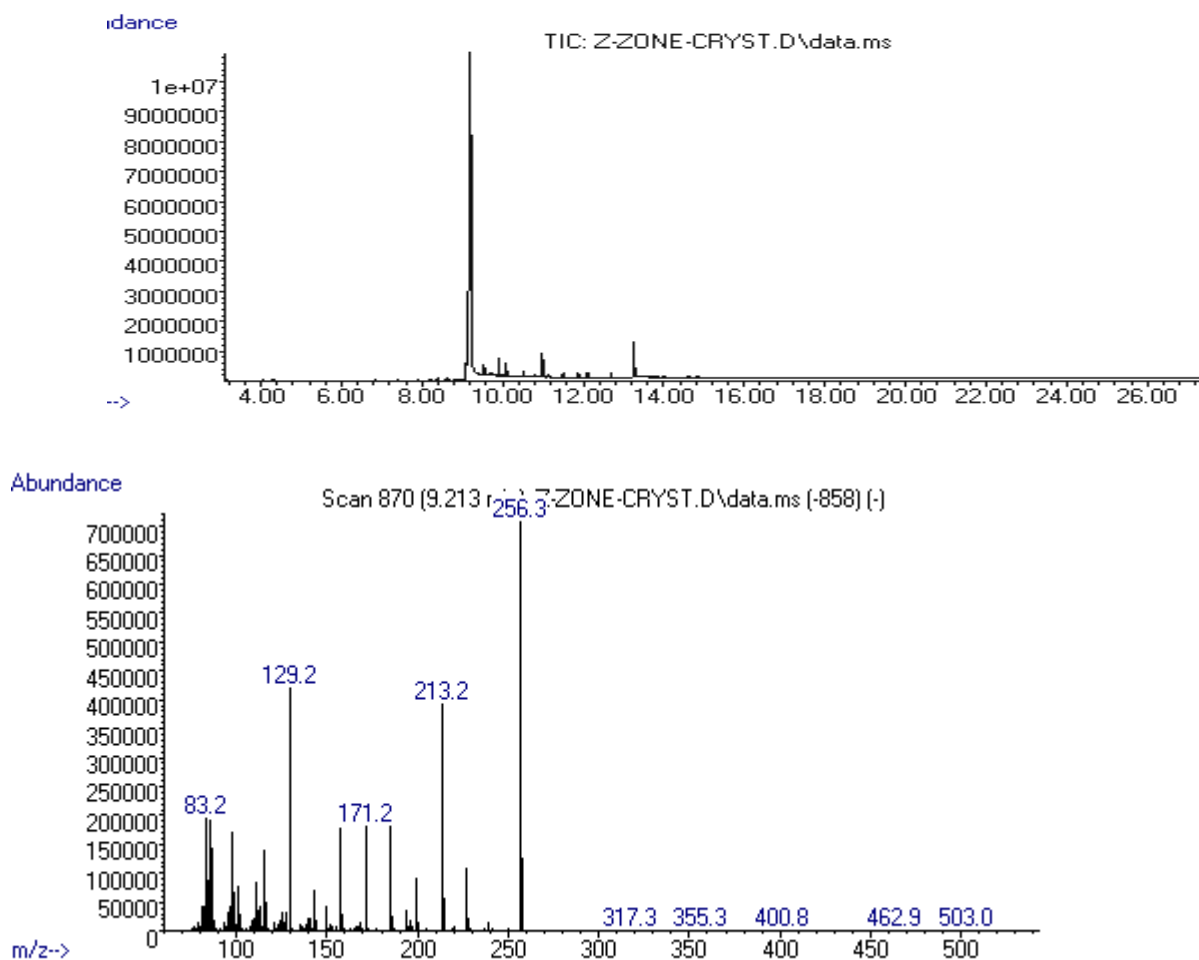
3.5. Απομόνωση του μεταβολίτη Q_a με Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας.

Το εκχύλισμα της ζώνης Q_a, που απομονώθηκε με την τεχνική TLC αποτελείται από μεγάλο αριθμό ουσιών, όπως αποδείχθηκε από την ανάλυσή του με την τεχνική GC-MS. Ακολουθώντας, λοιπόν, τη μεθοδολογία καθαρισμού του με την τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE), η οποία περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.6.2.2, η ουσία απομονώθηκε σε πιο καθαρή μορφή. Το πιο καθαρό δείγμα, αρχικά μελετήθηκε ως προς την αντιμικροβιακή του δράση με βιοδοκιμή, όπου και συνέχισε να εμφανίζει έντονα συμπτώματα παρεμπόδισης του *P. ultimum*. Στη συνέχεια αναλύθηκε στον αέριο χρωματογράφο και τα αποτελέσματα της ανάλυσης δίνονται στην εικόνα 3.34.



Εικόνα 3.34 : Τυπικό χρωματογράφημα ιόντων του κλάσματος Q_a

Η GC-MS ανάλυση του Qa έδωσε μια κύρια κορυφή να εμφανίζεται σε χρόνο $t = 9.277$ min με κύριες θραύσεις τις m/z 256 και 213, η οποία αντιστοιχούσε στην ουσία με μοριακό ιόν $M^+ = 256$. Το εκχύλισμα στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε θάλαμο θερμοκρασίας 4°C για 24 h. Κατά την ψύξη, όμως, του δείγματος παρατηρήθηκε έντονος σχηματισμός λευκών νιφάδων που συγκεντρώνονταν στον πυθμένα του σωλήνα. Προκειμένου να απομονωθούν οι κρύσταλλοι αυτοί, το διάλυμα παρέμεινε για άλλες 24h στους 4°C . Κατόπιν οι διαλύτες απομακρύνθηκαν από το σωλήνα με φυγοκέντριση στα 7,500 rpm για 10 min και με τον τρόπο αυτό οι κρύσταλλοι απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή.



O

Εικόνα 3.35 : Τυπικό χρωματογράφημα κρυστάλλων του κλάσματος Qa

Η GC-MS ανάλυση των κρυστάλλων έδωσε μια κύρια κορυφή να εμφανίζεται σε χρόνο $t = 9.277$ min και με τις ίδιες κύριες θραύσεις τις m/z 256 και 213, που είχε δώσει και το αρχικό δείγμα (Εικ. 3.35). Παρότι το νέο δείγμα έδωσε ένα σαφώς πιο καθαρό χρωματογράφημα σε σχέση με το αρχικό και με τις ίδιες κύριες θραύσεις, κατά τη μελέτη με βιοδοκιμή στο φυτοπαθογόνο μύκητα *P.ultimum*, παρατηρήθηκε ότι οι κρύσταλλοι αυτοί που απομονώθηκαν με ψύξη του αρχικού δείγματος δεν παρουσίασαν καμία αντιμικροβιακή δράση.

Τόσο το αρχικό δείγμα πριν την καταβύθιση των κρυστάλλων, το οποίο παρουσίαζε αντιμικροβιακή δράση, όσο και το δείγμα των άμορφων λευκών νιφάδων το οποίο δεν παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση αναλύθηκαν στη συνέχεια με την τεχνική ^1H NMR. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης (Παράρτημα I), έδειξαν ότι το αρχικό δείγμα αποτελείται από μίγμα συστατικών και η ερμηνεία του δεν κατέστη δυνατή. Το δείγμα των άμορφων νιφάδων που απομονώθηκε από το μείγμα αυτό συμφωνούσε με τη δομή του δεκαεξανοϊκού (παλμιτικό) οξέος, το οποίο είναι συστατικό των φωσφολιπιδίων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των βακτηρίων και το μοριακό του βάρος είναι 256, όπως προκύπτει από τη GC-MS ανάλυση. Η ζώνη Qa δεν μελετήθηκε περαιτέρω στα πλαίσια της παρούσας διατριβής.

3.6. Αποτελέσματα σύγκρισης εκχυλισμένων αντιμικροβιακών ενώσεων του *Ps. fluorescens* X1 με γνωστές αντιμικροβιακές ουσίες άλλων ανταγωνιστικών βακτηρίων του γένους *Pseudomonas*.

Μελετώντας τα αποτελέσματα της βιβλιογραφικής εργασίας εντοπίστηκαν συγκεκριμένοι αντιμικροβιακοί μεταβολίτες που έφεραν το ίδιο μοριακό ιόν με κάποιους από τους άγνωστους μεταβολίτες μας. Συγκεκριμένα, οι υδρόξυ-φαιναζίνες έχουν σύμφωνα με τη βιβλιογραφία μοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+ = 197$ (Liu *et.al.*, 2007; Dyer *et.al.*, 2007), ενώ το ίδιο μοριακό ιόν φέρει ο αντιμικροβιακός μεταβολίτης του κλάσματος 2 και 3. Επιπλέον, σύμφωνα και πάλι με τις βιβλιογραφικές αναφορές, τα αποτελέσματα της ανάλυσης του κλάσματος 2, με την τεχνική HPLC-MS, συμφωνούσαν σε μεγάλο ποσοστό με τη δομή της 2, 4 διακετυλοφλορογλουκινόλης.

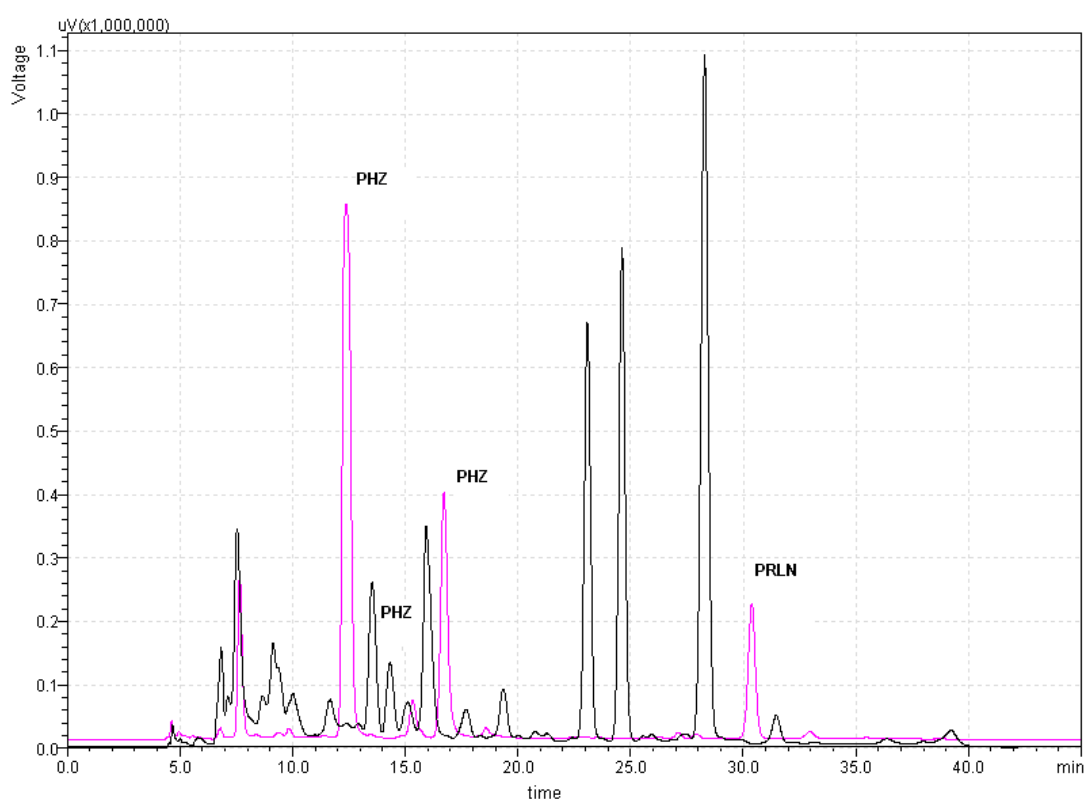
Επιχειρήθηκε, συνεπώς, η ανάλυση δυο γνωστών βακτηρίων για τα οποία είχαμε τεκμηριωμένες πληροφορίες σχετικά με τους αντιμικροβιακούς μεταβολίτες

που παράγουν, του *Pseudomonas aureofaciens* PGS 12 και του *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Συγκεκριμένα, για το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* CHA0, πιστοποιήθηκε από βιβλιογραφικά δεδομένα ότι παράγει τις αντιβιοτικές ενώσεις μονοακετυλοφλορογλουκινόλη, 2,4 διακετυλοφλορογλουκινόλη καθώς και την πυρολνιτρίνη (Siddiqui *et al.*, 2003). Η *Pseudomonas aureofaciens* PGS 12 επίσης, σύμφωνα με τους (Georgakopoulos *et al.*, 1994), παράγει ένα πλήθος από αντιμικροβιακούς μεταβολίτες, όπως τρεις φαιναζίνες με αντιβιοτική δράση την 2-υδρόξυ-φαιναζίνη, την 2-υδρόξυ-φαιναζίνη-1-καρβοξυλικό οξύ (Raaijmakers *et al.*, 1997) και τη φαιναζίνη-1-καρβοξυλικό οξύ, η οποία δίνει ένα χαρακτηριστικό κίτρινο ίζημα που διαλύεται σε πολύ μικρό ποσοστό στη μεθανόλη (Brisbane *et al.*, 1987), η πυρολνιτρίνη, το υδροκυάνιο και το ινδολοξικό οξύ.

