



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Διπλωματική Εργασία
Undergraduate Thesis

**«Μοριακή ταυτοποίηση και γονιδιωματική ανάλυση μικροβιώματος
σπηλαίου με σκοπό την ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών»**

“Molecular characterization and genomic analysis of cave microbiome
aiming at the development of new antibiotics”

Μαρία Πλακογιαννάκη
Maria Plakogiannaki

Εργαστήριο Εκπόνησης Πτυχιακής Εργασίας και Τριμελής Επιτροπή

Η εκπόνηση της πτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Μοριακών Αλληλεπιδράσεων Μικροβίου-Ξενιστή του κύριου Παναγιώτη Σαρρή, στο Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Επιβλέπων της πτυχιακής εργασίας ήταν ο κύριος Παναγιώτης Σαρρής, Αναπληρωτής καθηγητής Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Συνεπιβλέπων της πτυχιακής εργασίας ήταν ο κύριος Δημήτριος Μόσιαλος, Αναπληρωτής καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μέλος της τριμελούς επιτροπής ήταν ο κύριος Σωτήριος Βασιλειάδης, Επίκουρος καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Επιθυμώ αρχικά να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κύριο Παναγιώτη Σαρρή, για την ευκαιρία που μου παρείχε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο του, πάνω σε ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον θέμα, και να συμμετάσχω στην εργαστηριακή του ομάδα, καθώς και για την εμπιστοσύνη του και για την πολύτιμη καθοδήγηση του. Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω τον εργαστηριακό μου επιβλέπων, Δρ. Χρήστο Χρηστάκη, για όλα όσα μου δίδαξε, για την υποστήριξή του, και για την απρόσκοπτη παρουσία του δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, η οποία έπαιξε κύριο ρόλο στην περάτωσή της.

Ευχαριστώ επίσης θερμά και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για τη συμπαράσταση και τη βοήθεια που μου προσέφεραν κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο, και ιδιαίτερα τη Δρ. Βασιλική Μιχαλοπούλου, την Δρ. Δήμητρα Τσακίρη, τον υποψήφιο διδάκτωρ Νικόλαο Αραπίτσα, και τον υποψήφιο διδάκτωρ Σάββα Παραγκαμιάν. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Μαρία Χαλικοπούλου και Νεκταρία Κοκολάκη, και τους προπτυχιακούς φοιτητές Αντωνία Παπούλια, Κρισίλντα Κατές και Μάμπη Χαλμούκη, για κάθε βοήθεια που μου προσέφεραν κατά την συνεργασία μας στο εργαστήριο.

Δε θα είχα καταφέρει τίποτα από αυτά χωρίς την οικογένεια μου και τους φίλους μου, και θα ήθελα να τους ευχαριστήσω βαθύτατα για την υποστήριξή τους σε κάθε μου βήμα.

Περίληψη

Ένα από τα βασικότερα προβλήματα που απειλούν την παγκόσμια υγεία είναι η εξάπλωση πολυανθεκτικών παθογόνων μικροβίων, τα οποία δεν αντιμετωπίζονται με τα διαθέσιμα αντιβιοτικά. Η ανάγκη ανάπτυξης νέων αντιβιοτικών έχει στρέψει το ερευνητικό ενδιαφέρον σε ακραία, ανεξερεύνητα περιβάλλοντα, τα οποία αποικίζονται από στελέχη μικροοργανισμών ιδανικά για μελέτη των βιοδραστικών ενώσεων που παράγουν. Το αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η μοριακή ταυτοποίηση μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από σπήλαιο, και η σύγκρισή τους με ήδη χαρακτηρισμένα στελέχη. Με αυτόν τον τρόπο επιτεύχθηκε η ταξινομική κατάταξη 154 μικροβιακών στελεχών. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω γονιδιωματική ανάλυση τεσσάρων επιλεγμένων μικροβιακών απομονώσεων, και μέσω συναρμολόγησης του ολικού γονιδιώματός τους και ανάλυσης της αλληλουχίας τους, διερευνήθηκε η δυνατότητα αξιοποίησης τους στην έρευνα για την ανακάλυψη νέων αντιβιοτικών ουσιών.

Abstract

One of the main problems threatening global health is the spread of multi-resistant pathogenic microbes, which are not affected by the available antibiotics. The need to develop new antibiotics has directed research interest to extreme, unexplored environments, which are colonized by strains of microorganisms ideal for studying their putative bioactive compounds. The subject of this thesis is the molecular identification of microorganisms isolated from a cave, and their comparison with already characterized strains. As a result, the taxonomic classification of 154 microbial strains was achieved. In addition, further genomic analysis of four selected microbial isolates was performed, and after assembly of their whole genomes and sequence analysis, their potential use in research to discover new antibiotic substances was investigated.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

- 1.1.1 Τα μικροβιώματα σπηλαίων και ο ρόλος τους στην παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών
- 1.1.2 Το σπήλαιο του Γουργούθακα
- 1.2 Ανθεκτικότητα στα Αντιβιοτικά και προοπτικές αντιμετώπισης
- 1.3 Στρεπτομύκητες
- 1.4 Η μικροβιολογική έρευνα από τις μεθόδους καλλιέργειας ως τη γονιδιωματική
- 1.5 Σκοπός Εργασίας

Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι

- 2.1. Δειγματοληψία από το σπήλαιο του Γουργούθακα
- 2.2. Θρεπτικά Υποστρώματα
- 2.3. Απομόνωση και Καλλιέργεια Μικροοργανισμών
- 2.4. Μοριακή Ταυτοποίηση Μικροοργανισμών
 - 2.4.1. Απομόνωση DNA
 - 2.4.2. Ενίσχυση πλήρους αλληλουχίας 16S rDNA με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)
 - 2.4.3. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων αντίδρασης PCR σε πήκτωμα αгарόζης
 - 2.4.4. Ανάλυση πλήρους αλληλουχίας 16S rDNA
- 2.5. Επιλογή Στελεχών Στρεπτομυκήτων για Αλληλούχιση Ολικού Γονιδιώματος
 - 2.5.1. Καλλιέργεια Στρεπτομυκήτων
 - 2.5.2. Παρασκευή αντιδραστηρίων για πρωτόκολλο απομόνωσης DNA
 - 2.5.3. Απομόνωση DNA
 - 2.5.4. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων απομόνωσης DNA σε πήκτωμα αгарόζης
 - 2.5.5. Φωτομέτρηση προϊόντων απομόνωσης DNA σε φασματοφωτόμετρο Nanodrop
 - 2.5.6. Φθορομέτρηση προϊόντων απομόνωσης DNA με φθορόμετρο Qubit
 - 2.5.7. Ανάλυση αλληλουχίας γονιδιωματικού DNA: Συναρμολόγηση
 - 2.5.8. Ανάλυση αλληλουχίας γονιδιωματικού DNA: Annotation, εξόρυξη γονιδιωμάτων και φυλογένεση

2. Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα

- 3.1. Απομόνωση και Καλλιέργεια Μικροοργανισμών
- 3.2. Αποτελέσματα Μοριακής Ταυτοποίησης Μικροοργανισμών
- 3.3. Αποτελέσματα Ανάλυσης Αλληλουχίας Ολικού Γονιδιωματικού DNA

Κεφάλαιο 4: Συζήτηση

- 4.1. Μοριακή ταυτοποίηση μικροοργανισμών
- 4.2. Ανάλυση Αλληλουχίας Ολικού Γονιδιωματικού DNA
- 4.3. Μελλοντικές Προσεγγίσεις

Κεφάλαιο 5: Βιβλιογραφία

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1.1 Τα μικροβιώματα σπηλαίων και ο ρόλος τους στην παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών

Με τον όρο μικροβίωμα αναφερόμαστε στο σύνολο της μικροβιακής ποικιλότητας που καταλαμβάνει ένα συγκεκριμένο οικοσύστημα. Δεδομένης της ποικιλομορφίας των ενδιαιτημάτων της βιόσφαιρας, είναι αναμενόμενη και η ποικιλομορφία των μικροβιωμάτων που συναντάται στα διαφορετικά περιβάλλοντα του πλανήτη (Saleem, 2015). Η μελέτη της μικροβιακής βιοποικιλότητας παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε ανεξερεύνητα ακραία περιβάλλοντα, λόγω των αντίξωων συνθηκών που επικρατούν σε αυτά (Tazi et al., 2014).

Τα σπήλαια ορίζονται ως φυσικοί υπόγειοι κοίλοι χώροι, στα οποία είναι δυνατή η ανθρώπινη πρόσβαση μέσω κάποιου ανοίγματος (Northup et al., 2001). Αποτελούν ακραία περιβάλλοντα με τελείως διαφορετική σύνθεση από αυτήν του εξωτερικού περιβάλλοντος. Γενικά, πρόκειται για ενδιαιτήματα που χαρακτηρίζονται από συνθήκες απόλυτου σκότους, υψηλής υγρασίας, σταθερής θερμοκρασίας και χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών. Τα σπήλαια χωρίζονται σε τρεις ζώνες με βάση τη διείσδυση του φωτός: τη ζώνη εισόδου, τη ζώνη λυκόφωτος και τη σκοτεινή ζώνη (Cheeptham, 2013). Η ζώνη εισόδου παρουσιάζει συνθήκες όμοιες με το εξωτερικό περιβάλλον, καθώς δέχεται φως και κατά συνέπεια επιτρέπει τη φωτοσύνθεση και την ανάπτυξη φυτικών οργανισμών. Η ζώνη λυκόφωτος αποτελεί ένα μεταβατικό στάδιο από τις συνθήκες εξωτερικού περιβάλλοντος στις χαρακτηριστικές συνθήκες του σπηλαίου (Cheeptham, 2013). Σε αυτή τη ζώνη, η διείσδυση φωτός είναι σαφώς χαμηλότερη, με αποτέλεσμα να μην ευδοκιμούν φωτοσυνθετικοί οργανισμοί, και η θερμοκρασία που επικρατεί είναι σταθερή, αλλά κατά καιρούς επηρεάζεται από τις συνθήκες του εξωτερικού περιβάλλοντος. Στη σκοτεινή ζώνη δεν υπάρχει διείσδυση φωτός και η θερμοκρασία παραμένει σταθερή (Zhu et al., 2022, Cheeptham, 2013).