Η παραλαβή των εκχυλισμάτων από τα δύο γνωστά βακτήρια πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα παρασκευαστικά της πορείας εργασίας I. Σκοπός του πειράματος ήταν η απομόνωση των γνωστών αντιμικροβιακών ουσιών που παράγουν τα δυο αυτά βακτήρια και η σύγκριση των φασμάτων τους με τις άγνωστες αντιμικροβιακές ενώσεις της εργασίας μας. Τα εκχυλίσματα των δύο βακτηρίων *Pseudomonas aureofaciens* PGS12 και *Pseudomonas fluorescens* CHA0, αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συνδυασμένη με φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού και φασματομετρία μαζών (HPLC-UV-Vis-MS), με τις ίδιες ακριβώς συνθήκες που εφαρμόστηκαν για τα άγνωστα κλάσματα της παρούσας εργασίας. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε όργανο LC-MS σε θετικό χημικό ιοντισμό APCI(+), ενώ το χρωματογραφικό πρόγραμμα διήρκτησε 45 min. Με τις ίδιες συνθήκες, επίσης αναλύθηκαν δύο πρότυπες ουσίες που θα έπρεπε σύμφωνα με τη βιβλιογραφία να εντοπίσουμε στα εκχυλίσματα των δύο γνωστών βακτηρίων· η πυρολνιτρίνη και η 2,4 διακετυλοφλορογλουκινόλη.

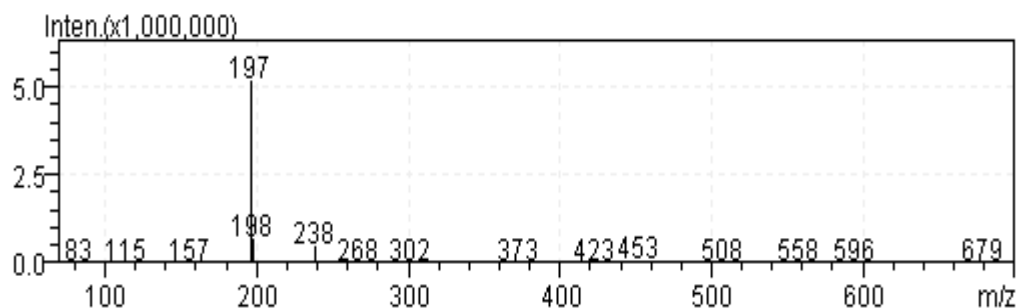
3.6.1. Χρωματογραφική ανάλυση εκχυλίσματος *Pseudomonas aureofaciens* PGS12

Στο χρωματογράφημα του εκχυλίσματος του βακτηρίου *Pseudomonas aureofaciens* PGS12, απεικονίζονταν τέσσερις κύριες κορυφές σε χρόνους ανάσχεσης $RT_1 = 12.4$ min, $RT_2 = 15.2$ min, $RT_3 = 16.9$ min και $RT_4 = 30.5$ min (κόκκινο χρωματογράφημα). Στην εικόνα 3.36 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης του εκχυλίσματος του βακτηρίου PGS 12 σε σύγκριση με το χρωματογράφημα του *Ps. fluorescens* X1 .



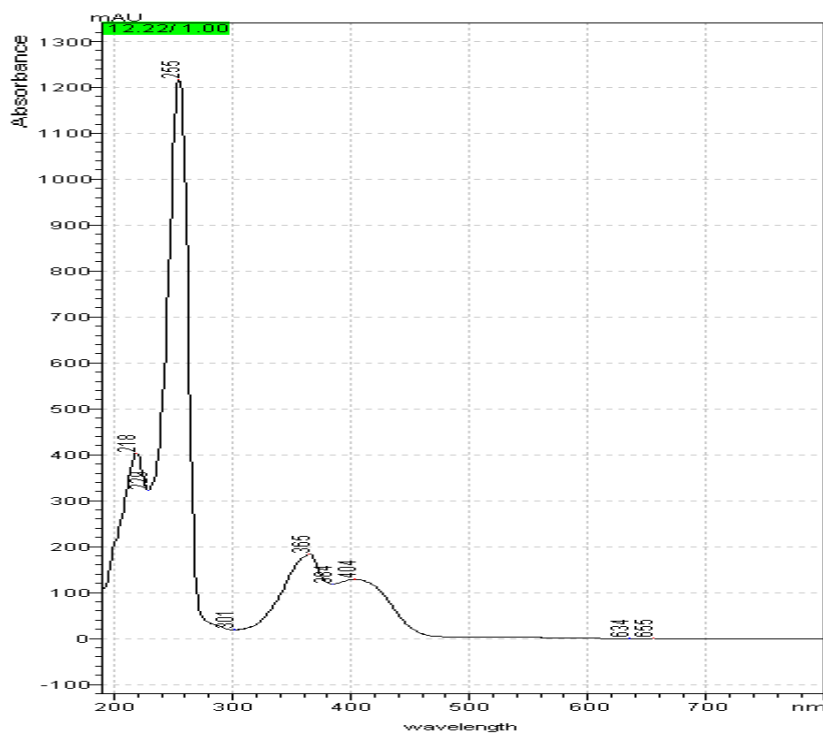
Εικόνα 3.36 : Συγκριτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων από τη χρωματογραφική ανάλυση των εκχυλίσματων του άγριου τύπου του βακτηρίου *Ps. fluorescens* X (μαύρο γράφημα) και του βακτηρίου PGS 12(κόκκινο γράφημα), με αναλυτική στήλη C_{18} , 5 μm , κιν. φάση υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,1M (Α), μεθανόλη (Β) και ακετονιτρίλιο (Γ), ροή κιν. φάσης = 1.8 ml / min.

Τα LC-MS αποτελέσματα, επιδεικνύουν σε χρόνο ανάσχεσης RT= 12.4 min ένα πρωτονιωμένο μοριακό ιόν το $[M+H]^+ = 197$ (Εικ. 3.37).



Εικόνα 3.37 : APCI (+) φάσμα ιόντων της κορυφής με RT= 12.4 min, από το εκχύλισμα του βακτηρίου *Pseudomonas aureofaciens* PGS 12.

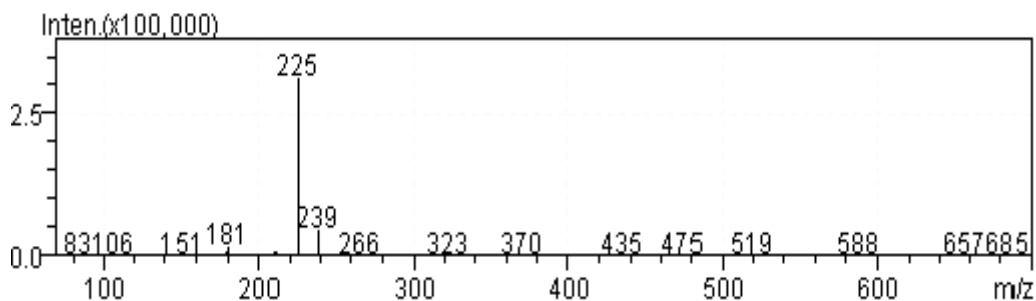
Στο φάσμα απορρόφησης της κορυφής αυτή παρουσιάζονται χαρακτηριστικά μέγιστα σε μήκη κύματος $\lambda_1 = 255$ nm και $\lambda_2 = 365$ nm (Εικ. 3.38).



Εικόνα 3.38 : Φάσμα απορρόφησης της κορυφής σε RT= 12.4 min, από το εκχύλισμα του βακτηρίου *Pseudomonas aureofaciens* PGS 12.

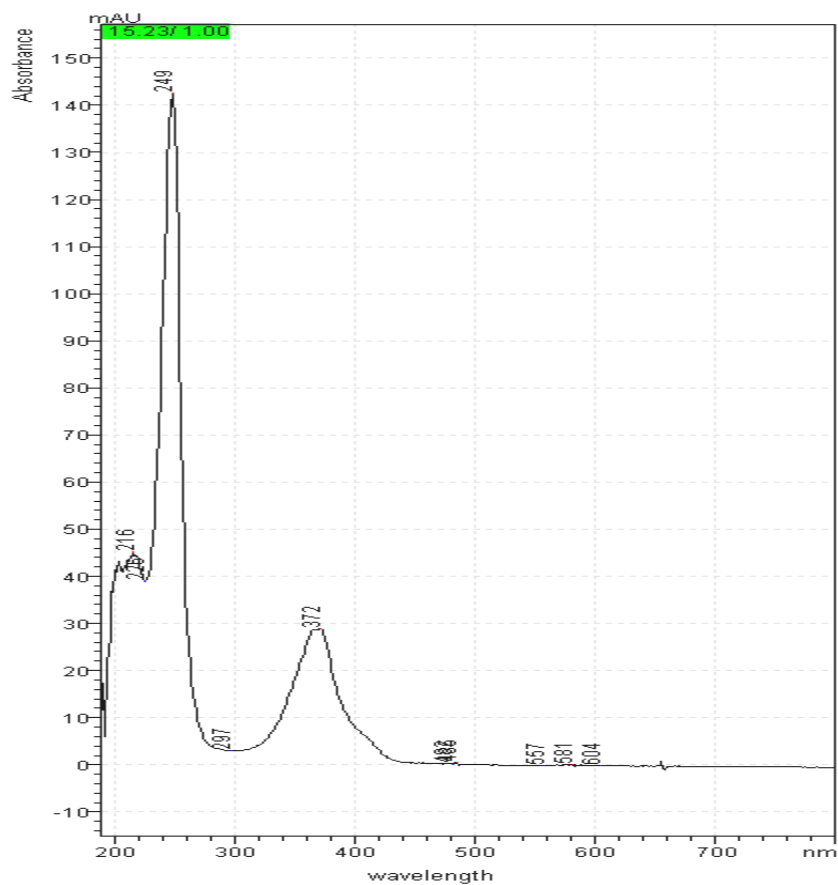
Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τη δομή της 2-υδρόξυ-φαιναζίνης σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα (Delaney *et al.*, 2001, Dyer *et al.*, 2007).

Η κορυφή σε $RT= 15.2 \text{ min}$, έδωσε ένα πρωτονιωμένο μοριακό ιόν το $[M+H]^+ = 225$ (Εικ. 3.39).



Εικόνα 3.39 : APCI (+) φάσμα ιόντων της κορυφής με $RT= 15.2 \text{ min}$, από το εκχύλισμα του βακτηρίου *Pseudomonas aureofaciens* PGS 12.

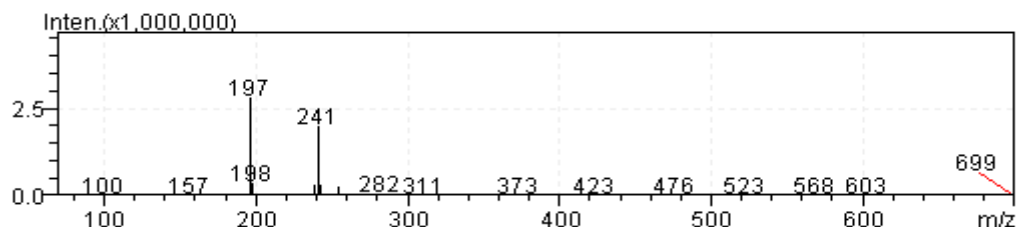
Το φάσμα απορρόφησης του εμφάνιζε δύο μέγιστα σε μήκη κύματος $\lambda_1= 249 \text{ nm}$ και $\lambda_2=372 \text{ nm}$ (Εικ. 3.40).



Εικόνα 3.40 : Φάσμα απορρόφησης της κορυφής με $RT= 15.2 \text{ min}$, από το εκχύλισμα του βακτηρίου *Pseudomonas aureofaciens* PGS 12.

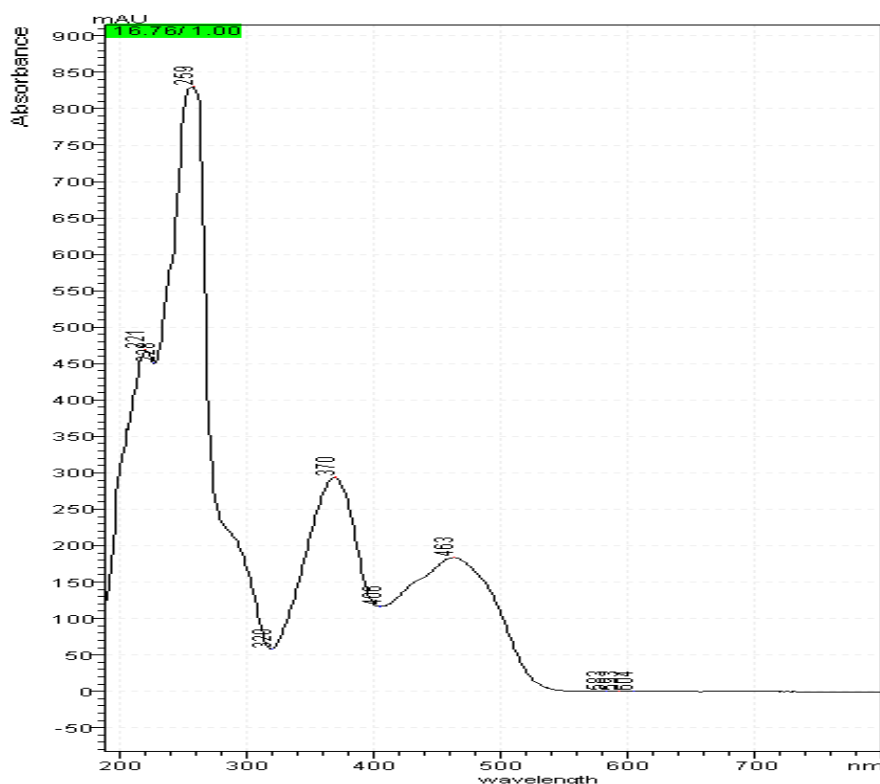
Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τη δομή της φαιναζίνης -1-καρβοξυλικό-οξύ σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα (Brisbane *et al.*, 1987).