Τα σπήλαια παρουσιάζουν σημαντική ποικιλομορφία, η οποία ξεκινά από τη γεωλογική τους προέλευση (Romero, 2012). Βάσει αυτής, και πιο συγκεκριμένα βάσει του τύπου βράχου και της μεθόδου σπηλαιογένεσης, μπορούν να ταξινομηθούν σε ασβεστολιθικά (καρστικά), αμμολιθικά, υδροθερμικά, τεκτονικά, σπήλαια λάβας ή πάγου (Romero, 2012, Northup et al., 2001). Το εξωτερικό περιβάλλον του σπηλαίου επίσης επηρεάζει το οικοσύστημα αυτού. Οι διαφορετικοί γεωγραφικοί και κλιματικοί παράγοντες που απαντώνται στον πλανήτη, μπορούν να μεταβάλλουν τις συνιστώσες που καθορίζουν το περιβάλλον του σπηλαίου, όπως το pH, τη θερμοκρασία, τις ροές νερού και τη διαθεσιμότητα της οργανικής ύλης, (Biagioli et al., 2024). Κατά συνέπεια, παρατηρείται αξιοσημείωτη ποικιλομορφία ως προς τη χλωρίδα, την πανίδα και το μικροβίωμα,

η οποία ενισχύεται ακόμη περισσότερο σε ανεξερεύνητα ή μη προσβάσιμα σπήλαια (Romero, 2012).

Λόγω της περιορισμένης διαθεσιμότητας σε θρεπτικά υποστρώματα, τα σπήλαια χαρακτηρίζονται ως oligotroφικά ενδιαιτήματα, και οι μικροοργανισμοί που καταφέρνουν να ευδοκιμήσουν υπό αυτές τις συνθήκες, ονομάζονται oligotroφικοί (Cheeptham, 2013). Η επιβίωση υπό ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες απαιτεί εξελικτικές προσαρμογές. Η περιορισμένη οργανική ύλη που συναντάται στα σπήλαια προέρχεται από το εξωτερικό περιβάλλον, από ρέματα, υπόγεια ύδατα ή διηθούμενο επιφανειακό νερό, ανάλογα με το είδος του σπηλαίου. Αυτό υποδεικνύει ότι οι μικροοργανισμοί που αποικίζουν οικοσυστήματα σπηλαίων αρκούνται στον ελάχιστο οργανικό άνθρακα που τους προσφέρεται, ενώ ταυτόχρονα υποστηρίζεται ότι η επιβίωσή τους βασίζεται σε ένα χημειοαυτοτροφικό τρόπο εκμετάλλευσης των εναλλακτικών θρεπτικών στοιχείων που διατίθενται, όπως το άζωτο και το θείο (Cheeptham, 2013, Zhu et al., 2022). Παράλληλα, οι oligotroφικές αυτές συνθήκες προωθούν τον ανταγωνισμό μεταξύ των μικροβίων.

Η έκκριση βιοδραστικών ενώσεων με σκοπό την αναστολή της ανάπτυξης γειτονικών πληθυσμών αποτελεί έναν κλασικό μηχανισμό επιβίωσης, ο οποίος θεωρείται ότι έχει ενισχυθεί σε σπηλαιόβιους μικροοργανισμούς (Zada et al., 2022). Οι αντιμικροβιακές αυτές ουσίες είναι φυσικά οργανικά προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των μικροοργανισμών, και λόγω των ιδιοτήτων τους αποτελούν σημαντικούς ερευνητικούς στόχους. Ο αποικισμός των σπηλαίων από μικροβιακά στελέχη που δεν έχουν μελετηθεί, σε συνδυασμό με τις εξελικτικές πιέσεις στις οποίες έχουν υποβληθεί, έχουν οδηγήσει το ενδιαφέρον της ερευνητικής κοινότητας σε αυτά τα οικοσυστήματα προς ανακάλυψη νέων φυσικών βιοδραστικών ουσιών (Demain, 1999). Εκτός της ανάπτυξης νέων αντιβιοτικών, είναι δυνατή η χρήση τους και ως αντικαρκινικοί και ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες, ως αναστολείς ενζύμων, και ως θεραπεία χρόνιων ασθενειών, όπως η άνοια και η επιληψία (Demain, 1999, Sayed et al., 2020). Προς το παρόν, έχουν απομονωθεί και αναγνωριστεί πολλές αντιμικροβιακές ενώσεις από μικροοργανισμούς σπηλαίων, παραγωγής κυρίως στρεπτομυκήτων και βακίλων, όπως οι undecylprodigiosin, xiakemycin, huanglongmycin και diazerpinomicin από στρεπτομύκητες, πεπτίδια από το στέλεχος *Bacillus licheniformis*, λανθιπεπτίδια και πολυμυξίνες από το γένος *Paenibacillus*, κλπ (Zada et al., 2022). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την σωστή κατεύθυνση της μελέτης ανεξερευνήτων ακραίων περιβαλλόντων, και ενισχύουν την ελπίδα σημαντικών ανακαλύψεων.

1.1.2 Το σπήλαιο του Γουργούθακα

Κατά την εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας, μελετήθηκαν μικροβιακές απομονώσεις από το σπήλαιο του Γουργούθακα. Ο Γουργούθακας είναι το βαθύτερο σπήλαιο της Ελλάδας (1.208 μέτρα), και ένα από τα βαθύτερα σπήλαια παγκοσμίως (Wikipedia contributors, 2023). Βρίσκεται στη βορινή πλευρά των Λευκών Ορέων του νομού Χανίων Κρήτης και η είσοδός του τοποθετείται σε υψόμετρο 1550 μέτρων. Ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά από την Γαλλική αποστολή «Λευκά Όρη 1981» της Σπηλαιολογικής Εταιρίας Plantaurel (SSP, Speleological

Society of Planteurel), ενώ η εξερεύνησή του ξεκίνησε το 1990 από την αποστολή της Γαλλικής ομάδας Speleo Group Catamaran, και συνεχίστηκε για αρκετά χρόνια (Sotiriadis et al., 2023). Κατά την Ελληνική αποστολή «Γουργούθακας 2022» της Ελληνικής Σπηλαιολογικής Κοινότητας, πραγματοποιήθηκε χαρτογράφηση του σπηλαίου και γεωλογική έρευνα, ενώ για πρώτη φορά επιχειρήθηκε υποβρύχια σπηλαιοεξερεύνηση και λήψη βιολογικών δειγμάτων μακρο-ασπονδύλων, ξυσμάτων τοιχωμάτων για εντοπισμό καλλιεργήσιμου μικροβιώματος και δειγμάτων νερού για ανίχνευση και μελέτη DNA (Sotiriadis et al., 2023). Την απομόνωση και τη μελέτη των μικροοργανισμών της δειγματοληψίας ανέλαβε το εργαστήριο του καθηγητή Παναγιώτη Σαρρή του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης (Sotiriadis et al., 2023).

1.2 Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και προοπτικές αντιμετώπισης

Ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα που απειλούν την παγκόσμια υγεία είναι η ολοένα αυξανόμενη ανθεκτικότητα των παθογόνων μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά. Η αλόγιστη και υπερβολική χρήση αντιβιοτικών στην προσπάθεια καταπολέμησης ανθρώπινων ασθενειών, αλλά και στην κτηνιατρική και στη γεωργία, έχει οδηγήσει στην εξέλιξη και εξάπλωση υπερανθεκτικών μικροβίων (Demain, 1999). Αυτό οφείλεται στη συνθήκη των αναρίθμητων πολυμελών πληθυσμών τους, στην πλαστικότητα του γονιδιώματός τους και στην ταχύτατη προσαρμοστικότητά τους υπό συνθήκες απειλής (Rodríguez-Rojas et al., 2013). Το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών ουσιών υπερβαίνει το χρόνο που χρειάζονται οι μικροοργανισμοί για να αναπτύξουν μηχανισμούς αντίστασης (Rodríguez-Rojas et al., 2013, Demain, 1999).

Οι κύριοι μηχανισμοί άμυνας κατά των αντιβιοτικών είναι η τροποποίηση των μοριακών στόχων του φαρμάκου μέσω μεταλλάξεων, οι μεταβολές στη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης και των εκκριτικών της συστημάτων, και η οριζόντια μεταφορά γονιδίων αντίστασης (Rodríguez-Rojas et al., 2013). Υπό συνθήκες έκθεσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις αντιμικροβιακών ουσιών, έχειδειχθεί ότι πραγματοποιείται επαγωγή των αμυντικών μηχανισμών των μικροοργανισμών. Η κατάχρηση βιοδραστικών ουσιών σε γεωργικές εκτάσεις, η ρύπανση από φαρμακευτικές βιομηχανίες, τα νοσοκομειακά λύματα κλπ. Έχουν συμβάλλει στην παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων αντιβιοτικών ενώσεων σε μεγάλο ποσοστό του παγκόσμιου οικοσυστήματος (Demain, 1999). Πολλά ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά, όπως οι κινολόνες, οι φλουοροκινολόνες και οι β-λακτάμες, έχειδειχθεί ότι εκκινούν μηχανισμούς απόκρισης στο στρες οι οποίοι επάγουν τη μεταλλαξιογένεση προσβεβλημένων κλώνων (Rodríguez-Rojas et al., 2013). Ο πολλαπλασιασμός των κλώνων αυτών συνεπάγεται την ανάπτυξη προσαρμοστικών πληθυσμών, ικανών για αντίσταση σε εύρος αντιβιοτικών ουσιών. Επιπρόσθετα, η οριζόντια μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά έχει παρατηρηθεί σε διάφορα στελέχη κατόπιν έκθεσης, λόγω υπερέκφρασης μεταγραφικών παραγόντων υπεύθυνων για τη μετακίνηση μεταθετών στοιχείων (Maslowska et al., 2019). Η θεραπευτική στόχευση αυτών των αμυντικών μηχανισμών μπορεί να αποτελέσει μια στρατηγική αντιμετώπισης της έξαρσης που παρατηρείται.

Η ανάγκη ανάπτυξης νέων αντιβιοτικών γίνεται ολοένα και πιο επιτακτική. Βιοδραστικές ουσίες για τις οποίες τα παθογόνα μικρόβια δεν έχουν αναπτύξει ακόμη ανθεκτικότητα, αναμένεται να βρεθούν σε οικοσυστήματα στα οποία δεν απαντώνται οι χαμηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών που προαναφέρθηκαν, και χαρακτηριστικά τέτοια οικοσυστήματα είναι τα ακραία, ανεξερεύνητα περιβάλλοντα των σπηλαίων. Ιδιαίτερα εάν ληφθεί υπόψη ο αυξημένος ανταγωνισμός μεταξύ των μικροβιακών πληθυσμών που αποικίζουν τα σπήλαια, οι αντιμικροβιακές ενώσεις που δύναται να βρεθούν δε θα είναι απλώς πρωτόγνωρες και άρα αποτελεσματικές κατά των παθογόνων, αλλά θα είναι και πολύ ισχυρές (Maciejewska et al., 2017).

1.3 Στρεπτομύκητες

Οι στρεπτομύκητες είναι μικροοργανισμοί με ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον, οι οποίοι αποτελούν το χαρακτηριστικότερο γένος του φύλου των ακτινοβακτηρίων. Πρόκειται για θετικά κατά Gram βακτήρια, με γραμμικό, μετρίου μεγέθους γονιδίωμα (6-12Mb) υψηλής περιεκτικότητας σε γουανίνη και κυτοσίνη (70%), με μεγάλα γραμμικά και κυκλικά πλασμίδια, και την αξιοσημείωτη δυνατότητα σχηματισμού διακλαδιζόμενων υφών που ομοιάζουν με μυκητιακά μυκήλια. Έχουν προσελκύσει δικαιολογημένα το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, λόγω της συμβολής τους σε διεργασίες βιομετατροπής και ανοργανοποίησης υποστρωμάτων στο έδαφος, όπου διαβιούν, και της παραγωγής πλήθους βιοδραστικών ενώσεων (Paradkar et al., 2003).

Στο γονιδίωμα των στρεπτομυκήτων έχουν βρεθεί πολλές νησίδες βιοσυνθετικών γονιδίων δευτερογενών μεταβολιτών, με σημαντικές προοπτικές χρήσης στην ιατρική και τη γεωργία (Sayed et al., 2020). Είναι γνωστό ότι η πλειοψηφία των αντιβιοτικών που έχουν ανακαλυφθεί αποτελούν άμεσα φυσικά προϊόντα ή ημισυνθετικά παράγωγα στρεπτομυκήτων. Κάποια παραδείγματα γνωστών αντιβιοτικών με προέλευση από στρεπτομύκητες είναι οι κεφαλοσπορίνες, οι ανθρακυκλίνες, οι τετρακυκλίνες, η στρεπτομυκίνη, η βανκομυκίνη, η δαπτομυκίνη κλπ. (Alam et al., 2022, Bhat & Nayaka, 2023). Υποστηρίζεται ότι εκτός των μέχρι πρότινος γνωστών νησίδων βιοσυνθετικών γονιδίων, υπάρχουν και κάποιες που είναι μεταγραφικά ανενεργές υπό συνθήκες εργαστηριακής καλλιέργειας, και αποτελούν πολλά υποσχόμενη πηγή νέων φυσικών βιοδραστικών ενώσεων προς ανάπτυξη μιας νέας γενιάς αντιβιοτικών (Chung et al., 2021).

Μια ακόμη αξιοσημείωτη ικανότητα που διαθέτουν οι στρεπτομύκητες είναι η διαφοροποίηση προς μία ανθεκτικότερη μορφή, τα σπόρια. Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι στρεπτομύκητες σχηματίζουν χαρακτηριστικές υφές. Υπό αντίξοες συνθήκες, οι υφές αυτές μπορούν να διαφοροποιηθούν και να σχηματίσουν απύρνηνα σπόρια, τα οποία περιέχουν πολλαπλά αντίγραφα του χρωμοσώματος, και διατηρούν την ιδιότητα να μεταβούν στην αναπαραγωγική τους κατάσταση και να σχηματίσουν ξανά τις πολυπύρνες υφές, εφόσον οι συνθήκες βελτιστοποιηθούν (Yagüe et al., 2013).. Η ικανότητα σπορίωσης των στρεπτομυκήτων θεωρείται

ότι αναπτύχθηκε λόγω εξελικτικών πιέσεων, προκειμένου τα βακτήρια αυτά να επιβιώσουν χωρίς να προσβάλλουν κάποιον ξενιστή, ή σε ακραία περιβάλλοντα, και μάλιστα φαίνεται ότι η παραγωγή βιοδραστικών δευτερογενών μεταβολιτών προωθείται σε αυτό το στάδιο του κύκλου ζωής τους (De Lima Procópio et al., 2012, Yagüe et al., 2013).

Εν όψει της παγκόσμιας κρίσης υγείας λόγω της ανθεκτικότητας των παθογόνων μικροβίων στα αντιβιοτικά, είναι αναμενόμενο η ερευνητική κοινότητα να στραφεί για λύση στο γένος που της έχει προσφέρει το μεγαλύτερο ποσοστό αντιμικροβιακών ενώσεων. Ο αποικισμός ανεξερεύνητων σπηλαίων από νέα στελέχη στρεπτομυκήτων, που λόγω των συνθηκών αναμένεται να παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες ισχυρότερων βιοδραστικών ουσιών, φαίνεται να είναι μια μοναδική ευκαιρία επίλυσης του προβλήματος των υπερανθεκτικών παθογόνων.

1.4 Η μικροβιολογική έρευνα από τις μεθόδους καλλιέργειας ως τη γονιδιωματική

Στο πλαίσιο της μικροβιολογικής έρευνας για βιοδραστικές ενώσεις με προοπτικές αξιοποίησης ως νέα αντιβιοτικά ή λοιπά φαρμακευτικά προϊόντα, μπορούν να εφαρμοστούν μέθοδοι καλλιέργειας ή γονιδιωματικές μέθοδοι (Vester et al., 2015). Η εργαστηριακή καλλιέργεια μικροοργανισμών φαίνεται να οδηγεί στην ανάπτυξη ενός μικρού ποσοστού των μικροοργανισμών ενός περιβαλλοντικού δείγματος, και πρόκειται για τα στελέχη που δύνανται να προσαρμοστούν στις εργαστηριακές συνθήκες καλλιέργειας. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι μέσω της προσέγγισης αυτής δεν αναπτύσσεται και συνεπώς δε μελετάται το σύνολο του απομονωμένου μικροβιώματος, με αποτέλεσμα να παραβλέπονται, κατά πάσα πιθανότητα, στελέχη με τις υπό αναζήτηση ιδιότητες (Vester et al., 2015). Η αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού είναι εφικτή μέσω βελτίωσης των μεθόδων εργαστηριακής καλλιέργειας, αλλά και αξιοποίησης των εναλλακτικών μεθόδων της γονιδιωματικής μελέτης. Η πρόοδος στον τομέα της γονιδιωματικής επιτρέπει πλέον τη μελέτη και τη χαρτογράφηση ολόκληρων γονιδιωμάτων μέσω αλληλούχισης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS), και τη συλλογή πληροφοριών σχετικά με το μεταγράφομα, το πρωτέωμα και το επιγονιδίωμα του οργανισμού (Hawkins et al., 2010). Η εξόρυξη των γονιδιωμάτων, δηλαδή η εκμετάλλευση των γονιδιωματικών πληροφοριών για την ανακάλυψη χρήσιμων φυσικών προϊόντων, μοριακών στόχων και διεργασιών, βρίσκει εφαρμογή σε πλήθος βιολογικών κλάδων (Challis, 2008).

Κατά την εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας, πραγματοποιήθηκαν δύο ειδών γονιδιωματικές μέθοδοι: η αλληλούχιση του γονιδίου 16S rDNA και η αλληλούχιση ολικού γονιδιωματικού DNA. Η αλληλούχιση του γονιδίου 16S rDNA αποτελεί μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους ταυτοποίησης μικροβιακών στελεχών. Η αλληλουχία του γονιδίου 16S περιέχει υψηλά συντηρημένες αλλά και μεταβλητές περιοχές, με επαρκή πολυμορφισμό, ώστε να καθιερωθεί η αλληλούχισή του ως μια πολύ έγκυρη μέθοδος, ικανή να χαρακτηρίσει ακόμη και τα στελέχη που δε μπορούν να μελετηθούν μέσω μεθόδων καλλιέργειας (Clarridge, 2004, Woo et al., 2008). Από την άλλη, η αλληλούχιση του ολικού γονιδιωματικού DNA παρέχει την

πληρέστερη συλλογή των γενετικών παραλλαγών ενός οργανισμού, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα ανάλυσης της συνολικής γενετικής πληροφορίας (Ng and Kirkness, 2010). Τα δύο είδη τεχνολογιών αλληλούχισης ολικού γονιδιώματος είναι η αλληλούχιση μικρών αναγνώσεων και η αλληλούχιση μεγάλων αναγνώσεων, οι οποίες διαφοροποιούνται βάσει του μήκους της αλληλουχίας που διαβάζουν. Οι τεχνολογίες αλληλούχισης μικρών αναγνώσεων προσφέρουν αυξημένη αξιοπιστία λόγω του υψηλού βάθους αλληλούχισης, αφού κάθε βάση αλληλουχείται πολλές φορές, και με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η ταυτοποίηση ακόμη και μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών. Η κάλυψη του γονιδιώματος ωστόσο μειώνεται, καθώς τα μικρά μήκη αναμενόμενα επιτρέπουν την ενσωμάτωση κενών στην ανάγνωση (Hawkins et al., 2010). Οι τεχνολογίες αλληλούχισης μεγάλων αναγνώσεων παρέχουν μεγαλύτερη κάλυψη του γονιδιώματος, με αυτό ωστόσο να συνεπάγεται το μικρότερο βάθος αλληλούχισης (Hawkins et al., 2010). Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων αλληλούχισης μιας τεχνολογίας αναγνώσεων μικρού μήκους και μιας τεχνολογίας αναγνώσεων μεγάλου μήκους στη μετέπειτα συναρμολόγηση του γονιδιώματος, αναμένεται να δώσει τα ακριβέστερα αποτελέσματα, αφού με αυτόν τον τρόπο παρέχεται ταυτόχρονα μέγιστο βάθος και μέγιστη κάλυψη. Έτσι, για τη μετέπειτα βέλτιστη ανάλυση της γενετικής πληροφορίας, επιλέχθηκε η συγκεκριμένη μέθοδος για να γίνει η αλληλούχιση των γονιδιωμάτων που μελετήσαμε.

1.5 Σκοπός Εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η καλλιέργεια, η απομόνωση και η ταυτοποίηση με αλληλούχιση 16S rDNA μέρους του καλλιεργήσιμου μικροβιώματος σπηλαίου. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε επιλογή τεσσάρων μικροβιακών απομονώσεων, για αλληλούχιση του ολικού γονιδιωματικού DNA τους. Η αξιοσημείωτη παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών, σε συνδυασμό με την ικανότητα των σπηλαιόβιων μικροοργανισμών να επιβιώνουν σε αντίξοες συνθήκες, τους καθιστά ιδανικούς για περαιτέρω μελέτη του γονιδιώματος και του μεταβολισμού τους.

Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Δειγματοληψία από το σπήλαιο του Γουργούθακα

Για τη μελέτη του καλλιεργήσιμου μικροβιώματος του σπηλαίου του Γουργούθακα, έγινε δειγματοληψία από το βιολόγο Σάββα Παραγκαμιάν. Πραγματοποιήθηκε λήψη ξυσμάτων από τα τοιχώματα του σπηλαίου σε 9 διαφορετικά βάθη, με γνώμονα την εναλλαγή των πετρωμάτων και την παρατήρηση χρωματικών σχηματισμών που υποδείκνυαν μικροβιακή προέλευση. Από κάθε βάθος, έγινε λήψη και αποθήκευση δειγμάτων σε δύο σωληνάρια falcon όγκου 50 mL. Τα βάθη της δειγματοληψίας των βιολογικών δειγμάτων μικροοργανισμών φαίνονται στον Πίνακα 2.1.1.

Πίνακας 2.1.1: Βάθη δειγματοληψίας βιολογικών δειγμάτων μικροοργανισμών.

Βάθη δειγματοληψίας (m)
0 (Είσοδος Σπηλαίου)
-39
-221
-418
-677
-763
-903
-1074
-1100

2.2 Θρεπτικά Υποστρώματα

Για την καλλιέργεια των απομονωμένων μικροοργανισμών, χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά Nutrient Agar (NA), Nutrient Broth (NB), υγρό και στερεό Reasoner's 2A (R2A), και Mannitol - Nitrogen Free Mineral Medium Agar (MNFMM). Η σύσταση των θρεπτικών υποστρωμάτων παρουσιάζεται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 2.1.1. - 2.1.5.). Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό. Κατόπιν παρασκευής, πραγματοποιήθηκε αποστείρωση των θρεπτικών σε χύτρα στους 121°C για 20 λεπτά.

Πίνακας 2.1.1. Στερεό θρεπτικό Nutrient Agar (NA).

Συστατικά	Συγκέντρωση (g/L)
Peptone	5 (g/L)
Yeast Extract	3 (g/L)
NaCl	5 (g/L)
Agar	15 (g/L)
pH=7,4	

Πίνακας 2.2.2. Υγρό θρεπτικό Nutrient Broth (NB).

Συστατικά	Συγκέντρωση (g/L)
Peptone	5 (g/L)
Yeast Extract	3 (g/L)
NaCl	5 (g/L)
pH=7,4	

Πίνακας 2.2.3. Στερεό θρεπτικό Reasoner's 2A (R2A).

Συστατικά	Συγκέντρωση (g/L)
Yeast Extract	0,5 (g/L)
Proteose Peptone	0,5 (g/L)
Casamino Acids	0,5 (g/L)
Glucose	0,5 (g/L)
Soluble Starch	0,5 (g/L)
Sodium pyruvate	0,3 (g/L)
Dipotassium phosphate (K ₂ HPO ₄)	0,3 (g/L)
Magnesium Sulfate Heptahydrate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0,05 (g/L)
Agar	15 (g/L)

pH=7,2

Πίνακας 2.2.4. Υγρό θρεπτικό Reasoner's 2A (R2A).

Συστατικά	Συγκέντρωση (g/L)
Yeast Extract	0,5 (g/L)
Proteose Peptone	0,5 (g/L)
Casamino Acids	0,5 (g/L)
Glucose	0,5 (g/L)
Soluble Starch	0,5 (g/L)
Sodium pyruvate	0,3 (g/L)
Dipotassium phosphate (K ₂ HPO ₄)	0,3 (g/L)
Magnesium Sulfate Heptahydrate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0,05 (g/L)
pH=7,2	

Πίνακας 2.2.5. Στερεό θρεπτικό Mannitol - Nitrogen Free Mineral Medium Agar (MNFMM).

Συστατικά	Συγκέντρωση (g/L)
Calcium chloride (CaCl ₂)	1 (g/L)
Sodium chloride (NaCl)	0,5 (g/L)
Dipotassium phosphate (K ₂ HPO ₄)	1 (g/L)
D-Mannitol	7 (g/L)
Sodium molybdate dihydrate (Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O)	0,01 (g/L)
Magnesium Sulfate Heptahydrate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0,25 (g/L)
Ferrous Sulfate Heptahydrate (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	0,01 (g/L)
Manganese Sulfate (MnSO ₄)	0,01 (g/L)
Agar	20 (g/L)
pH=6,8-7,2	

2.3 Απομόνωση και Καλλιέργεια Μικροοργανισμών

Έπειτα από τη δειγματοληψία, πραγματοποιήθηκε η αρχική απομόνωση των στελεχών από τον δόκτωρ Χρήστο Χρηστάκη από το εργαστήριο του καθηγητή Παναγιώτη Σαρρή του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Κάθε δείγμα καλλιεργήθηκε σε τέσσερα διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα (NA, NA ½, R2A, MNFMM) και επώαστηκε σε 2 διαφορετικές θερμοκρασίες (5°C, 28°C), προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των στελεχών βάσει φαινοτύπου και προτιμώμενου υποστρώματος και θερμοκρασίας επώασης. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αποθήκευσή τους σε μικροσωληνάριο κρυοδιατήρησης με 50% (v/v) γλυκερόλη και 50% (v/v) υγρό θρεπτικό NB αν είχαν επωαστεί σε θρεπτικό NA, NA ½ ή R2A ή 50% (v/v) απιονισμένο νερό αν είχαν επωαστεί σε θρεπτικό MNFMM και τοποθέτησή τους στους -80°C για μακροχρόνια συντήρηση.

Για την καλλιέργεια των μικροοργανισμών, σε τρυβλίο με κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα, επιστρώθηκε, με τη μέθοδο γραμμικής ράβδωσης (streaking), μικρή ποσότητα από το περιεχόμενο του μικροσωληνάρια κρυοδιατήρησης, και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επώαση σε κατάλληλη θερμοκρασία έως ότου παρατηρηθούν μοναδιαίες αποικίες. Τα κρυοανθεκτικά στελέχη επωάζονταν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 5°C για 7 ημέρες κατά μέσο όρο, προκειμένου να επιτευχθεί η απαιτούμενη ανάπτυξη, ενώ τα στελέχη που τοποθετούνταν σε επωαστήρα στους 28°C χρειάζονταν 3 ημέρες κατά μέσο όρο. Το θρεπτικό υπόστρωμα, η θερμοκρασία επώασης και το βάθος του σπηλαίου από το οποίο απομονώθηκε το κάθε στέλεχος φαίνονται στον Πίνακα 2.3.1.

Εφόσον μετά την επώαση παρατηρούνταν φαινοτυπικές αλλαγές μεταξύ των αποικιών σε ένα τρυβλίο, ακολουθούσαν ανακαλλιέργειες. Κατά την ανακαλλιέργεια, επιλέγεται μία μοναδιαία αποικία από κάθε φαινοτυπικά διαφορετικό στέλεχος που συναντάται σε ένα τρυβλίο, και επιστρώνεται σε διαφορετικό τρυβλίο ώστε να επιτευχθεί ο διαχωρισμός και η απομόνωση των στελεχών. Σε κάποιες περιπτώσεις που ο διαχωρισμός των διαφορετικών στελεχών ήταν ανέφικτος με ανακαλλιέργειες σε στερεό θρεπτικό μέσο, πραγματοποιήθηκε μια μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων. Κατόπιν ενοφθαλμισμού σε αντίστοιχο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα σε σωληνάρια falcon, έγινε επώαση σε ανακινούμενο επωαστήρα (19 rpm) και υπό κατάλληλη θερμοκρασία (28°C ή 5°C), έως ότου η θολερότητα του θρεπτικού υποδείξει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις, από 10^{-1} έως 10^{-8} , και επίστρωση ποσότητας από τις αραιωμένες υγρές καλλιέργειες σε τρυβλία. Καθ' αυτόν τον

τρόπο, ήταν εφικτός ο διαχωρισμός των διαφορετικών αποικιών έπειτα από την ανάπτυξή τους. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν αποθήκευση των διαφορετικών στελεχών στους -80°C.

Πίνακας 2.3.1: Θρεπτικά υποστρώματα, θερμοκρασίες επώασης και βάθη δειγματοληψίας στελεχών.

Στέλεχος	Θρεπτικό	Θερμοκρασία (°C)	Βάθος (m)	Στέλεχος	Θρεπτικό	Θερμοκρασία (°C)	Βάθος (m)
SRL475	NA	28	-1100	SRL1071	R2A	5	-39
SRL476	NA	28	-1100	SRL1072	R2A	5	-39
SRL477	NA	28	-1100	SRL1075	R2A	5	-221
SRL478	NA	28	-1100	SRL1077	R2A	5	-221
SRL479	NA	28	-1100	SRL1079	R2A	5	-418
SRL480	NA	28	-1100	SRL1080	R2A	5	-418
SRL481	NA	28	-1100	SRL1083	R2A	5	-418
SRL678	NA	28	-1100	SRL1087	R2A	5	-677
SRL679	NA	28	-1100	SRL1088	R2A	5	-677
SRL680	NA	28	-1100	SRL1093	R2A	5	-763
SRL681	NA	28	-1100	SRL1095	R2A	5	-763
SRL682	NA	28	-1100	SRL1098	R2A	5	-903
SRL685	NA	28	-1100	SRL1099	R2A	5	-903
SRL687	NA	28	-1100	SRL1107	R2A	5	-1100
SRL695	NA	28	-1100	SRL1131	NA	5	0
SRL696	NA	28	-903	SRL1132	NA	5	0
SRL697	NA	28	-903	SRL1133	NA	5	-39
SRL709	NA	28	-903	SRL1134	NA	5	-39
SRL710	NA	28	-903	SRL1135	NA	5	-39
SRL714	R2A	28	-903	SRL1136	NA	5	-221
SRL715	NA	28	-903	SRL1137	NA	5	-221

SRL716	NA	28	-903
SRL717	NA	28	-903
SRL718	NA	28	-903
SRL720	R2A	28	-903
SRL722	R2A	28	-903
SRL723	R2A	28	-903
SRL724	MNFMM	28	-903
SRL737	NA	28	-677
SRL738	NA	28	-677
SRL739	NA	28	-677
SRL744	NA	28	-903
SRL747	NA	28	-903
SRL748	R2A	28	-903
SRL751	R2A	28	-763
SRL752	R2A	28	-763
SRL763	R2A	28	-418
SRL781	R2A	28	-677
SRL786	R2A	28	-903
SRL798	R2A	28	-1074
SRL803	R2A	28	-1074
SRL805	R2A	28	-221
SRL831	R2A	28	-1074
SRL833	R2A	28	-1074
SRL855	NA	28	-763
SRL856	NA	28	-763
SRL869	NA	28	0
SRL870	NA	28	0
SRL875	NA	28	-418
SRL876	NA	28	-418