Η κορυφή σε $RT= 16.9 \text{ min}$, έδωσε ένα πρωτονιωμένο μοριακό ιόν το $[M+H]^+ = 241$ (Εικ. 3.41).



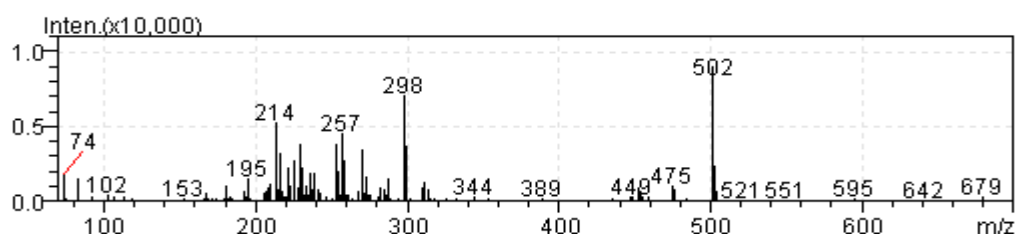
Εικόνα 3.41 : APCI (+) φάσμα ιόντων της κορυφής με $RT= 16.9 \text{ min}$, από το εκχύλισμα του βακτηρίου *Pseudomonas aureofaciens* PGS 12.

Το φάσμα απορρόφησής του εμφάνιζε τρία μέγιστα στα μήκη κύματος $\lambda_1= 259 \text{ nm}$ και $\lambda_2=370 \text{ nm}$ και $\lambda_3= 463 \text{ nm}$ (Εικ. 3.42). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τη δομή της 2-υδρόξυ φαιναζίνης -1-καρβοξυλικό οξύ (Raaijmakers *et.al.*, 1997).



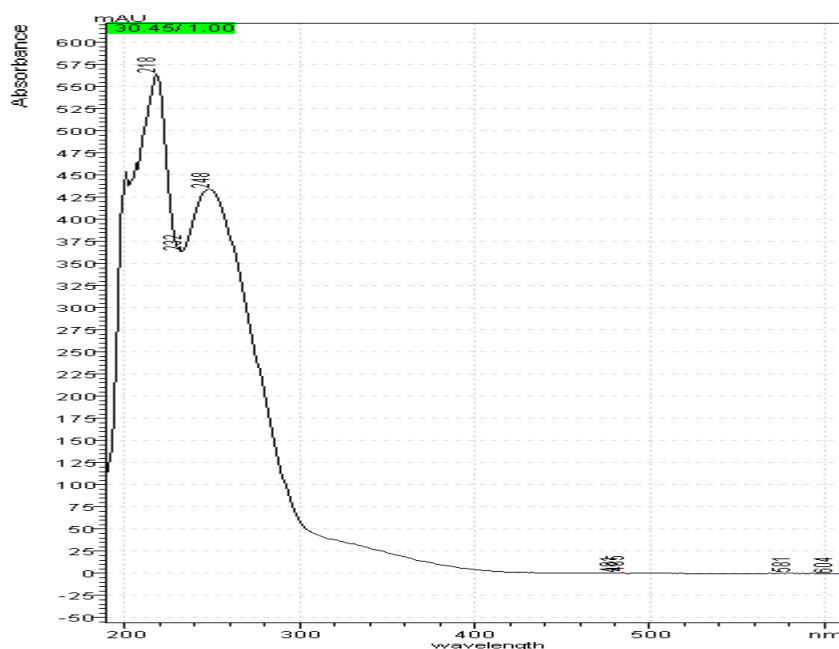
Εικόνα 3.42 : Φάσμα απορρόφησης της κορυφής με $RT= 16.9 \text{ min}$, από το εκχύλισμα του βακτηρίου *Pseudomonas aureofaciens* PGS 12.

Τέλος, η κορυφή σε χρόνο ανάσχεσης $RT_3 = 30.5$ min, έδωσε το πρωτονιωμένο μοριακό ιόν το $[M+H]^+ = 257$ (Εικ. 3.43).



Εικόνα 3.43 : APCI (+) φάσμα ιόντων της κορυφής με $RT= 30.5$ min, από το εκχύλισμα του βακτηρίου *Pseudomonas aureofaciens* PGS 12..

Το φάσμα απορρόφησής του εμφάνιζε δυο μέγιστα σε μήκη κύματος $\lambda_1= 218$ nm και $\lambda_2=248$ nm (Εικ. 3.44), που συμφωνούν με τη δομή της πυρρολνιτρίνης (Banna *et. al.*, 1998). Το φάσμα απορρόφησης καθώς και το φάσμα μάζας της τελευταίας ουσίας, συγκρίθηκε με τα αντίστοιχα φάσματα πρότυπης ουσίας πυρρολνιτρίνης, που είχε αγοραστεί από την εταιρεία Sigma και τα αποτελέσματα των αναλύσεων είχαν απόλυτη ταύτιση.

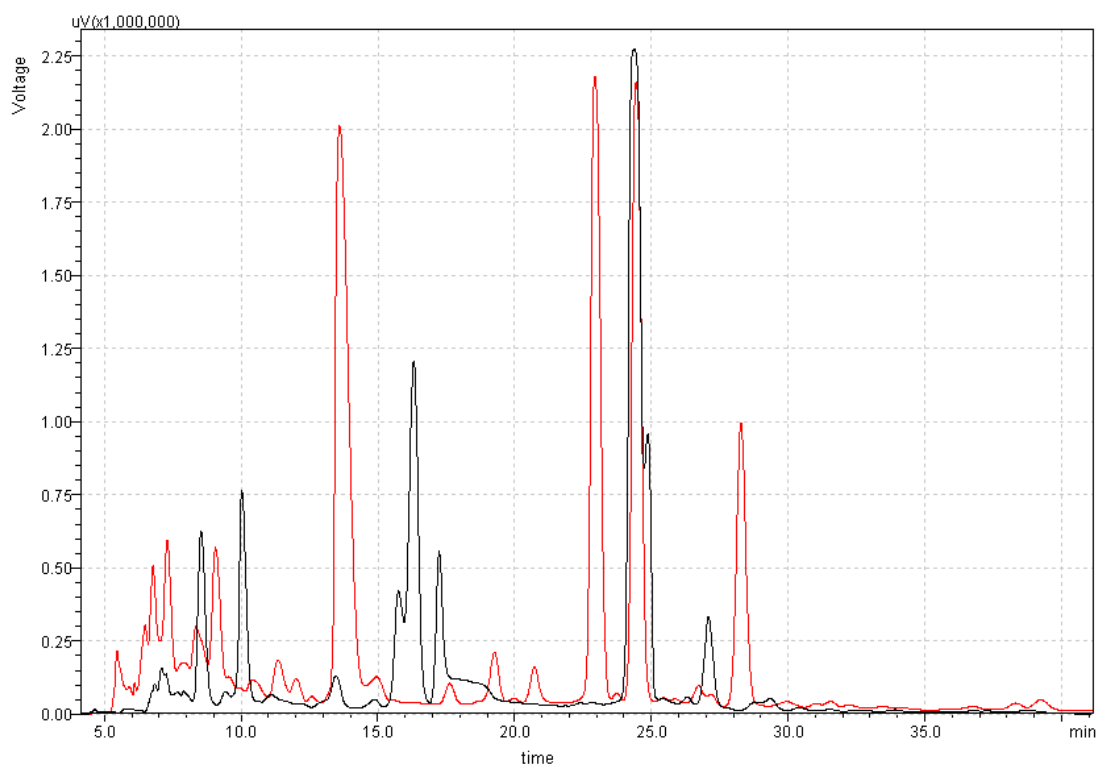


Εικόνα 3.44 : Φάσμα απορρόφησης της κορυφής με $RT= 30.5$ min, από το εκχύλισμα του βακτηρίου *Pseudomonas aureofaciens* PGS 12.

Από τη σύγκριση των χρωματογραφημάτων του εκχυλίσματος του *Ps. fluorescens* X1 και του εκχυλίσματος του βακτηρίου PGS 12 καθώς και από τα φάσματα μάζας των κορυφών τους προκύπτει ότι στο εκχύλισμα του *Ps. fluorescens* X1 δεν περιέχονται καμία από τις τρεις φαιναζίνες ούτε και η πυρρολνιτρίνη.

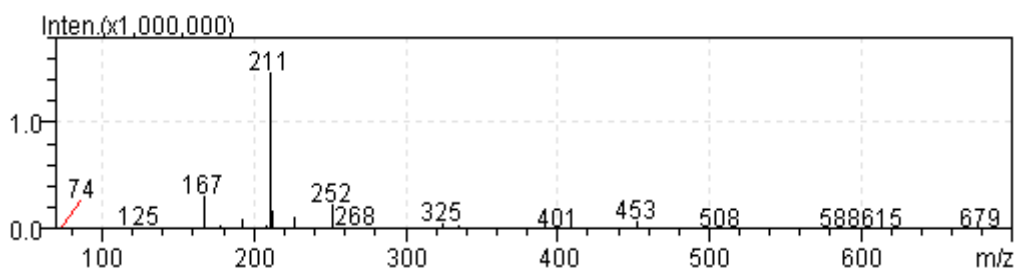
3.6.2. Χρωματογραφική ανάλυση εκχυλίσματος *Pseudomonas fluorescens* CHA0

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της HPLC ανάλυσης των εκχυλισμάτων των βακτηρίων *Ps. fluorescens* CHA0 (μαύρο γράφημα) και *Ps. fluorescens* X1 διαπιστώθηκε η παρουσία μιας κοινής κορυφής σε χρόνο ανάσχεσης $RT_1 = 24.3$ min (Εικ. 3.45).



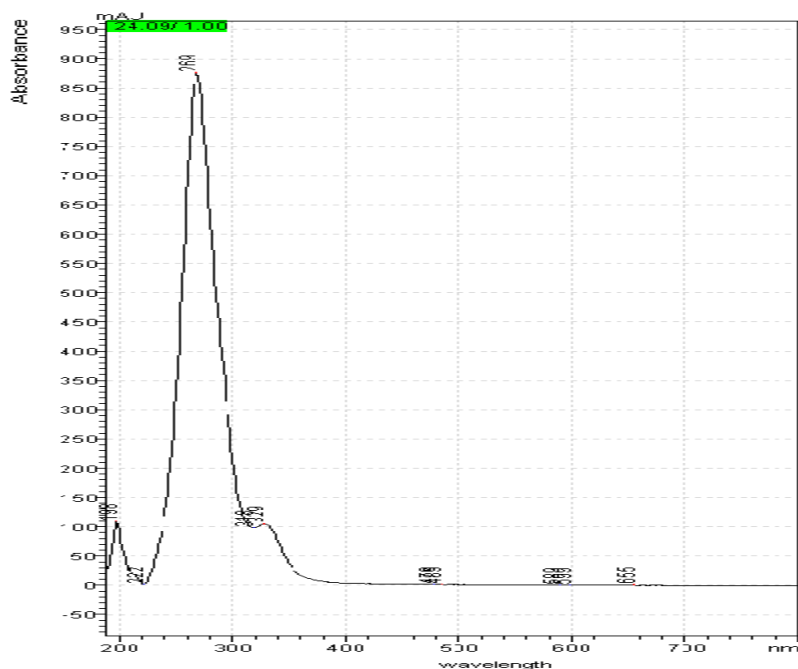
Εικόνα 3.45 : Συγκριτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων από τη χρωματογραφική ανάλυση του εκχυλίσματος του άγριου τύπου του *Ps. fluorescens* X1 (κόκκινο γράφημα) και του βακτηρίου *Ps. fluorescens* CHA0 (μαύρο γράφημα), με αναλυτική στήλη C_{18} , 5 μ m, κιν. φάση υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,1M (A), μεθανόλη (B) και ακετονιτρίλιο (Γ), ροή κιν. φάσης = 1.8 ml/min.

Σύμφωνα με το χρωματογράφημα του *Ps. fluorescens* CHA0, το φάσμα μάζας της κορυφής αυτής έδωσε ένα πρωτονιωμένο μοριακό ιόν το $[M+H]^+ = 211$ (Εικ. 3.46).



Εικόνα 3.46 :APCI (+) φάσμα ιόντων της κορυφής με $RT= 24.3 \text{ min}$, από το εκχύλισμα του βακτηρίου *Ps. fluorescens* CHA0.