SRL1139	NA	5	-221
SRL1141	NA	5	-221
SRL1146	NA	5	-418
SRL1147	NA	5	-677
SRL1152	NA	5	-677
SRL1155	NA	5	-763
SRL1157	NA	5	-903
SRL1158	NA	5	-903
SRL1159	NA	5	-903
SRL1160	NA	5	-903
SRL1162	NA	5	-903
SRL1163	NA	5	-1074
SRL1165	NA	5	-1074
SRL1166	NA	5	-1074
SRL1167	NA	5	-1074
SRL1169	NA	5	-1074
SRL1170	NA	5	-1100
SRL1230	NA	5	-1100
SRL1236	MNFMM	5	-763
SRL1253	MNFMM	5	-677
SRL1260	R2A	5	-1074
SRL1263	R2A	5	-1074
SRL1264	NA	5	-1100
SRL1294	NA	5	-1074
SRL1331	R2A	5	-1074
SRL1337	R2A	28	-903
SRL1338	R2A	28	-903
SRL1339	R2A	28	-903
SRL1340	R2A	28	-903

SRL878	NA	28	-418
SRL898	NA	28	-1074
SRL902	NA	28	-1074
SRL903	NA	28	-1074
SRL905	NA	28	-1074
SRL906	NA	28	-1074
SRL907	NA	28	-1074
SRL922	R2A	28	-763
SRL923	R2A	28	-763
SRL941	R2A	28	-903
SRL944	R2A	28	-903
SRL948	R2A	28	-903
SRL950	R2A	28	-903
SRL954	R2A	28	-903
SRL957	R2A	28	-903
SRL958	R2A	28	-903
SRL959	R2A	28	-903
SRL992	R2A	28	-1100
SRL994	R2A	28	-1100
SRL995	R2A	28	-1100
SRL1013	NA	28	0
SRL1017	NA	28	-221
SRL1028	NA	28	-1074
SRL1030	NA	28	-1074
SRL1062	NA	28	-418
SRL1064	NA	28	0
SRL1069	R2A	5	0

SRL1381	R2A	28	-903
SRL1383	NA	28	-1100
SRL1399	NA	28	-763
SRL1401	R2A	5	-418
SRL1412	R2A	5	-763
SRL1416	MNFMM	28	-1100
SRL1421	NA	28	-763
SRL1432	R2A	5	-418
SRL1433	R2A	5	-763
SRL1434	R2A	5	-763
SRL1437	R2A	5	-763
SRL1438	R2A	28	-903
SRL1440	R2A	28	-903
SRL1442	R2A	28	-903
SRL1443	R2A	28	-903
SRL1452	R2A	28	-903
SRL1454	R2A	5	-418
SRL1456	R2A	28	-1074
SRL1457	R2A	28	-1074
SRL1458	R2A	28	-1074
SRL1484	R2A	28	-1074
SRL1485	R2A	28	-763
SRL1486	R2A	28	-763
SRL1487	R2A	28	-763
SRL1488	R2A	28	-903
SRL1491	R2A	28	-418
SRL1492	R2A	5	-221

2.4 Μοριακή Ταυτοποίηση Μικροοργανισμών

2.4.1 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση γονιδιωματικού DNA από τους μικροοργανισμούς ακολουθήθηκαν δύο πρωτόκολλα. Και οι δύο διαδικασίες έλαβαν χώρα σε συσκευή καθέτου νηματικής ροής τύπου II.

Για το πρωτόκολλο απλής εξαγωγής DNA, σε σωληνάριο erpendorf όγκου 1,5 mL που περιείχε 100μL υπερκάθαρο νερό, προστέθηκε μοναδιαία αποικία του εκάστοτε μικροοργανισμού. Ακολούθησε επώαση σε heat block σε θερμοκρασία 98°C για 10 λεπτά, και έπειτα φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 13.000×g για 10 λεπτά. 20 μL υπερκειμένου, όπου βρίσκεται το DNA, μεταφέρθηκαν σε καθαρό σωληνάριο erpendorf όγκου 1,5 mL και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη (-20°C).

Για το πρωτόκολλο εξαγωγής DNA με Chelex-100 (Sigma-Aldrich, Germany), σε σωληνάριο erpendorf όγκου 1,5 mL που περιείχε 20 μL υπερκάθαρο νερό και 20 μL απόλυτης αιθανόλης (100%), προστέθηκε μοναδιαία αποικία του μικροοργανισμού. Έπειτα από σύντομη ανάδευση σε vortex, στη μέγιστη ταχύτητα, προστέθηκαν 200 μL 10% w/v διαλύματος Chelex. Ακολούθησε ανάδευση σε vortex για 30 δευτερόλεπτα, στη μέγιστη ταχύτητα, έπειτα επώαση σε heat block σε θερμοκρασία 98°C για 20 λεπτά, και τέλος φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 18.000×g για 10 λεπτά. Ο συνολικός όγκος του υπερκειμένου μεταφέρθηκε σε καθαρό σωληνάριο erpendorf όγκου 1,5 mL και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη (-20°C).

2.4.2 Ενίσχυση πλήρους αλληλουχίας 16S rDNA με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Για την ενίσχυση της πλήρους αλληλουχίας 16S rDNA από τους απομονωμένους μικροοργανισμούς πραγματοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρίας MinoTech.

Οι εκκίνητες (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του 16S rDNA φαίνονται στον Πίνακα 2.5.2.1.

Πίνακας 2.5.2.1: Εκκινητές.

Εκκινητές	Αλληλουχία	Αναφορά
Forward: 27F	5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3'	Lane, 1991
Reverse: 1492R	5'-GTTTACCTTGTACGACTT-3'	Lane, 1991

Η σύσταση του μίγματος της αντίδρασης PCR φαίνεται στον Πίνακα 2.5.2.2, και οι συνθήκες υπό τις οποίες διεξήχθη φαίνονται στον Πίνακα 2.5.2.3. Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή Bio-Rad T100™.

Πίνακας 2.5.2.2: Σύσταση μίγματος αντίδρασης PCR.

Συστατικά	Αρχική Συγκέντρωση (Stock)	Όγκος ανά αντίδραση των 25μL	Τελική συγκέντρωση ανά αντίδραση των 25μL
Taq Buffer w/ MgCl ₂	10X	2.5 μL	1X
Forward Primer (27F)	10 μM	1.25 μL	250 nM
Reverse Primer (1492R)	10 μM	1.25 μL	250 nM
dNTPs mix (1:1:1:1)	10 μM	0.5 μL	200 nM
Taq Polymerase	5 U	0.2 μL	0.04 U
PCR Grade water	-	17.3 μL	-
DNA template	Μεταβλητό	2 μL	Μεταβλητό

Πίνακας 2.5.2.3: Συνθήκες PCR.

Βήμα	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	94°C	2 min	1
Αποδιάταξη	94°C	45 sec	30
Υβριδισμός	55°C	30 sec	
Επιμήκυνση	72°C	90 sec	
Τελική Επιμήκυνση	72°C	10 min	1

2.4.3 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων αντίδρασης PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Για τον ποιοτικό έλεγχο των αποτελεσμάτων της αντίδρασης PCR, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% (w/v), στο οποίο προστέθηκε ως χρώση διάλυμα Βρωμιούχου Αιθιδίου (10 mg/mL).

Ως ηλεκτροφορητικό μέσο κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιήθηκε διάλυμα TBE. Η σύσταση ενός λίτρου διαλύματος TBE (5X) φαίνεται στον πίνακα (Πίνακας 2.5.3.1). Για την ηλεκτροφόρηση απαιτείται TBE (0,5X), όποτε στη συνέχεια πραγματοποιείται 1:10 αραίωση του διαλύματος με απιονισμένο νερό.

Πίνακας 2.5.3.1. Παρασκευή διαλύματος TBE (5X).

Συστατικά	Συγκέντρωση
Tris	54 g/L
Boric Acid	27,5 g/L
Na ₂ EDTA (0,5M)	20 mL/L
Απιονισμένο Νερό	Έως τα 1000 mL
pH=8	

Από κάθε προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν 5 μ L, στα οποία είχε γίνει προσθήκη 1 μ L διαλύματος της φθορίζουσας χρωστικής OrangeG (6X).

Για να ελεγχθεί το επιθυμητό μήκος αλληλουχίας των προϊόντων, χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης μοριακών μεγεθών λ/StyI (buffer R3, OrangeG). Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 100 V για 30 λεπτά, και στη συνέχεια οι ζώνες που ενισχύθηκαν κατά την αντίδραση PCR προβλήθηκαν υπό υπεριώδη ακτινοβολία, και έγινε λήψη φωτογραφιών του πηκτώματος, προς μετέπειτα επιλογή των κατάλληλων για αλληλούχιση δειγμάτων.

2.4.4 Ανάλυση πλήρους αλληλουχίας 16S rDNA

Για την ανάλυση της αλληλουχίας 16S rDNA των απομονωμένων μικροοργανισμών, επιλέχθηκαν τα δείγματα στα οποία είχε πραγματοποιηθεί επιτυχώς ενίσχυση της αλληλουχίας με PCR, και τα δείγματα αυτά στάλθηκαν στον εμπορικό πάροχο Eurofins Genomics Europe Pharma and Diagnostics Products & Services Sanger/PCR GmbH.

Κατόπιν επεξεργασίας των αποτελεσμάτων μέσω αξιολόγησης των χρωματογραφημάτων των αλληλουχίσεων, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αλληλουχιών με ήδη γνωστές, οι οποίες είχαν καταχωρηθεί στην τράπεζα γονιδίων NCBI, με τη χρήση του αλγόριθμου BLASTn (Sayers et al.,

2022), προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι μικροοργανισμοί βάσει της μέγιστης ομοιότητας της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας με αυτή του κοντινότερου συγγενή.

2.5 Επιλογή Στελεχών Στρεπτομυκήτων για Αλληλλούχιση Ολικού Γονιδιώματος

2.5.1 Καλλιέργεια Στρεπτομυκήτων

Τα στελέχη SRL740, SRL742, SRL1020 και SRL1060, βάσει προηγούμενων αναλύσεων, είχαν συσχετιστεί με το γένος των στρεπτομυκήτων. Καλλιεργήθηκαν σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα NA και επώαστηκαν σε θερμοκρασία 28°C για 3 ημέρες. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός μοναδιαίας αποικίας σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα NB σε σωληνάριο falcon και έγινε επώαση σε ανακινούμενο επωαστήρα (19 rpm) στους 28°C για 3 ημέρες.