Το φάσμα απορρόφησης του εμφάνιζε τα μέγιστα μήκη κύματος $\lambda_1= 269 \text{ nm}$ και $\lambda_2=329 \text{ nm}$ (Εικ. 3.47). Με βάση τη βιβλιογραφία, τα δεδομένα αυτά συμφωνούσαν με τη δομή της 2,4 διακετύλοφλορογλουκινόλης (Keel *et. al.*, 1992, Raaijmakers *et .al.*, 1999). Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώθηκαν επίσης και από αντίστοιχη ανάλυση προτύπου διαλύματος της εν λόγω ουσίας που είχε προμηθευτεί το εργαστήριο.



Εικόνα 3.47 : Φάσμα απορρόφησης της κορυφής με $RT= 24.3 \text{ min}$, από το εκχύλισμα του βακτηρίου *Ps. fluorescens* CHA0

Η αρχική υπόθεση για την παρουσία της 2,4 διακετυλοφλορογλουκινόλης απορρίφθηκε διότι το μόνο στοιχείο που συμφωνούσε με τα δεδομένα της παρουσίας της αντιμικροβιακής αυτής ένωσης ήταν ο χρόνος ανάσχεσης.

Κεφάλαιο 4^ο Συμπεράσματα

Οι φθορίζουσες ψευδομονάδες προσφέρουν μια μορφή προστασίας των φυτών από τις προσβολές ορισμένων φυτοπαθογόνων μυκήτων, παράγοντας μια σειρά από αντιμικροβιακές ενώσεις, πολλές από τις οποίες έχουν ταυτοποιηθεί πλήρως και είναι γνωστές από τη βιβλιογραφία (Haas *et al.*, 2003). Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* στέλεχος X έδειξε πολύ καλή αποτελεσματικότητα στην καταστολή των προσβολών του φυτοπαθογόνου μύκητα *Pythium ultimum* στο αγγούρι και στο ζαχαρότευτλο σε πειράματα θερμοκηπίου (Georgakopoulos *et al.*, 2002). Ο μηχανισμός δράσεως του X δεν είχε διερευνηθεί γενετικά και βιοχημικά. Η προτεινόμενη έρευνα είχε ως στόχο το γενετικό χαρακτηρισμό της ανταγωνιστικής δράσης του X. Για τον σκοπό αυτό αποκτήθηκαν μεταλλάξεις απώλειας παρεμπόδισης του παθογόνου και κατασκευάστηκε γενωμική βιβλιοθήκη του βακτηρίου για την κλωνοποίηση γονιδίων που επανορθώνουν τις μεταλλάξεις (Κρεμμύδας, αδημοσίευτα δεδομένα). Στην παρούσα εργασία τα μεταλλαγμένα στελέχη χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά με τον άγριο τύπο, για την απομόνωση των ενώσεων στις οποίες οφείλεται η ανταγωνιστική δράση του X με την μέθοδο HPLC-MS. Το βασικό ερώτημα που απαντήθηκε στην παρούσα διατριβή είναι ότι το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* στέλεχος X παράγει μια σειρά από αντιμικροβιακές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, οι οποίες κατατάσσονται στην κατηγορία των αντιβιοτικών ενώσεων. Παράλληλα, δόθηκαν στοιχεία σχετικά με τη δομή και το μοριακό βάρος των αντιμικροβιακών μεταβολιτών. Τέλος, μια εκ των ενώσεων αυτών αποδείχτηκε ότι ανήκει στην ομάδα τοξινών.

Η απομόνωση των αντιμικροβιακών ενώσεων, πραγματοποιείται από τα θρεπτικά μέσα στα οποία έχουν καλλιεργηθεί τα βακτηριακά στελέχη, μετά την απομάκρυνση των κυττάρων με φυγοκέντρηση και διήθηση. Υπάρχουν αρκετές παραλλαγές της αρχικής μεταχείρισης του υπερκειμένου της υγρής ή στερεής

καλλιέργειας. Το υπερκείμενο μπορεί να περάσει μέσα από στήλη πυριτίου για κατακράτηση μεταβολιτών, οι οποίοι στη συνέχεια εκχυλίζονται με οργανικούς διαλύτες και συμπυκνώνονται. Άλλη μέθοδος περιλαμβάνει την απευθείας συμπύκνωση του υπερκειμένου σε κενό. Οι συμπυκνωμένοι μεταβολίτες αναλύονται σε στήλη HPLC. Τα επί μέρους τμήματα του υπερκειμένου συλλέγονται και αναλύονται οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του καθενός σε καλλιέργειες φυτοπαθογόνων μυκήτων *in vitro* (Schugerl & Seidel, 1998, Levenfors *et al.*, 2004). Ο χαρακτηρισμός και η ταυτοποίηση των παρεμποδιστικών ενώσεων γίνεται με χρήση αέριας χρωματογραφίας συνδυασμένης με φασματομετρία μαζών (GC-MS), με αναλυτική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης συνδυασμένης με Φασματοσκοπία υπεριώδους - ορατού και φασματομετρία μαζών (HPLC-UV-Vis-MS) καθώς και με τις φασματοσκοπικές τεχνικές υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR), Raman με μετασχηματισμό Fourier (FT-Raman) και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Οι χρωματογραφικές τεχνικές χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό πολύπλοκων βιολογικών δειγμάτων στα συστατικά τους. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της αέριας χρωματογραφίας (GC) είναι οι εξεταζόμενες ουσίες να είναι πτητικές ή να μετατρέπονται σε πτητικά παράγωγα με κατάλληλα αντιδραστήρια

Το θρεπτικό μέσον στο οποίο αναπτύσσεται το βακτήριο καθορίζει σε μεγάλο βαθμό το είδος και την συγκέντρωση των αντιμικροβιακών μεταβολιτών που παράγονται από αυτό (Douglas *et al.*, 1986, Shanahan *et al.*, 1992, Lorian, 1999). Οι βιολογικοί παράγοντες καταστολής αναπτύσσονται στη ριζόσφαιρα ή στην φυλλόσφαιρα χρησιμοποιώντας σαν τροφή πολλές από τις φυτικές εκκρίσεις. Η παρουσία τέτοιων ενώσεων στο μέσο ανάπτυξής τους, κατά την καλλιέργειά τους *in vitro*, είναι δυνατόν να επηρεάσει το μεταβολισμό τους και ποιο συγκεκριμένα να επηρεάσει τη έκφραση γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στη βιοσύνθεση αντιβιοτικών (Raaijmakers J.M. *et al.*, 2002).

Στην παρούσα διατριβή αρχικά επιχειρήθηκε να βρεθεί το πιο κατάλληλο θρεπτικό μέσον επώασης του *Ps. fluorescens* X1, στο οποίο θα μπορούσε το βακτήριο να συνθέσει τους αντιμικροβιακούς του μεταβολίτες. Με μια σειρά πειραμάτων, διαπιστώθηκε ότι τα καταλληλότερα θρεπτικά μέσα ήταν αυτά που περιείχαν ως πηγή άνθρακα τη γλυκόζη. Συγκεκριμένα, αποδείχτηκε ότι, το εκχύλισμα του βακτηριακού στέλεχος X1 που προέκυψε μετά από την καλλιέργειά του στα θρεπτικά υλικά PDA και PDB, παρουσίαζε έντονη αντιμικροβιακή δράση

εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *P. ultimum* κατά την *in vitro* μελέτη με βιοδοκιμή. Αντιθέτως, κανένα από τα εκχυλίσματα του X1 που παρελήφθησαν από τα θρεπτικά υλικά Luria Agar (LA), Malt Agar (MA), Potato Agar (PA) και Nutrient Agar (NA) δεν εμφάνισαν ενδείξεις για αντιμικροβιακή δράση. Στα υποστρώματα αυτά υπάρχει ελάχιστη ή καθόλου γλυκόζη ως πηγή άνθρακα.

Τα εκχυλίσματα του *Ps. fluorescens* X1 από τα θρεπτικά υλικά PDA και PA, αναλύθηκαν στη συνέχεια χρωματογραφικά. Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκε μια μέθοδος ανάλυσης με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Με RP-HPLC, συνδυασμένη με ανιχνευτή UV και κινητή φάση ακετονιτρίλιο /νερό ή μεθανόλη/ νερό, έχουν διαχωριστεί οι περισσότεροι γνωστοί δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas fluorescens* (Raaijmakers, *et al.*, 1999; Ayyadurai *et al.*, 2006; Marchant *et al.*, 2000, Schugerl *et al.*, 1998).

Τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης έδειξαν ότι στο χρωματογράφημα του *Ps. fluorescens* X1 απεικονίζονταν χαρακτηριστικές κορυφές που ονομάστηκαν κ-1, κ-2, κ-3 και κ-4, από τις οποίες οι κ-1, κ-2 και κ-3 παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση. Η χρωματογραφική ανάλυση του εκχυλίσματος του *Ps. fluorescens* X1 από το θρεπτικό υλικό PA έδειξε ότι η παραγωγή των αντιμικροβιακών ουσιών κ-1, κ-2 και κ-3 επηρεάστηκε σημαντικά από την έλλειψη της γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό. Συγκεκριμένα, η κ-1 απουσίαζε εντελώς ενώ οι κ-2 και κ-3 εμφανίστηκαν σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Μετρώντας το pH της καλλιέργειας του αγρίου τύπου του *Ps. fluorescens* X1 όταν αυτό καλλιεργήθηκε σε PDA παρατηρήθηκε μείωση αυτού (από pH =7 σε pH =3,6), ενώ αντίθετα, το pH της καλλιέργειας του *Ps. fluorescens* X1 στο PA, παρέμεινε σταθερό (pH =7.5).

Αντίστοιχα αποτελέσματα με αυτά του *Ps. fluorescens* X1 στο PA έδωσαν τα μεταλλαγμένα στελέχη k36, w139, p26, B163, B91 και r48 όταν καλλιεργήθηκαν στα θρεπτικά υλικά PDA και PA. Κατά τις *in vitro* βιοδοκιμές που ακολούθησαν παρατηρήθηκε κανονική ανάπτυξη του μύκητα στα τρυβλία όπου είχαν εναποτεθεί τα εκχυλίσματα των μεταλλαγμένων στελεχών. Ουσιαστικά, δηλαδή, τα μεταλλαγμένα στελέχη δεν ασκούσαν καμία παρεμποδιστική δράση στην ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *P. ultimum* και το pH της καλλιέργειας στα θρεπτικά υλικά PDA και PA παρέμεινε σταθερό (pH =7.5).

Από προηγούμενη μελέτη (Κρεμμύδας, αδημοσίευτα δεδομένα) ήταν ήδη γνωστό ότι όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη είχαν χάσει την ικανότητα να συνθέτουν είτε το ένζυμο αφυδρογονάση της γλυκόζης, είτε την ουσία 4,5-διόξο-1H-πυρρόλο[5-

4-φ]κινολίνη-2,7,9-τρικαρβοξυλικό-οξύ, (pyrroloquinoline quinone), η οποία δρα ως συμπάραγοντας της αφυδρογονάσης της γλυκόζης, άρα απαραίτητος για το μεταβολισμό της γλυκόζης. Επίσης, όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη δεν εκδήλωσαν αντιμικροβιακή δράση στα *in vitro* πειράματα.

Μια λογική εξήγηση θεωρήθηκε η ανάμειξη της αφυδρογονάσης της γλυκόζης στη βιοσύνθεση των αντιμικροβιακών ενώσεων. Ενδεχομένως η έλλειψη της αφυδρογονάσης της γλυκόζης να συντέλεσε στην απώλεια της ικανότητας για αντιμικροβιακή δράση στα μεταλλαγμένα στελέχη, όπως ακριβώς και η απουσία της γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό που αναπτύχθηκε το *Ps. fluorescens* X1. Η παραγωγή συνεπώς των αντιμικροβιακών ουσιών συνδέθηκε με το οξειδωτικό μονοπάτι του μεταβολισμού της γλυκόζης.

Χαρακτηριστικές είναι οι αναφορές σύμφωνα με τις οποίες η παραγωγή ενός αντιβιοτικού εξαρτάται σε τόσο μεγάλο βαθμό από την ύπαρξη γλυκόζης στο μέσο ανάπτυξης ώστε να μην παρατηρείται παραγωγή του αντιβιοτικού παρά μόνο όταν ο μικροοργανισμός εφοδιάζεται με κάποια πηγή γλυκόζης (Gutterson N.I. *et al*, 1986; James D.W. *et al*, 1986; Gutterson N.I. *et al*, 1988). Σε πρόσφατη επιστημονική μελέτη (de Werra P. *et al*, 2009) μάλιστα υποστηρίζεται ότι αυτό που παίζει ουσιαστικό ρόλο στην ρύθμιση της παραγωγής των αντιβιοτικών δεν είναι η συγκέντρωση της γλυκόζης αλλά του γλυκονικού οξέος. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι τεκμηριωμένος.

Το παραπάνω συμπέρασμα της μελέτης ενισχύθηκε και από την υπόθεση ότι ο άγριος τύπος του βακτηρίου μεταβολίζει κανονικά τη γλυκόζη με αποτέλεσμα να παράγεται γλυκονικό οξύ και να οξινίζεται το θρεπτικό μέσον στο οποίο αναπτύχθηκε το *Ps. fluorescens* X1, σε αντίθεση με τα μεταλλαγμένα στελέχη που δεν μεταβολίζουν κανονικά τη γλυκόζη με αποτέλεσμα να μην παράγεται γλυκονικό οξύ στο θρεπτικό μέσον ανάπτυξης αυτών των βακτηρίων. Στην παρούσα μελέτη αποδείχτηκε πειραματικά ότι οι αντιμικροβιακές ενώσεις δεν παράγονται ή παράγονται σε πολύ μικρότερες ποσότητες σε θρεπτικά υποστρώματα χωρίς γλυκόζη ή με χαμηλά επίπεδα γλυκόζης. Ενδεχομένως, λοιπόν, με αυτό τον τρόπο να επιβεβαιώνεται ο ρόλος της γλυκόζης στην αντιμικροβιακή δράση του X.

Πολλοί αντιμικροβιακοί μεταβολίτης έχουν διαχωριστεί με RP-HPLC με κινητή φάση μεθανόλη και νερό και ανιχνευτή UV (254 nm) και έχουν ταυτοποιηθεί με χρήση GC-MS, APCI-MS, ¹H NMR (Chen *et. al.*, 2008; Liu *et. al.*, 2007). Επιστρέφοντας, λοιπόν, και πάλι στις 'ύποπτες' χρωματογραφικές κορυφές κ-

1, κ-2, κ-3 και κ-4, που παρατηρήθηκαν στο χρωματογράφημα του άγριου τύπου του βακτηρίου και απουσίαζαν από τα χρωματογραφήματα των μεταλλαγμάτων, αναπτύχθηκε μια μέθοδος εκλεκτικών εκχυλίσεων και στη συνέχεια μια μέθοδος ημιπαρασκευαστικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, προκειμένου να απομονωθούν σε πιο καθαρή μορφή.

Κατά την παραλαβή των αντιμικροβιακών ενώσεων με διαλύτη εκχύλισης τον οξικό αιθυλεστέρα, διαπιστώθηκε ότι το δείγμα του αγρίου τύπου του *Ps. fluorescens* X1 έδωσε ένα αρκετά πολύπλοκο χρωματογράφημα που περιείχε ένα πολύ μεγάλο πλήθος από αναλύτες που συνεκχλύστηκαν μαζί με τις αντιμικροβιακές ουσίες 'στόχους' της εργασίας. Με εφαρμογή της μεθόδου της εκλεκτικής εκχύλισης το αρχικά σύνθετο χρωματογράφημα διαχωρίστηκε σε περιοχές ενδιαφέροντος που μελετήθηκαν ξεχωριστά. Αναπτύχθηκε στη συνέχεια μέθοδος απομόνωσης των κ-1, κ-2, κ-3 και κ-4 με ημιπαρασκευαστική υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, και πάλι ωστόσο οι αντιμικροβιακές ουσίες δεν απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή.

Χαρακτηριστικά είναι τα παραδείγματα της απομόνωσης ενώσεων με την τεχνική TLC και της ταυτοποίηση γνωστών επιφανειοδραστικών ραμνολιπιδίων με και APCI-MS, FAB-MS, ^1H και ^{13}C NMR (Schenk *et. al.*, 1995; Gunther *et. al.*, 2005).

Για το σκοπό αυτό στην πορεία της απομόνωσης αποφασίστηκε να προστεθεί άλλο ένα στάδιο, που θα περιελάμβανε μια πρώτη παραλαβή των κλασμάτων με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Από την TLC ανάλυση των εκχυλισμάτων διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα κ-2, κ-3 και κ-4 δεν ανιχνεύτηκαν καθόλου στην πλάκα χρωματογραφίας και το μόνο κλάσμα που εντοπίστηκε και απομονώθηκε ήταν το κ-1. Το ποσοστό ανάκτησης της κ-1, όμως, με τη μέθοδο αυτή ήταν πολύ μικρό. Όταν επιχειρήθηκε, συνεπώς, ο περαιτέρω καθαρισμός του κ-1 με ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία, τα αποτελέσματα της UHPLC-MS ανάλυσης έδειξαν ότι το τελικό προϊόν ήταν πιο καθαρό, όμως η ποσότητα του τελικού δείγματος ήταν ελάχιστα mg.

Για την κορυφή κ-1, περαιτέρω ανάλυση με τις τεχνικές UHPLC-MS και FT-IR έδειξαν ότι πιθανότατα πρόκειται για ένωση με μικρό μοριακό βάρος και μάλιστα υπήρχαν ισχυρές ενδείξεις για την παρουσία αμιδικού δεσμού, από τα αποτελέσματα της FT-IR ανάλυσης. Πιθανότατα, λοιπόν, το μόριο να αντιστοιχεί σε κάποια τοξίνη, με δομή πεπτιδίου ή αμινοξέως.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασαν επίσης τα κλάσματα κ-2 και κ-3. Από την σύγκριση των προτεινόμενων μοριακών τύπων που αποδόθηκαν στα κλάσματα 2 και

3, παρατηρήθηκε ότι είχαν ακριβώς τις ίδιες μοριακές δομές $C_9H_{15}O_2N_3$. Συγκρίνοντας επίσης τα φάσματα ιόντων τους, διαπιστώθηκε ότι τα δυο αυτά κλάσματα έδωσαν παρόμοιες θραύσεις ιόντων αλλά σε διαφορετική σχετική αναλογία. Συγκεκριμένα οι θραύσεις με λόγο m/z 179, 169 151 είχαν διαφορετική αναλογία στο κ-2 και διαφορετική αναλογία στο κ-3. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τα εντελώς πανομοιότυπα φάσματα απορρόφησής τους αποδεικνύει ότι οι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν μεταξύ τους φαινόμενο ισομέρειας.

Το κλάσμα κ-4 δεν παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση, ωστόσο επειδή η αρχική υπόθεση ήταν ότι μπορεί να σχετίζεται με την παρουσία των δύο κλασμάτων κ-2 και κ-3, συμπεριλήφθηκε και αυτό στη μελέτη. Η πρώτη χαρακτηριστική διαπίστωση για το κλάσμα αυτό ήταν ότι το μοριακό του βάρος βρέθηκε ελαττωμένο κατά 16 μονάδες σε σχέση με το μοριακό βάρος των κ-2 και κ-3 και η δομή που προτάθηκε για το μόριο αυτό έδειχνε να έχει χάσει ένα άτομο οξυγόνου ($C_9H_{15}ON_3$). Εδώ, λοιπόν γεννιάται ένα ερώτημα: υπάρχει περίπτωση η απώλεια αυτού του ατόμου να οδήγησε στην απενεργοποίηση της αντιμικροβιακής δράσης ολόκληρου του μορίου; Απάντηση στο ερώτημα δεν μπορεί προς το παρόν να δοθεί σύμφωνα με τα δεδομένα που διαθέτουμε. Ενδεχομένως εάν οι δομές των κορυφών κ-2, κ-3 και κ-4 είχαν πλήρως ταυτοποιηθεί, η απάντηση να ήταν αρκετά απλή. Ωστόσο, παρά την προσεκτική απομόνωση των κλασμάτων αυτών με τη βοήθεια της ημιπαρασκευαστικής χρωματογραφίας, τα τελικά δείγματα δεν ήταν αρκετά καθαρά με αποτέλεσμα να μην είναι εύκολη η ερμηνεία των NMR φασμάτων τους, που θα έδινε πολλά στοιχεία σχετικά με τη δομή των κορυφών αυτών.

Με την τεχνική της παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας, απομονώθηκε μια ζώνη η (Qa), η οποία ασκούσε ισχυρή παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Pythium ultimum*, σε *in vitro* βιοδοκιμές. Η ζώνη αυτή καθαρίστηκε περαιτέρω με εκχύλιση στερεάς φάσης, ωστόσο η GC-MS ανάλυση του δείγματος έδειξε ότι και πάλι δεν καταλήξαμε σε έναν αναλύτη αλλά σε μίγμα αναλυτών. Τα ίδια αποτελέσματα έδωσε επίσης η ανάλυση με την τεχνική NMR.

Από το μίγμα αυτό, καταβυθίστηκε και ταυτοποιήθηκε με NMR και GC-MS το παλμιτικό οξύ, ωστόσο το παλμιτικό οξύ δεν εμφάνισε δείγματα αντιμικροβιακής δράσης, ούτε έχει ποτέ συνδεθεί με αντιμικροβιακή δράση. Η ανάλυση της ζώνης Qa σταμάτησε στο σημείο αυτό χωρίς να μπορούν να δοθούν στοιχεία σχετικά με τη φύση, τη δομή ή τον μοριακό τύπο και βάρος του αναλύτη που προκάλεσε την παρατηρούμενη παρεμπόδιση, στο μίγμα αυτό.

Προκειμένου, τέλος, να απαντηθεί το ερώτημα εάν οι ‘ύποπτες’ ουσίες με αντιμικροβιακή δράση της παρούσας διατριβής αντιστοιχούν σε κάποια από τις ήδη γνωστές και ταυτοποιημένες αντιμικροβιακές ενώσεις της βιβλιογραφίας, πραγματοποιήθηκε συγκριτική βιβλιογραφική αλλά και χρωματογραφική ανάλυση αυτών με μια σειρά από ήδη γνωστές και ταυτοποιημένες αντιμικροβιακές ενώσεις (Liu *et.al.*, 2007; Dyer *et.al.*, 2007, Raaijmakers *et.al.*,1997, Brisbane *et. al.*, 1987, Marchant *et. al.*, 2000). Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι οι ουσίες με αντιμικροβιακή δράση που απομονώθηκαν από την καλλιέργεια του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* X1 δεν αντιστοιχούν σε κάποια από τις ήδη γνωστές και ταυτοποιημένες ενώσεις της βιβλιογραφίας. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τα ως τώρα πειραματικά αποτελέσματα ίσως αποτελέσει κίνητρο για την περαιτέρω μελέτη του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* X και των ουσιών που παράγει.

Βιβλιογραφία

Agrios, G. N. 1996. "Plant pathology". 4th edn. Academic Press, San Diego, California, USA.

Akiyoshi, D. E., D. A. Regier and M. P. Gordon, 1987. Cytokinin production by *Agrobacterium* and *Pseudomonas* spp. *J Bacteriol.*, 169(9): 4242-4248

Andriollo, N., A. Guarini, and G. Cessani, 1992. Isolation and characterization of Pseudobactin B: A Pseudobactin-type siderophore from *Pseudomonas* Species strain PD 30. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**: 1246-1248.

Anjiah, V., N. Koedam, B. Nowak-Thompson, J. E. Loper, M. Höfte, J. T. Tambong and P. Cornelis, 1998. Involvement of phenazines and anthranilate in the antagonism of *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 and Tn5 derivatives toward *Fusarium* spp. and *Pythium* spp. *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, **11**: 847-854.

Arima, K., I. Imanaka, M. Kousaka, A. Fukuta and G. Tamura, 1964. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. *Agr. Biol. Chem.*, **28**: 575-576.

Ayyadurai, N., N. P. Ravindra, M. R. Sreehari, R. K. Sunish, S. K. Samrat, M. Manohar and N. Saktivel, 2006. Isolation and characterization of a novel banana rhizosphere bacterium as a fungal antagonist and microbial adjuvant in micropropagation of banana. *The Society of Applied Microbiology*, **100**: 926-937.

Baker, C.A. and J. M. Hemis, 1990. Commercial production and formulation of microbial biocontrol agents. In : *New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressive Agricultural Pests and Diseases* (R.A. Baker and P.E. Dunn, eds), Alan Liss, NY.

Baker, K. F., 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review Phytopathology*, **25**: 67-85.

Baker, K. F. and R. J. Cook, 1974. Biological control of plant pathogens. W.H Freeman. San Francisco, 433 pp.

Banna, N., El. and G. Winkelmann, 1998. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. *Journal of Applied Microbiology*, **85**: 69-78.

Barofky, D.F., 1999. Mass Spectrometric Analyses in Agriculture and Natural Product Research. *Brazilian Journal of Physics*, **29**: 432-439.

Baron, S. S. and J.J. Rowe, 1981. Antibiotic action of pyocyanin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **20**: 814-820.

Bartel, B.,1997. Auxin biosynthesis. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **48** : 51.

Bashan, Y. and G. Holguin, 1997. Proposal for the division of plant-growth promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem.*, **30**: 1225-1228.

Becker, J. O. and F., Schwinn, 1993. Control of soil borne-pathogens with living bacteria and fungi : status and outlook. *Pesticide science*, **37**: 355-363.

Bowen, GD and A. D., Rovira, 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Agron.*, **66**: 1-102.

Brisbane, P. G., L. J. Janik, M. E. Tate and Warren R. F., 1987. Revised Structure for the Phenazine Antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* 2-79 (NRRL B-15132). *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, **31**: 1967-1971.

Broadbent, P., K. F. Baker and Y. Waterworth, 1971. Bacteria and actinomycetes antagonistic to root pathogens in Australian soils. *Australian Journal of Biology*, **24**: 925-930.

Burkhead, K. D., D. A. Schisler and P. J. Slininger, 1994. Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds of potatoes. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**: 2031-2039.

Cartwright, D. K., W. S. Chilton, and D. M. Benson, 1995. Pyrrolnitrin and phenazine production by *Pseudomonas cepacia*, stain 5.5B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*. *Applied and Environmental Biotechnology*, **43**: 211-216.