2.5.2 Παρασκευή αντιδραστηρίων για πρωτόκολλο απομόνωσης DNA

Για το πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού γονιδιωματικού DNA, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα.

Για την παρασκευή διαλύματος Tris-HCl συγκέντρωσης 1 M και όγκου 50 mL, διαλύθηκαν 6,05 g Tris Base σε 35 mL απιονισμένου νερού, το pH προσαρμόστηκε στο 8 με HCl και στη συνέχεια συμπληρώθηκε απιονισμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο των 50mL. Για την παρασκευή διαλύματος EDTA συγκέντρωσης 0,5 M και όγκου 50 mL, διαλύθηκαν 9,305 g Na₂EDTA σε 40mL απιονισμένου νερού, το pH προσαρμόστηκε στο 8 με NaOH και στη συνέχεια συμπληρώθηκε απιονισμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο των 50 mL. Για την παρασκευή διαλύματος NaCl συγκέντρωσης 5 M και όγκου 50 mL, διαλύθηκαν 14,6 g NaCl σε 50 mL απιονισμένου νερού. Τα διαλύματα αποστειρώθηκαν σε χύτρα στους 121 °C για 20 λεπτά.

Τα παραπάνω διαλύματα στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των buffer TEN και TEN*, η σύσταση των οποίων φαίνεται στον Πίνακα 2.5.2.

Πίνακας 2.5.2. Παρασκευή buffer TEN και TEN*

Συστατικά	Συγκέντρωση	
	TEN	TEN*
Διάλυμα Tris-HCl	10 mM	10 Mm
Διάλυμα EDTA	10 mM	1 mM
Διάλυμα NaCl	150 mM	50 mM

Απιονισμένο νερό	Έως τα 50 mL	Έως τα 50 mL
------------------	--------------	--------------

Επιπλέον, παρασκευάστηκε διάλυμα φαινόλης ισορροπημένης σε buffer Tris-HCl. Αρχικά προετοιμάστηκε διάλυμα Tris-HCl συγκέντρωσης 50 mM όγκου και 500 mL. Δοχείο φαινόλης 100 g (Sigma-Aldrich, Germany) τοποθετείται στους 68°C για 40 λεπτά ώστε να μετατραπεί σε υγρή μορφή. Η διαδικασία συνεχίζεται εντός απαγωγού. Η υγρή πλέον φαινόλη μεταφέρεται προσεκτικά σε γυάλινο μπουκάλι όγκου 250 mL, το οποίο περιέχει μαγνήτη και βρίσκεται τοποθετημένο επάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα. Η ανάδευση πραγματοποιείται σε χαμηλή περιστροφική ταχύτητα προκειμένου να αποφευχθεί η εκτόξευση υγρού εκτός του μπουκαλιού. Για την προστασία της φαινόλης από οξείδωση, προστίθεται 0.1 g από την αντιοξειδωτική ουσία 8-Hydroxiquinoline, και το υγρό αποκτά πορτοκαλί χρώμα. Στη συνέχεια, για την εξισορρόπηση της φαινόλης, προστίθενται 100 mL διαλύματος Tris-HCl, και τοποθετείται το καπάκι του μπουκαλιού κατά την ανάδευση για ασφάλεια. Αφού σταματήσει η ανάδευση, ακολουθεί αναμονή περίπου 20 λεπτών ώσπου να διαχωριστούν οι δύο φάσεις. Στη συνέχεια, αφαιρείται η υδατική φάση του Tris-HCl, και προστίθενται εκ νέου 100 mL Tris-HCl. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για δύο φορές, χωρίς όμως να αφαιρεθεί το Tris-HCl μετά το διαχωρισμό των φάσεων τη δεύτερη φορά. Στη συνέχεια, ελέγχεται με πεχαμετρικό χαρτί εάν το pH της φαινόλης είναι το επιθυμητό (pH=7), αλλιώς επαναλαμβάνεται η διαδικασία αφαίρεσης και εκ νέου προσθήκης Tris-HCl. Το διάλυμα φαινόλης σε Tris-HCl αποθηκεύεται στο ψυγείο, αφού το μπουκάλι που την περιέχει τυλιχθεί με αλουμινόχαρτο για προστασία λόγω φωτοευαισθησίας.

2.5.3 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του γενετικού υλικού των στελεχών έγινε αρχικά δοκιμαστικά με Chelex (Ενότητα 2.4.1), κατόπιν της ανάπτυξης τους σε τρυβλίο με θρεπτικό ΝΑ.

Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε ένα πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού γονιδιωματικού DNA υψηλής καθαρότητας, κατάλληλο για απομόνωση μεγάλης ποσότητας και μεγάλου μοριακού βάρους DNA. Πρόκειμένου να εξασφαλιστεί η υψηλή απαιτούμενη συγκέντρωση γενετικού υλικού (≥ 5 ng/ μ L) για την επικείμενη αλληλούχιση ολικού γονιδιώματος, προετοιμάστηκαν τρεις υγρές καλλιέργειες όγκου 20 mL σε σωληνάρια falcon όγκου 50 mL. Έπειτα από τριήμερη επώαση σε ανακινούμενο επωαστήρα (19 rpm) στους 28°C, εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των σωληναρίων falcon που περιείχαν τις υγρές καλλιέργειες των στελεχών, με σκοπό την καθίζηση των μικροβιακών κυττάρων. Έπειτα από επαναλήψεις, διαπιστώθηκε ότι η κατάλληλη ταχύτητα για επιτυχή σχηματισμό ιζήματος ήταν τα 18.000×g, σε συνδυασμό με τη χαμηλή θερμοκρασία των 4°C.

Τα πρώτα βήματα του πρωτοκόλλου πραγματοποιήθηκαν εντός συσκευής καθέτου νηματικής ροής. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα buffer TEN

(Ενότητα 2.5.2), και το διάλυμα μεταφέρθηκε σε σωληνάριο erppendorf όγκου 2 mL. Στο διάλυμα προστέθηκαν 20 μ L λυσοζύμης (20 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Germany), διαλυμένης σε υπερκάρθρο νερό, και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 2 μ L ριβονουκλεάσης A (RNase A) (Sigma-Aldrich, Germany), διαλυμένης σε υπερκάρθρο νερό (20 mg/mL), και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 65°C για 3 λεπτά.

Τα επόμενα βήματα του πρωτοκόλλου πραγματοποιήθηκαν στον εργαστηριακό πάγκο. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 40 μ L διαλύματος SDS 10%, 10 μ L διαλύματος πρωτεΐνάσης K και 550 μ L διαλύματος buffer TEN* (Ενότητα 2.5.2). Έπειτα από ήπια ανακίνηση για ανάδευση, έγινε επώαση σε θερμοκρασία 60°C για 2 ώρες. Στη συνέχεια, κάθε δείγμα ογκομετρήθηκε και χωρίστηκε σε 2 σωληνάρια erppendorf όγκου 2 mL, ώστε να προστεθεί σε καθένα από αυτά διάλυμα οξικού νατρίου συγκέντρωσης 3M σε όγκο ίσο με 1/10 του όγκου δείγματος, και ισοπροπανόλη σε όγκο ίσο με τον όγκο δείγματος. Έπειτα από ήπια ανάδευση με χρήση πιπέτας, έγινε επώαση στον πάγκο για 20 λεπτά και μετά ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 5.000 $\times$ g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε προσεκτικά ώστε να μην διαταραχθεί το βλεννώδες ίζημα, και στη συνέχεια σε ένα εκ των δύο σωληνάρια erppendorf κάθε δείγματος, προστέθηκαν 400 μ L TEN και 550 μ L TEN* προς επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος. Κατόπιν επίτευξης αυτού, το διάλυμα μεταφέρθηκε στο αντίστοιχο δεύτερο σωληνάριο erppendorf, για να πραγματοποιηθεί επαναδιαλυτοποίηση και αυτού του ιζήματος.

Το πρωτόκολλο συνεχίστηκε εντός του απαγωγού. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 900 μ L φαινόλης, η οποία είχε ισορροπηθεί σε buffer Tris-HCl, όπως προαναφέρθηκε, ακολούθησε ήπια ανάδευση μέσω ανακίνησης και φυγοκέντρηση στα 13.000 $\times$ g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η υδατική φάση μεταφέρθηκε σε καινούριο σωληνάριο erppendorf, και το προηγούμενο βήμα επαναλήφθηκε. Αφού μεταφέρθηκε ξανά η υδατική φάση σε καινούριο σωληνάριο erppendorf, σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 900 μ L διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 24:1, ακολούθησε ήπια ανάδευση μέσω ανακίνησης και φυγοκέντρηση στα 13.000 $\times$ g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η υδατική φάση μεταφέρθηκε σε καινούριο σωληνάριο erppendorf, και το προηγούμενο βήμα επαναλήφθηκε. Η υδατική φάση κάθε δείγματος μεταφέρθηκε αυτή τη φορά σε falcon όγκου 50 mL που περιείχε 10 mL παγωμένης απόλυτης αιθανόλης (100°).

Το DNA πλέον αιωρούνταν στην αιθανόλη. Με αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur, η οποία με τη χρήση φλόγας είχε σχηματίσει άγκιστρο στην άκρη, το DNA συλλέχθηκε και στεγνώθηκε από αιθανόλη στον απαγωγό. Στη συνέχεια, το DNA επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 100 μ L διαλύματος Tris-HCl συγκέντρωσης 10mM, εντός σωληνάρια erppendorf όγκου 1,5 mL, και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη (-20°C).

2.5.4 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων απομόνωσης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Για τον ποιοτικό έλεγχο των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της απομόνωσης DNA. Παρασκευάστηκε πήκτωμα αγαρόζης 1.2% w/v, και σε αυτό φορτώθηκαν 5 μL από κάθε δείγμα, στα οποία είχε προστεθεί 1 μL χρωστικής Orange G 6x. Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 90 V για 3 ώρες. Το επιθυμητό αποτέλεσμα ήταν η εμφάνιση μοναδικής, ενιαίας και συμπαγούς ζώνης, προκειμένου να αποκλειστεί το ενδεχόμενο του κατακερματισμένου DNA. Για να υπολογιστεί το μήκος αλληλουχίας των προϊόντων, χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης μοριακών μεγεθών $\lambda/\text{HindIII}$ (buffer R2, OrangeG).