Chen, K., H. Wang, W. Zhang, X. and Y. Xu, 2008. Metabolic degradation of phenazine-1-carboxylic acid by the strain *Sphingomonas* sp. DP58: the identification of two metabolites. *Biodegradation*, **19**: 659-667.

Chernin, L., A. Brandis, Z. Ismailov, and I. Chet, 1996. Pyrrolnitrin production by an *Enterobacter agglomerans* strain with a broad spectrum of antagonistic activity towards fungal and bacterial phytopathogens. *Current Microbiology*, **32**: 208-212.

Chin-A-Woeng, T. F. C., G. V. Bloemberg, A. J. Van der Bij, K.M.G.M. Van der Drift, J. Schripsema, B. Kroon, R. J. Scheffer, C. Keel, P. A. H. M. Bakker, F. J. de Bruijn, J. E. Thomas-Oates and B. J. J. Lugtenberg, 1998. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, **11** :1069-1077.

Clark, J. M., Switzer Jr and Robert, 1992. Πειραματική βιοχημεία. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.

Cook, R.J. and K.F. Baker 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. *American Phytopathological Society Press*, St. Paul, Minesota, 126-144.

Corcia, A. and M. Nazzari, 2002. Liquid chromatographic-mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. *Journal of Chromatography A*, **974**: 53-89.

Cronin, D., Y. Moenne-Loccoz, A. Fenton, C. Dunne, D. N. Dowling and F. O'Gara, 1997a. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol pseudomonad strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**:1357-1361.

Cronin, D., Y. Moenne-Loccoz, A. Fenton, C. Dunne, D. N. Dowling and F. O'Gara, 1997b. Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4 diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia caratovora* subsp. *atroseptica*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**: 95-106.

de Werra, P. M. Pechy-Tarr, C. Keel and M. Maurhofer 2009. Role of gluconic acid production in the regulation of biocontrol traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 4162-4174.

Delaney, S. M., D. V. Mavrodi, R. F. Bonsall, and L. S. Thomashow, 2001. *phzO*, a Gene for biosynthesis of 2- hydroxylated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Journal of Bacteriology*, **183**: 318-327.

Desai, J. D and I. M. Banat, 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* **61**: 47–64.

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

Duffy, B. K. and G. Défago, 1997. Zinc improves biocontrol of fusarium crown and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacteria antibiotic biosynthesis. *Phytopathology*, **87**: 1250-2157.

Dyer, J. M., S. D. Bringans, G. D. Aitken, N. I. J. and W. G Bryson, 2007. Extraction and characterization of non-scourable chromophores from discoloured fleece wool. *Coloration technology*, **123**: 54-58.

Elander, R. P., J. A. Mabe, R. H. Hamill and M. Gorman, 1968. Metabolism of tryptophans by *Pseudomonas aureofaciens*. VI. Production of pyrrolnitrin by selected *Pseudomonas* spp. *Appl. Microbiol.* **16**:753-758.

Erukhimovitch, V., V. Pavlov, M. Talyshinsky, Y. Souprun and M. Huleihel, 2005. FTIR Microscopy as a Method for Identification of Bacterial and Fungal Infections, *Elsevier, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **37**:1105-1108.

Fakhouri, W., F. Walker, B. Vogler, W. Armbruster and H. Buchenauer, 2001. Isolation and identification of N-mercapto-4-formylcarbostyryl, an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytochemistry*, **58**:1297–1303

Fearson, M. and R. Davis, 1987. Mass Spectrometry Analytical Chemistry by Open Learning, editor F.E. Prichard, John Wiley and Sons, New York, NY.

Fenton, A. M., P. M. Stephens, J. Crowley, M. O' Callaghan and F. O' Gara, 1992. Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3873-3878.

Fiechter, A., 1992. Biosurfactants: moving towards industrial application. *Tibtech*, **10**: 208-217.

Gamard, P., F. Sauriol, N. Benhamou, R. R. Belanger and T. C. Paulitz, 1997. Novel butyrolactones with antifungal activity produced by *Pseudomonas aureofaciens* strain 63-28. *J. Antibiot.*, **50**: 742-749.

Gaskell S. J., 1997. Electrospray: Principles and Practice. *Journal of Mass Spectrometry*, **32**: 677-688.

Georgakopoulos, D. G., P. Fiddaman, C. Leifert and N. E. Malathrakis, 2002. Biological control of cucumber and sugar beet damping-off caused by *Pythium ultimum* with bacterial and fungal antagonists. *Journal of Applied Microbiology*, **92**: 1078-1086.

Georgakopoulos, D. G., M. Henderson, N. J. Panopoulos and M. N. Schroth, 1994. Cloning of a phenazine biosynthetic locus of *Pseudomonas aureofaciens* PGS12 and analysis of its expression *in vitro* with the ice nucleation reporter gene. *Appl Environ Microbiol.*, **60**: 2931-2938.

George, B. and P. McIntyre, 1987. Infrared Spectroscopy. Analytical Chemistry by Open Learning Series. John Wiley and Sons, Chichester.

Gerasimov, A.V., N. V. Gornova and N. V. Rudometova, 2003. Determination of vanillin and ethylvanillin in vanilla flavorings by planar (Thin-Layer) Chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, **58**: 677-684.

Gunther, I.V., N. W. Nunez, A. Fett, W. and D. K. Y. Solaiman, 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 2288-2293.

Gurusiddaiah, S., D.M. Weller, A. Sarkar, and R.J. Cook, 1986. Characterization of an antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Pythium* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **29**: 488-495.

- James, D. W., J. R. and N. I. Gutterson**, 1986. Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37a and their differential regulation by glucose. *Applied and Environmental Microbiology*, **52**: 1183-1189.
- Haas, D.** and C. Keel, 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **41**: 117-153
- Hammer, P. E.,** W. Burd, D.S. Hill, J.M. Ligon and K.H. van Pée, 1999. Conservation of the pyrrolnitrin gene cluster among six pyrrolnitrin-producing strains. *FEMS Microbiology Letters*, **180**: 39-44.
- Hassan, M.** and I. Fridovich, 1980. Mechanism of the antibiotic action of pyocyanine. *Journal of Bacteriology*, **141**: 156-163.
- Hill, D. S.,** J.I. Stein, N. R. Torkewitz, A. M. Morse, C. R. Howell, J. P. Pachlatko, J. O. Becker and J. M. Ligon, 1994. Cloning of genes involved in the synthesis of pyrrolnitrin from *Pseudomonas fluorescens* and role of pyrrolnitrin synthesis in biological control of plant disease. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 78-85.
- Hiramoto, M.,** K. Okada, and S. Nagai, 1970. The revised structure of viscosin, a peptide antibiotic. *Tetrah. Lett.*, **13**: 1087-1090.
- Hokeberg, M.,** S. A. I. Wright, M. Svensson, L. N. Lundgren and B. Gerhardson, 1998. Mutants of *Pseudomonas chlororaphis* defective in the production of an antifungal metabolite express reduced biocontrol activity. *Abstract Proceedings ICPP98*, Edinburg, Scotland.
- Howell, C. R.,** R. D. Stipanovic, 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology*, **69**: 480-482.
- Howell, C. R.,** R. D. Stipanovic, 1980. Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic. *Phytopathology*, **70**: 712-715.

Howie, W. and T. Suslow, 1986. Effect of antifungal compound biosynthesis on cotton root colonization and *Pythium* suppression by a strain of *Pseudomonas fluorescens* and its antifungal minus isogenic mutant. *Phytopathology*, **76**: 1069.

Huang, Y., T. M. Rogers, M. A. Wenz, A. G. Cavinato, D. M. Mayes, G. E. Bledsoe and B. A. Rasco, 2001. Detection of sodium chloride in cured salmon roe by SW-NIR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, **49**: 4161-4167.

Hutchison, M. L. and G. C. Gross, 1997. Lipopeptide phytotoxin produced by *Pseudomonas syringae* : comparison of the biosurfactant and ion channel forming activities of syringopeptin and syringomycin. *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, **10**: 347-354.

Ichihara, A., K. Shiraishi, H. Sato, S. Sakamura, K. Nishiyama, R. Sakai, A. Furusaki, T. Matsumoto, 1977. The structure of coronatine. *J. Am. Chem. Soc.*, **99** (2): 636–637.

Itoh, S., H. Honda, F. Tomita and T. Suzuki, 1971. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin (mixture of C₁₂, C₁₃ and C₁₄ fractions). *J. Antibiot.*, **24**: 855-859.

Johnsson, R., T. Gustav, M. Sunden and Ulf. Ellervik, 2007. Evaluation of quantitative thin layer chromatography using staining reagents. *Journal of Chromatography A*, **1164**: 298-305.

James, D. W. J. and N. I. Gutterson, 1986. Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37a and their differential regulation by glucose. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**(5): 1183–1189.

Kalbe, C., P. Marten and G. Berg, 1996. Strains of the genus *Serratia* as beneficial rhizobacteria of oilseed rape with antifungal properties. *Microbiol. Res.*, **151**:433-439.

Kang, Y. W., R. Carlson, W. Thrapp and M. A. Schell, 1998. Characterization of genes involved in biosynthesis of a novel antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC11 and their role in biological control of *Rhizoctonia solani*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3939-3947.

Keel, C., D. M. Weller, A. Natsch, G. Défago, R.J. Cook and L.S. Thomashow, 1996. Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among *fluorescens* *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: 552-563.

Keel, C., U. Schnider, M. Maurhofer, 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0, importance of the bacterial metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **5**: 4-13.

Keel, C., P. H. Wirthner, T. H. Oberhansli, C. Voisard, U. Burger, D. Haas and G. Défago, 1990. Pseudomonads as antagonists of plant pathogens in the rhizosphere: role of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol in the suppression of black root rot of tobacco. *Symbiosis*, **9**: 327-342.

Kerr, J. R., G. W. Taylor, A. Rutman, N. Hoiby, P. J. Cole, and R. Wilson, 1999. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *Journal of Clinical Pathology*, **52**: 385-387.

Kim B. S., J. Y. Lee and B.K. Hwang, 2000. *In vivo* control and *in vitro* antifungal activity of rhamnolipid B, a glycolipid antibiotic, against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare*. *Pest Manager Science*, **56**: 1029-1035.

Kim, K. K., J. G. Kang, S. S. Moon and K. Y. Kang, 2000. Isolation and identification of antifungal N-butylbenzenesulphonamide produced by *Pseudomonas* sp AB2. *J. Antibiotics*, **53**: 131-136.

Kim P. I., H. Bai, D. Bai, H. Chae, S. Chung, Y. Kim, R. Park and Y.T. Chi., 2004. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *Journal of Applied Microbiology*, **97**: 942-949.

Kim, Y., J. Y. Cho, J. H. Kuk, J. H. Moon, J. I. Cho, Y. C. Kim and K. H. Park, 2004. Identification and antimicrobial activity of phenylacetic acid produced by *Bacillus licheniformis* isolated from fermented soybean, chungkook-jang. *Current Microbiology*, **48**: 312-317.

Kloepper, J. W., R. Rodriguez-Ubana, G. W. Zehnder, J. F. Murphy, E. Sikora, and C. Fernández, 1999. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology*, **28**: 21-26.

Koch, E. 1999. Evaluation of commercial products for microbial control of soil-borne plant diseases. *Crop. Protection*, **18**:119-125.

Kumar, R.S., N. Ayyadurai, P. Pandiaraja, A.V. Reddy, Y. Venkateswarlu, Prakash O. and N. Sakthivel. (2005) Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. *Journal of Applied Microbiology*, **98**: 145–154.

Kuiper, I., E. L. Lagendijk, R. Pickford, J.P. Derrick, G.E.M. Lamers, J.E. Thomas-Oates, B.J.J. Lugtenberg and G.V. Bloemberg, 2004. Characterisation of two *Pseudomonas putida* lipopeptides biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Mol. Microbiol.*, **54**: 97–113.

Lalande, R., N. Bissonnette, D. Coutlée, and H. Antoun, 1989. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. *Plant Soil.*, **115**: 7-11.

Lee, J. Y., S. S. Moon and B. K. Hwang, 2003. Isolation and antifungal and antioomycete activities of aerugine produced by *Pseudomonas fluorescens* strain MM-B16. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 2023–2031.

Leisinger, T. and R. Margraff, 1979. Secondary metabolites of the *Fluorescent Pseudomonads*. *Microbiological reviews*, **43**: 422-442.

Levenfors, J.J., R. Hedman, C. Thaning, B. Gerhardson, C.J. Welch, 2004. Broad-spectrum antifungal metabolites produced by the soil bacterium *Serratia plymuthica* A 153. *Soil biology and biochemistry* 36 : 677-685.

Levi, C. and R. D. Durbin, 1986. The isolation and properties of a tabtoxin-hydrolysing aminopeptidase from the periplasm of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.*, **28**: 345-352.

Levy, E., F. J. Gough, K. D. Berlin, P. W. Guiana and J. T. Smith, 1992. Inhibition of *Septoria tritici* and other phytopathogenic fungi and bacteria by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotics. *Plant Pathology*, **41**: 335-341.

- Ligon**, J. M., D. S. Hill, P. E. Hammer, N. R. Torkewitz, D. Hofmann, H. J. Kempf and Van Peez K. Heinz, 2000. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Manager Science*, **56**: 688-695.
- Lin**, M., M. Al-Holy, H. Al-Qadiri, D. H. Kang, A. G. Cavinato, Y. Huang and B. A. Rasco, 2004. Discrimination of intact and injured *Listeria monocytogenes* by Fourier transform infrared spectroscopy and principal component analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **52**: 5769-5772.
- Liu**, H., Y. He, H. Jiang, H. Peng, X. Huang, X. Zhang, L. S. Thomashow and Y. Xu, 2007. Characterization of a phenazine-producing strain *Pseudomonas chlororaphis* GP72 with broad-spectrum antifungal activity from green pepper rhizosphere. *Current Microbiology*, **54**: 302–306.
- Lorian**, V., 1999. In vitro simulation of In vivo conditions: Physical state of the culture medium. *Journal of clinical microbiology*, **27** :2403-2406.
- Mandryk**, M. N., E. I. Kolomiets and E. S. Dey, 2007. Characterization of antimicrobial compounds produced by *Pseudomonas aurantiaca* S-1. *Polish journal of microbiology*, **4**: 245-250.
- Marchand**, P. A., D. M. Weller and R. F. Bonsall, 2000. Convenient synthesis of 2,4-diacetylphloroglucinol, a natural antibiotic involved in the control of take-all disease of wheat. *J. Agric. Food Chem.*, **48**: 1882-1897.
- Maurhofer**, M., C. Keel, U. Schnider, C. Voisard, D. Haas and G. Défago, 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. *Phytopathology*, **82**: 190-195.
- Mavrodi**, D. M., R. F. Bonsall, S. M. Delaney, M. J. Soule, G. Phillips and L. S. Thomashow, 2001. Functional analysis of genes for biosynthesis of Pyocyanin and Phenazine-1-Carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, **183**: 6454-64645.
- Mc. Murry**, J., 2004. “Οργανική Χημεία ΙΙ”. Μτφ. Βάρβογλης, Α., Ορφανόπουλος, Μ., Σμόνου, Ι., Στρατάκης, Μ., *Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*.

Meyer, V. R., 1994. "Practical High Performance Liquid Chromatography". Sec. Ed., *John Wiley and Sons*, England.

Miller, C. M, R. V. Miller, D. Garton-Kenny, B. Redgrave, J. Sears, M. M. Condron, D. B. Teplow and G. A. Strobel, 1998. Ecomycins, unique antimycotics from *Pseudomonas viridiflava*. *J. Appl. Microbiol.*, **84**: 937-944.

Milner, J. L., L. Silo-Suh, J. C. Lee, H. Y. He, J. Clardy and J. Handelsman, 1996. Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 3061-3065.

Mohn, G., K., Taraz and H., Budzikiewicz, 1990. New pyoverdin type siderophores from *Pseudomonas fluorescens*. *Z.Naturforsch*, **45**: 1437-1450.

Morikawa, M., H. Daido, T. Takao, S. Murata, Y. Shimonishi and T. Imanaka, 1993. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS 38. *J. Bacteriol.*, **175**:6459-6466.

Morris, C.E., D.G. Georgakopoulos and D.C. Sands, 2004. Ice nucleation active bacteria and their potential role in precipitation. *J. Phys. IV France*, **121** :87–103

Morrison, R.T. and Boyd, R.N., 1988. "Οργανική Χημεία". Μτφ. Σακαρέλλος, Κ., Πηλίδης, Γ. και Γεροθανάσης, Ι. Γραφείο Εκτυπώσεων Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Nakayama, T., Y. Homma, Y. Hashidoko, J. Mizutani and S. Tahara, 1999. Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**:4334-4339.

Narayanasamy, P., 2006. Postharvest pathogens and disease management. *John Wiley & Sons*, New Jersey, p.494.

Neilands J. B. 1995. Siderophores: Structure and function of microbial irontransport compounds. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**: 26723–26726.

Nielsen, T.H., C. Christophersen, U. Anthoni and J. Sorensen, 1999. Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. *Journal of Applied Microbiology*, **86**:80–90.

Nielsen, T. H., D. Sorensen, C. Tobiasen, J. B. Andersen, C. Christophersen, M. Givskov and J. Sorensen, 2002. Antibiotic and biosurfactant properties of cyclic lipopeptides produced by Fluorescent *Pseudomonas* spp. from the sugar beet rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 3416-3423.

Nielsen, T. H., C. Thrane, C. Christophersen, U. Anthoni and J. Sorensen, 2000. Structure, production characteristics and fungal antagonism of tensin – a new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. *Journal of Applied Microbiology*, **89**: 992-1001.

Niessen, W. M. A., 1998. Analysis of antibiotics by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.*, **812**:53-75.

Ohmori, T., S. I. Hagiwara, A. Ueda, Y. Minoda and K. Yamada, 1978. Production of pyoluteorin and its derivatives from n-paraffin by *Pseudomonas aeruginosa* S10B2. *Agr.Biol.Chem.*, **42**:2031-2036.

Pal, K. K. and McSpadden Gardener, 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor* DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.

Paulitz, T., B. Nowak-Thompson, P. Gamard, E. Tsang and J. Loper, 2000. A novel antifungal furanone from *Pseudomonas aureofaciens*, a biocontrol agent of fungal plant pathogens. *Journal of Chemical Ecology*, **26**:1515-1524.

Penyalver R., P. Oger, M. M. Lopez and S.K. Farrandi, 2001. Iron-Binding Compounds from *Agrobacterium* spp.: Biological Control Strain *Agrobacterium rhizogenes* K84 Produces a Hydroxamate Siderophore. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**:654–664.

Pfender, W. F., J. Kraus and J. E. Loper, 1993. A genomic region from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 required for pyrrolnitrin production and inhibition of *Pyrenophora tritici-repentis* in wheat straw. *Phytopathology*, **83**:1123-1128.

Pierson, L. S., and L. S. Thomashow, 1992. Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus of *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **5**:330-339.

Pierson, L.S. and Pierson E.A. 2010. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **86**: 1659–1670.

Raaijmakers, J. M., M. Vlami and J. T. de Souza, 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*, **81**: 537–547.

Raaijmakers, J. M., D. M. Weller, and L.S. Thomashow, 1997. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:881-887.

Raaijmakers, J. M., R. F. Bonsall, and D. M. Weller, 1999. Effect of Population Density of *Pseudomonas fluorescens* on Production of 2,4-Diacetylphloroglucinol in the Rhizosphere of Wheat. *Phytopathology*, **89**:470-475.

Raaijmakers, J. M. and D. M. Weller, 2001. Exploiting genotypic diversity of 2,4 diacetylphloroglucinol- producing *Pseudomonas* spp.: characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8r1-96. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**:2545-2554.

Raaijmakers, J.M., I. de Bruijn and M. J., D. de Kock, 2006 Cyclic Lipopeptide Production by Plant-Associated *Pseudomonas* spp.: Diversity, Activity, Biosynthesis, and Regulation. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **19**: 699–710.

Ramos, J.L. 2004. *Pseudomonas* (volume 3): Biosynthesis of Macromolecules and Molecular Metabolism. N.Y.: *Kluwer Academic/Plenum Publishers*.

Rainey, P. B., C. L. Brodey and K. Johnstone, 1991. Biological properties and spectrum of activity of tolaasine, a lipodepsipeptide toxin produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii*. *Physiol Molec. Plant. Pathol.*, **39**: 57-70.

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

Reddy, B.P., M. S. Reddy and K. V. K. Kumar, 2009. Characterization of antifungal metabolites of *Pseudomonas fluorescens* and their effect on mycelial growth of *Magnaporthe grisea* and *Rhizoctonia solani*. *International Journal of Pharm. Tech. Research*, **1**:1490-1493.

Robin E. Mitchell, 1984. A naturally-occurring structural analogue of the phytotoxin coronatine. *Phytochemistry*, **23**(4): 791-793.

Rosales, A. M., L. Thomashow, R. J. Cook, and T. W. Mew, 1995. Isolation and identification of antifungal metabolites produced by rice-associated antagonistic *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, **85**: 1028-1032.

Sahm U., G. Knobloch and F. Wagner, 1973. Isolation and characterization of the methionine antagonist L-2-amino-4-methoxy-trans-3-butenoic acid from *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin. *J. Antibiot.*, **26**:389-390.

Sarangamat, G., D. M. Weller, A. Sarkar and J. Cook, 1986. Characterization of an antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Pythium* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **29**:488-495.

Scannell, J. P., D. L. Pruess, T. C. Demny, L. H. Sello, T. Williams and A. Stempel, 1972. Antimetabolites produced by microorganisms. V. L-2-amino-4-methoxy-trans-3-butenoic acid. *J. Antibiot.*, **25**:122-127

Schenk, T., I. Schuphan and B. Schmidt, 1995. High-performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Chromatography A*, **693**: 7-13.

Schugerl, K., G. Seigel, 1998. Monitoring of the concentration of beta-lactam antibiotics and their precursors in complex cultivation media by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **812** (1-2): 179-189.

Serra, M.D., G. Faggioli, P. Nordera, I. Bernhart, C. D. Volpe, D. Di Giorgio, A. Ballio and G. Minestrina, 1999. The interaction of lipodepsipeptide toxins from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* with biological and model membranes: a comparison of syringotoxin, syringomycin and two syringopeptins. *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, **12**: 391-400.

Shanahan, P., D. J. O'Sullivan, P. Simpson, J D. Glennol and F. O'Gara, 1992. Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a *Fluorescent Pseudomonad* and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**:353-358.

Sharifi-Tehrani, A., M. Zala, A. Natsch, Y. Moenne-Loccoz and G. Défago, 1998. Biocontrol of soil-borne fungal diseases by 2,4 diacetylphloroglucinol-producing pseudomonads with different restriction profiles of amplified 16S rDNA. *European Journal of Plant Pathology.*, **104**:631-643

Siddiqui, I. A., S.S. Shaukat, 2003. Suppression of root knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Soil Biology & Biochemistry*, **35**: 1615-1623.

Silo-Suh, L. A., B. J. Lethbridge, S. I. Raffel, H. Y. He, J. Clardy and J. Handelsman, 1994. Biological-activities of 2 fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 2023-2030.

Skoog, D. A., J. F. Holler, and T. A. Nieman, 2002. “Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης”, Μτφ. Μ.Ι. Καραγιάννης, Κ.Η. Ευσταθίου, Ν. Χανιωτάκης, Εκδόσεις Κωστανάκη, Αθήνα, : Κεφ. 11 και 20.

Slininger, P. J., K. D. Burtchhead, D. A. Schisler and R. J. Bothast, 2000. Isolation, identification, and accumulation of 2-acetamidophenol in liquid cultures of the wheat take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Applied Microbiology in Biotechnology*, **54**: 376-381.

Sneh, D., D. Pozniak, D. Salomon, 1987. Soil suppressiveness to *Fusarium* wilt of melon, induced by repeated croppings of resistant varieties of melons. *J. Phytopathology*, **120**: 347-354.

Snyder, L. S., J. J. Kirkland and J. K. Gladjch, 1997. “Practical HPLC Method Development”, Sec. Ed., *John Wiley and Sons*, NY.

Socrates, G., 1997. “Infrared & Raman Characteristic Group Frequencies”. 2nd edition, Wiley, N. York , p.249.

Sorensen, D., T. H. Nielsen, C. Christophersen, J. Sorensen and M. Gajhede, 2001. Cyclic lipoundecapeptide from *Pseudomonas* sp. Strain DSS73. *Acta Cryst.*, **57**: 1123-1124.

Spaepen, S., J. Vanderleyden and R. Remans, 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, **31(4)**: 425-448.

Strege, M.A., 1999. High-performance liquid chromatographic-electrospray ionization mass spectrometric analyses for the integration of natural products with modern high-throughput screening. *Journal of Chromatography B*, **725**: 67-78.

Stutz, E., G. Défago and H. Kern, 1986. Naturally occurring fluorescent pseudomonad involved in suppression of black root rot of tobacco. *Phytopathology*, **76** : 181-185.

Taylor, P.A., H. K. Schnoes and R.D. Durbin, 1972. Characterization of chlorosis inducing toxins from a plant pathogenic *Pseudomonas* sp. *Biochim. Biophys. Acta*, **286**: 107-117.

Thomashow, L. S., R. F. Bonsall and D. M. Weller, 1997 “Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ”. Pages 493-499 in: *Manual of Environmental Microbiology*. C. J. Hurst, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, L. D. Stetzenbach, and M. V. Walter, eds. ASM Press, Washington, DC.

Thomashow, L. S., D. M. Weller, R. F. Bonsall and L. S. Pierson III, 1990. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by Fluorescent *Pseudomonas* species in rhizosphere of wheat. *Applied and Environmental Microbiology* **56**:908-912.

Thomashow, L. S., R. F. Bonsall and D. M. Weller, 2002. Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ. *Manual of Environmental Microbiology*, 2nd Ed. Pages 636-647 in: *Manual of Environmental Microbiology*. C. J. Hurst, G. R.

Knudsen, M., J. McInerney, L. D. Stetzenbach, and M. V. Walter, eds. ASM Press, Washington, DC.

Thomashow, L. S., and D. M. Weller. 1995. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites, pp. 187-235. *In* G. Stacey and N. Keen, (ed.), *Plant-Microbe Interactions*, Vol. 1. Chapman & Hall, New York.