2.5.5 Φωτομέτρηση προϊόντων απομόνωσης DNA σε φασματοφωτόμετρο Nanodrop

Για τον ποσοτικό έλεγχο των αποτελεσμάτων, τα προϊόντα της απομόνωσης DNA μετρήθηκαν στο Nanodrop™ Spectrophotometer. Κατόπιν μηδένισης με Tris-HCl συγκέντρωσης 10mM, φορτώθηκε 1 μL από κάθε δείγμα και μετρήθηκε η απορρόφηση. Για την επιβεβαίωση της παρουσίας νουκλεϊκού οξέος, στο διάγραμμα της καμπύλης απορρόφησης αναμένεται η κορυφή της καμπύλης στα 260 nm. Εκτός της μέτρησης της συγκέντρωσης (ng/ μL), ελέγχθηκαν οι λόγοι των απορροφήσεων 260/280 και 260/230, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η καθαρότητα των δειγμάτων. Το επιθυμητό αποτέλεσμα είναι ο λόγος των απορροφήσεων 260/280 να είναι περίπου 1.8, ο λόγος των απορροφήσεων 260/230 να είναι από 1.8 έως 2.2 (Bradburn, 2019).

2.5.6 Φθορομέτρηση προϊόντων απομόνωσης DNA με φθορισμόμετρο Qubit

Για τον ποσοτικό έλεγχο των αποτελεσμάτων με έναν ακόμη τρόπο, πιο εξειδικευμένο για δίκλωνο DNA (dsDNA), τα προϊόντα της απομόνωσης DNA μετρήθηκαν στο φθοροόμετρο Qubit (Invitrogen, USA). Το φθοροόμετρο Qubit ποσοτικοποιεί το ακέραιο dsDNA βάσει της έντασης του φθορισμού της φθορίζουσας χρωστικής που συνδέεται με αυτό, παρέχοντας έτσι ταυτόχρονα και πληροφορία για πιθανό κατακερματισμό του DNA (Nakayama et al., 2016). Χρησιμοποιήθηκε το Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit. Παρασκευάστηκε διάλυμα του αντιδραστήριου Qubit dsDNA HS σε συγκέντρωση 1:200 στο Qubit dsDNA HS Buffer. Στο κιτ περιέχονται 2 standards, από τα οποία απαιτείται ποσότητα 10 μL , σε 190 μL του διαλύματος αντιδραστήριου-buffer. Από τα δείγματα μπορούν να μετρηθούν από 1 έως 20 μL , αρκεί να συμπληρωθεί διάλυμα αντιδραστήριου-buffer μέχρι τελικό όγκο 200 μL . Κατόπιν ανάδευσης σε vortex, έγινε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά, και στη συνέχεια μετρήθηκε η συγκέντρωση κάθε δείγματος και υπολογίστηκε με τον τύπο που φαίνεται στην Εικόνα 2.6.5.1 (Nakayama et al., 2016).

$$\text{Concentration of your sample} = \text{QF value} \times \frac{200}{x}$$

where QF value = the value given by the Qubit® 2.0 Fluorometer
x = the number of microliters of sample added to the assay tube

2.5.7 Ανάλυση αλληλουχίας DNA: Συναρμολόγηση

Τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση ολικού γονιδιώματος στον εμπορικό πάροχο BGI Tech Solutions (Poland).

Για βέλτιστα αποτελέσματα, επιλέχθηκε η αλληλούχιση με δύο τεχνολογίες: αλληλούχιση με μικρά μήκη και αλληλούχιση με μεγάλα μήκη. Για την αλληλούχιση με μικρά μήκη ανάγνωσης επιλέχθηκε η τεχνολογία DNA Nanoball, ενώ για την αλληλούχιση με μεγάλα μήκη ανάγνωσης επιλέχθηκε η τεχνολογία Oxford Nanopore.

Η συναρμολόγηση του γονιδιώματος έγινε αρχικά ξεχωριστά για την αλληλούχιση μικρών και μεγάλων αναγνώσεων, και ακολούθησε υβριδική συναρμολόγηση για βέλτιστα αποτελέσματα. Για τη συναρμολόγηση των μικρών αναγνώσεων, πραγματοποιήθηκε αρχικά έλεγχος ποιότητας μέσω του εργαλείου fastp v0.23.4, με προκαθορισμένες παραμέτρους, και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ο συναρμολογητής raven 1.8.1 (Vaser & Šikić, 2021). Για τη συναρμολόγηση των μεγάλων αναγνώσεων, πραγματοποιήθηκε έλεγχος ποιότητας μέσω του εργαλείου filtlong v0.2.1, με προκαθορισμένες παραμέτρους, και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ο συναρμολογητής Unicycler v0.5.0 (Wick et al., 2017). Για την υβριδική συναρμολόγηση των μικρών και μεγάλων αναγνώσεων, χρησιμοποιήθηκε ο συναρμολογητής Unicycler v0.5.0 (Wick et al., 2017).

2.5.8 Ανάλυση αλληλουχίας γονιδιωματικού DNA: Annotation, εξόρυξη γονιδιωμάτων και φυλογένεση

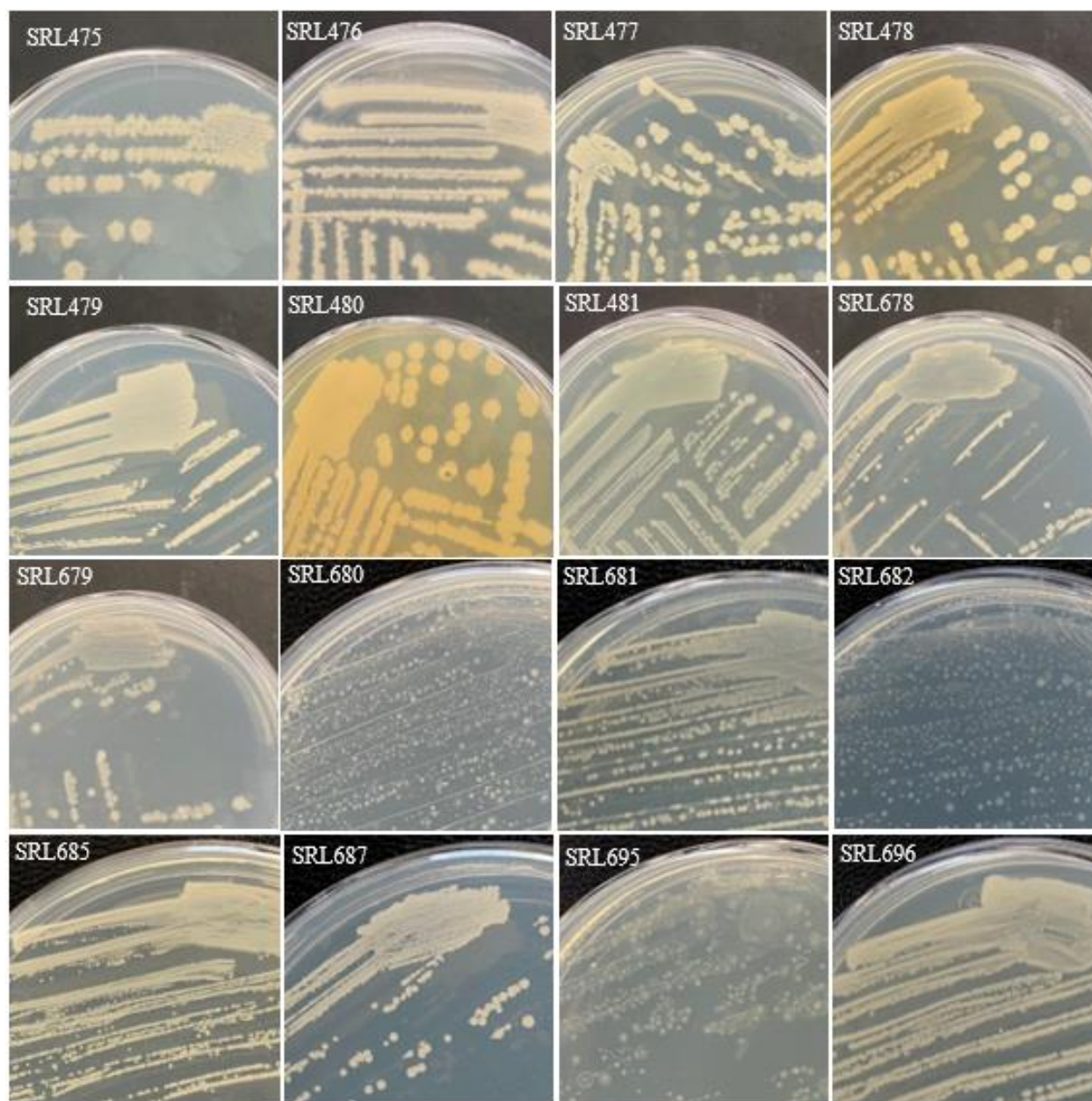
Αφού ολοκληρώθηκε η συναρμολόγηση των γονιδιωμάτων, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αλληλουχιών με τις ήδη γνωστές και καταχωρημένες στη βάση δεδομένων GenomesDB του διακομιστή JSpeciesWS 4.1.1 (Richter et al., 2016), προκειμένου να ταυτοποιηθεί το είδος βάσει σύγκρισης του ποσοστού νουκλεοτιδικής ομοιότητας (ANI; Average Nucleotide Identity), με τις προεπιλεγμένες παραμέτρους. Μέσω του Proksee v1.0.0a6, δημιουργήθηκαν οι χάρτες των γονιδιωμάτων. Το Proksee αποτελεί ένα σύστημα που παρέχει τη δυνατότητα οπτικοποίησης αποτελεσμάτων συναρμολόγησης γονιδιώματος, annotation γονιδίων με πολλά διαφορετικά, εξειδικευμένα και μη προγράμματα, και πολλών άλλων εργαλείων με στόχο τη βέλτιστη ανάλυση βακτηριακών γονιδιωμάτων (Grant et al., 2023). Η εξόρυξη των γονιδιωμάτων για νησίδες βιοσυνθετικών γονιδίων δευτερογενών μεταβολιτών έγινε με χρήση του εργαλείου antiSMASH 7.0 (Blin et al., 2023), με παραμέτρους ήπιας αυστηρότητας κατά την ανίχνευση νησίδων γονιδίων και ενσωμάτωση όλων των επιπλέον επιλογών αναλύσεων. Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω της πλατφόρμας KBase (Arkin et al., 2018), όπου πραγματοποιήθηκε annotation με Prokka σε κάθε γονιδίωμα, και στη συνέχεια κατασκευάστηκε ένα φυλογενετικό

δέντρο, με σκοπό την οπτικοποίηση των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των υπό μελέτη στελεχών και των συγγενικών τους ειδών.