Timms-Wilson, T. M., R. J. Ellis, A. Renwick, D. J. Rhodes, D. V. Mavrodi, D. M. Weller, L. S. Thomashow and M. J. Bailey, 2000. Chromosomal insertion of phenazine-1-carboxylic acid biosynthetic pathway enhances efficacy of damping-off disease control by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **13**: 1293-1300.

Trejo-Estrada, S. R., A. Paszczynski and D. L. Crawford, 1998. Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. *J. Industr. Microbiol. Biotech.*, **21**: 81-90.

Turner, J. M. and A. J. Messenger, 1986. Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production. *Adv. Microb. Physiol.*, **27**:211-275.

Ui, H., T. Miyake, H. Iinuma, M. Imoto, H. Naganawa, S. Hattori, M. Hamada, M. Takeuchi, S. Umezawa and K. Umezawa, 1997. Pholipeptine, a novel cyclic lipoundecapeptide from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Org. Chem.* **62**:103-108.

Van Bramer, S.E., 1998. "An Introduction to Mass Spectrometry". vol 1, pp. 4-37. Widener University Department of Chemistry.

Van Dyke, M.I., P. Couture, M. Brauer, H. Lee and J.T. Trevors, 1993. *Pseudomonas aeruginosa* UG3 rhamnolipid biosurfactants: structural characteriazation of their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Can. J. Microbiol.*, **39**: 1071-1077.

Vincent, M. N., L. A. Harrison, J. M. Brackin, P. A. Kovacevich, P. Mukerji, D. M. Weller and E. A. Pierson, 1991. Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aurofaciens* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**: 2928-2934.

Walsh, U. F., J. P. Morrissey and F. O' Gara, 2001. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curp Opin Biotech.*, **12**: 289-295

Wang, Q. L., X. H. Zhang, L. Y. Fan, W. Zhang, Y. Q. Xub, H. B., Hub C. X. Caoa. 2005. Quantitative analysis of pyoluteorin in anti-fungal fermentation liquor of *Pseudomonas* species by capillary zone electrophoresis with UV-vis detector. *Journal of Chromatography B*, **826**: 252-256.

- Warwick, B. D. and I. E. Ellis, 2005.** Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends in Analytical Chemistry*, **24** : 285-294
- Watson, D., J. Mac Dermot, R. Wilson, P.J. Cole and G.W. Taylor, 1986.** Purification and structural analysis of pyocyanin and 1-hydroxyphenazine. *Eur. J. Biochemistry*. **159**:309-313.
- Watson, T. J. and Sparkman, O. D.** “Introduction to Mass Spectrometry”. Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation. 4th ed, *John Wiley & Sons*, 2007.
- Weinstein, M. J. and G. H. Wagman, 1978.** “Antibiotics isolation, separation and purification”. Journal of Chromatograph Library – vol 15. Elsevier Scientific Publishing Company, Amstardam.
- Weller, D. M, J. M Raaijmakers, B. B Mc Spadden Gardener and L. S. Thomashow, 2002.** Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review Phytopathology* , **40**: 309-348.
- Weller, D. M., 1988.** Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review Phytopathology* **26**:379-407.
- Weller, D. M., 1983.** Colonization of wheat roots by a *fluorescent pseudomonad* suppressive to take-all. *Phytopathology*, **73**: 1548-1553.
- Whelan, A. P., Dietrich, L .E. P., Newman, D. K. 2006.** Rethinking ‘secondary’ metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature Chem. Biol.*, **2**: 71-78.
- Whipps, J. M., 2001.** Microbial interactions and biocontrol in the rizosphere. *Journal of Experimental Botany*, **52**: 48-511.
- Wong, P. T. W. and R. Baker, 1984.** Suppression of wheat take-all and *Ophiobolus* patch by *fluorescent pseudomonads* from *Fusarium* -suppressive soil. *Soil Biol. Biochem.*, **16**: 397-403.
- Wright, S. A. I., C. H. Zumoff, L. Schneider, and S. V. Beer, 2001.** *Pantoea agglomerans* strain Eh318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 284-292.

Ζουμπροπούλου, G., K. Papadimitriou, M.G. Polissiou, P.A. Tarantilis, E. Tsakalidou, 2010. Detection of changes in the cellular composition of Salmonella entericaserovar Typhimurium in the presence of antimicrobial compound(s) of Lactobacillus strains using Fourier transform infrared spectroscopy. *International Journal of Food Microbiology*, **144**:202-207.

Γεωργόπουλος, Σ. Γ., και Β. Ν. Ζιώγας, 1992 “Αρχές και μέθοδοι καταπολέμησης των ασθνευιών των φυτών”.

Δροσόπουλος, Ι. Β., 1992. “Ανόργανη διατροφή φυτών”. Έκδοση Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα.

Χατζηιωάννου, Θ. Π, Κουπάρης, Μ. Α., 1997. “Ενόργανη Ανάλυση”. *Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα.*

Μαυρομούστακος, Θ., Μασσούκας Ι., 2006. “NMR”. Αρχές και Εφαρμογές Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού στην Ιατρική, Φαρμακευτική Χημεία, Βιοχημεία, Χημεία Τροφίμων και Ποτών. *Εκδ. Γ.Β. Παρισιάνος, Αθήνα.*

Γραβάνης, Φ. Θ., 2004. “Η Φυτοπροστασία στη Βιολογική Γεωργία”. Στο «Θέματα Βιολογικής Γεωργίας». Εκδ. ΚΕΚ ΑΙΓΕΑΣ, Λάρισα, ECO-ARGO, Pilot Project Leonardo da Vinci. . Σελ 104.

Σίσκος, Π. Α., Νικολέλης Δ. Π., 1991. “Αναλυτικές μέθοδοι διαχωρισμού”. *Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα.*

Ευσταθίου, Κ., 2006. “Εργαστηριακές Ασκήσεις **Ενόργανης Ανάλυσης Ι** ”. *Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα.*

Ζιώγας, Β. Ν. και Μάρκογλου, Α. Ν., 2007. “ΓΕΩΡΓΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ”. Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων», *Εκτυπωτική Αττικής, Αθήνα.*

Αλεξάνδρου Ν. Ε., Βάρβογλη Α. Γ., 1986. “Οργανική Χημεία”, σελ.318, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.

Ταραντίλης Πέτρος και Μόσχος Πολυσιού, 2008. ‘Ενόργανη Ανάλυση’. Πανεπιστημιακές Παραδόσεις

Παππάς Χ., 2000, Φασματοσκοπική Μελέτη Συστατικών του Φυτού Κενάφ (*Hibiscus Cannabium L.*), Διδακτορική Διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

Βαλαβανίδης, Α., 2006. “ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ”. ‘Φασματοσκοπία υπερύθρου, πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, φασματομετρίας μαζών, υπεριώδους-ορατού, Raman και ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού’. Έκδοση Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

Ραγκούση– Ιγναντιάδου Β., 1996. Χημεία Φυσικών Προϊόντων. Έκδοση Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

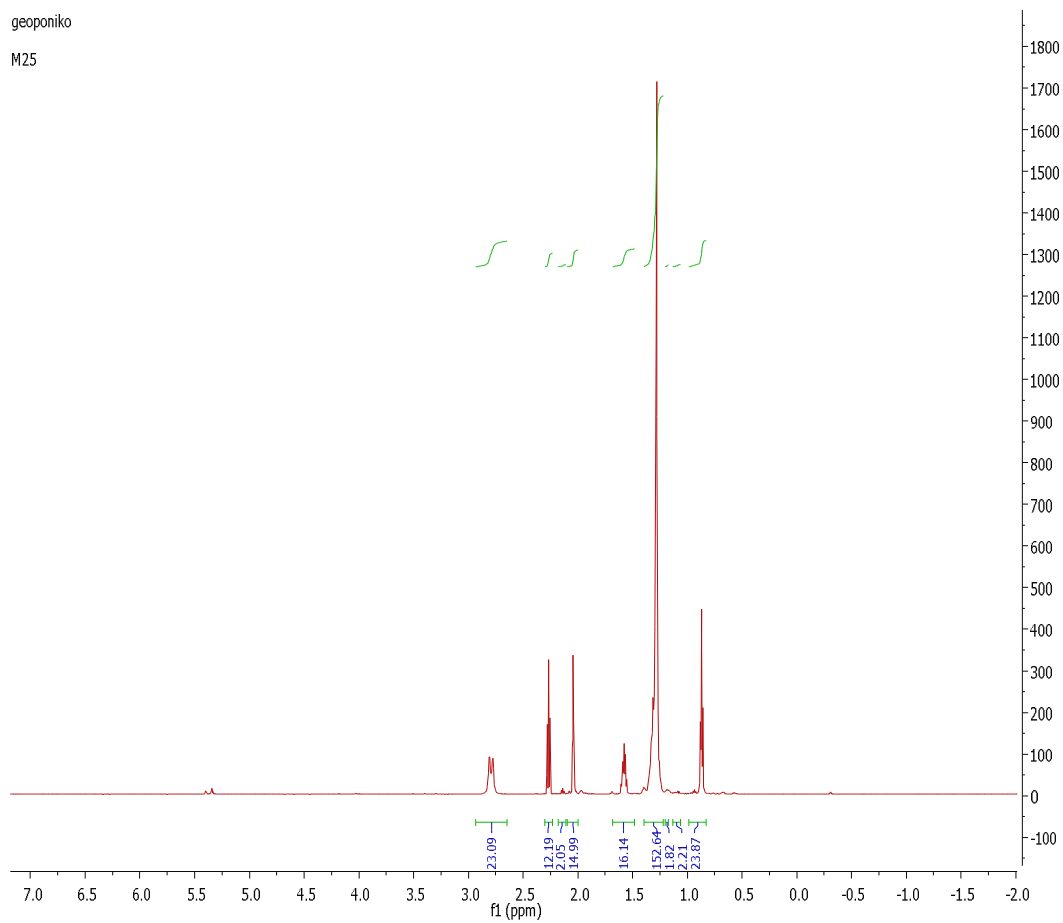
“American Society for Mass Spectrometry” (02-10-2010)

<<http://www.asms.org/>>(13-6-2011)

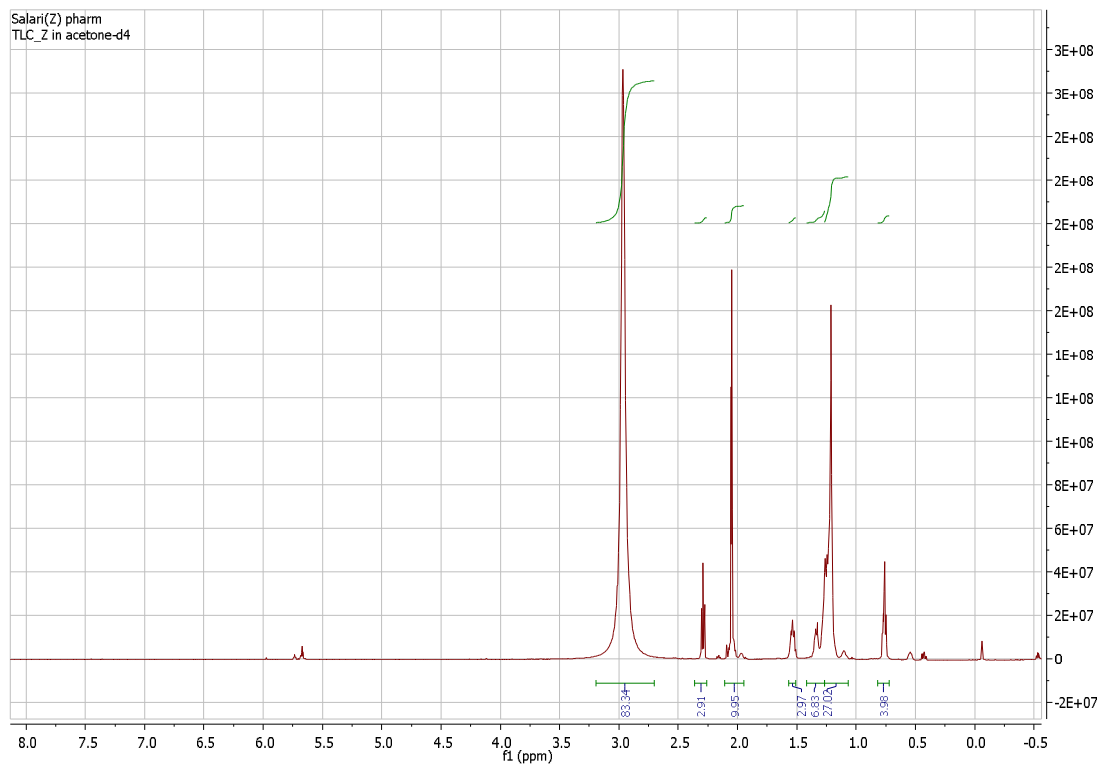
[Rex Dufour](#), “Biorationals: Ecological Pest Management Database” (10-2-2011)

<<https://attra.ncat.org/attra-pub/biorationals/>> (13-6-2011)

Παράρτημα



Εικόνα .III Φάσμα ^1H NMR λευκών νιφάδων που απομονώθηκαν από το Qa. Το φάσμα συμφωνεί με τη δομή του παλμιτικού οξέος.



Εικόνα .Π2. Φάσμα $^1\text{H NMR}$ δείγματος Q_a .