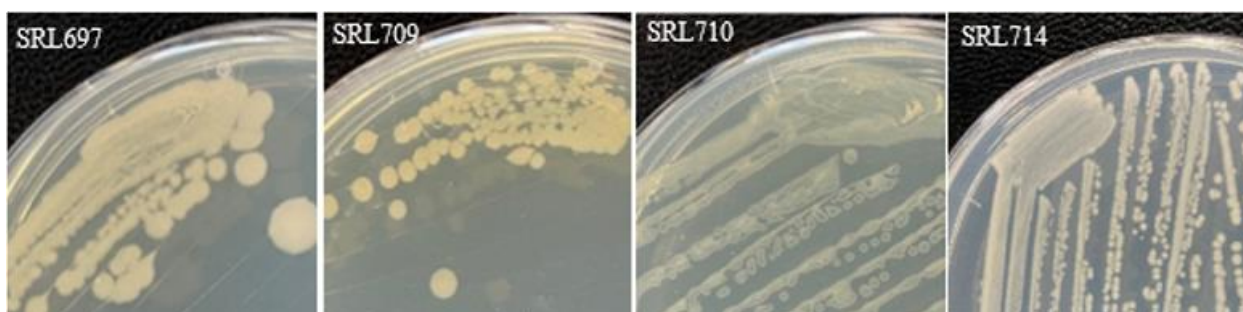
Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα

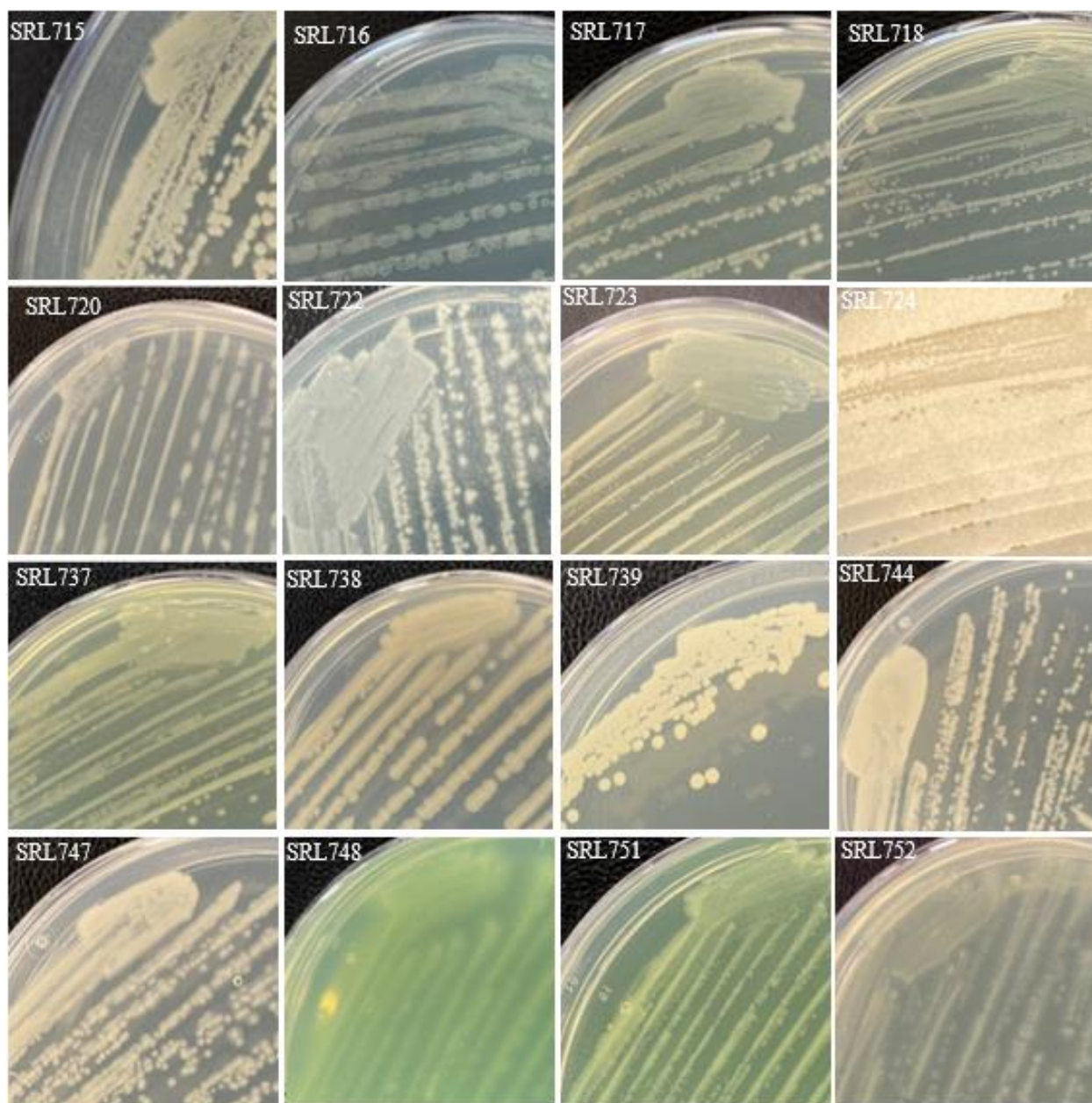
3.1 Απομόνωση και Καλλιέργεια Μικροοργανισμών

Οι μικροοργανισμοί καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία με κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα και επώαστηκαν σε κατάλληλη θερμοκρασία έως ότου να παρατηρηθούν μοναδιαίες αποικίες. Οι φαινότυποι των στελεχών που αλληλουχήθηκαν φαίνονται στις Εικόνες 3.1.1-3.1.8.

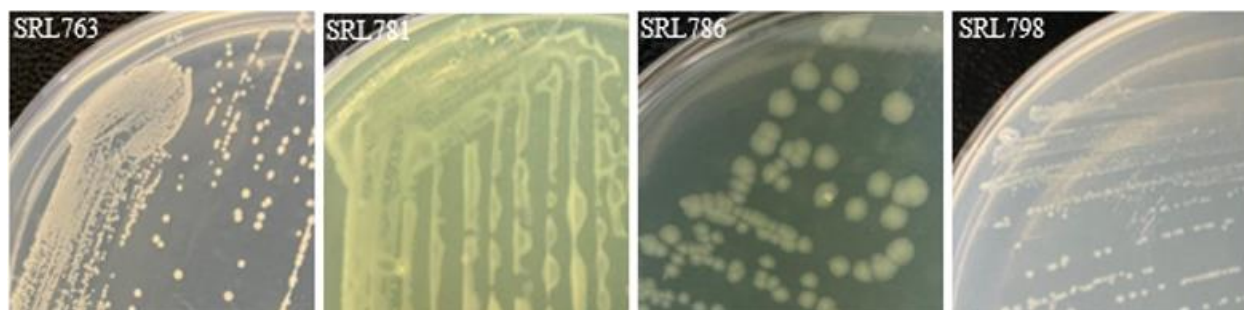


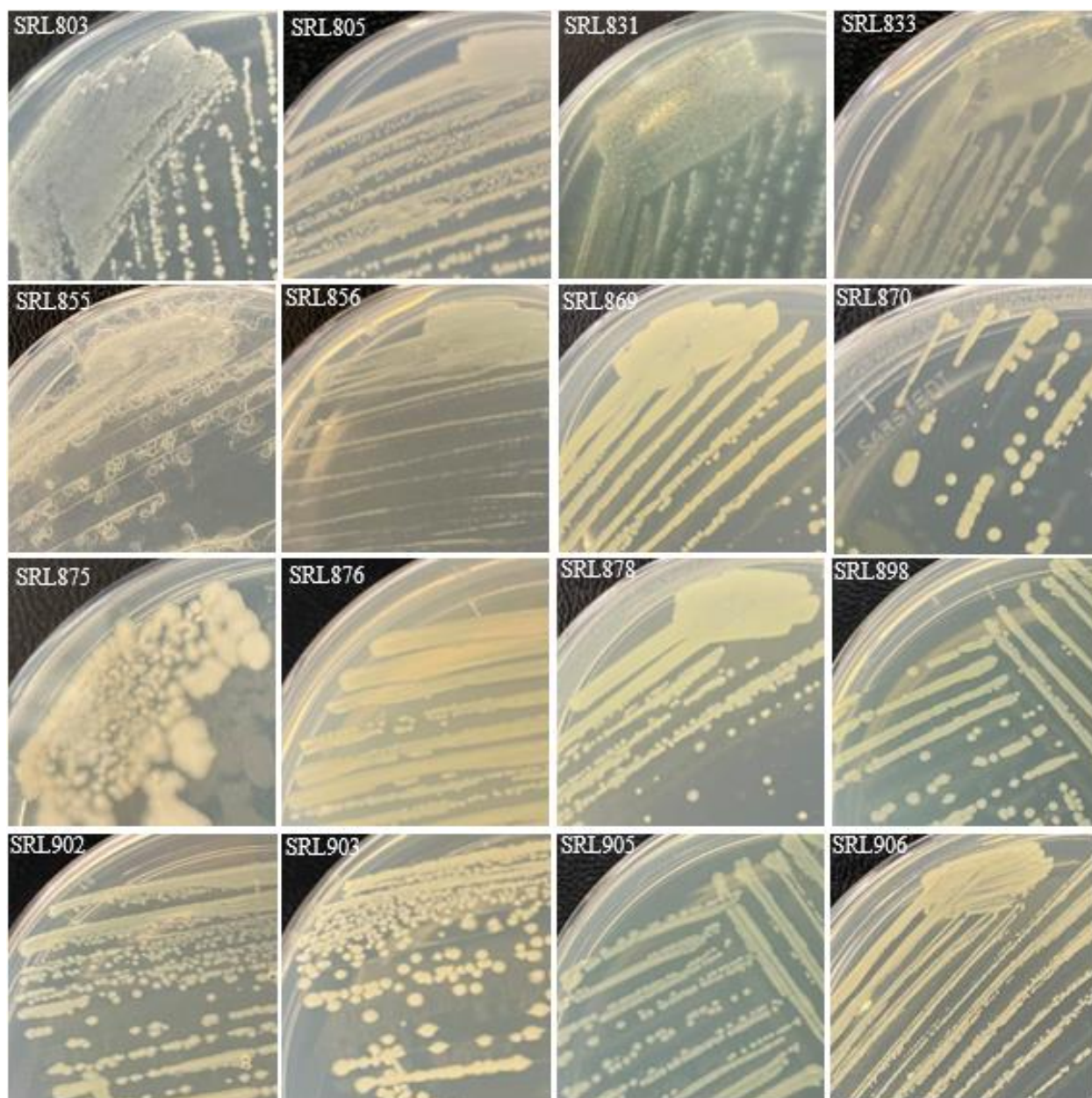
Εικόνα 3.1.1. Φαινότυποι στελεχών που στάλθηκαν για αλληλούχηση 16S rDNA.





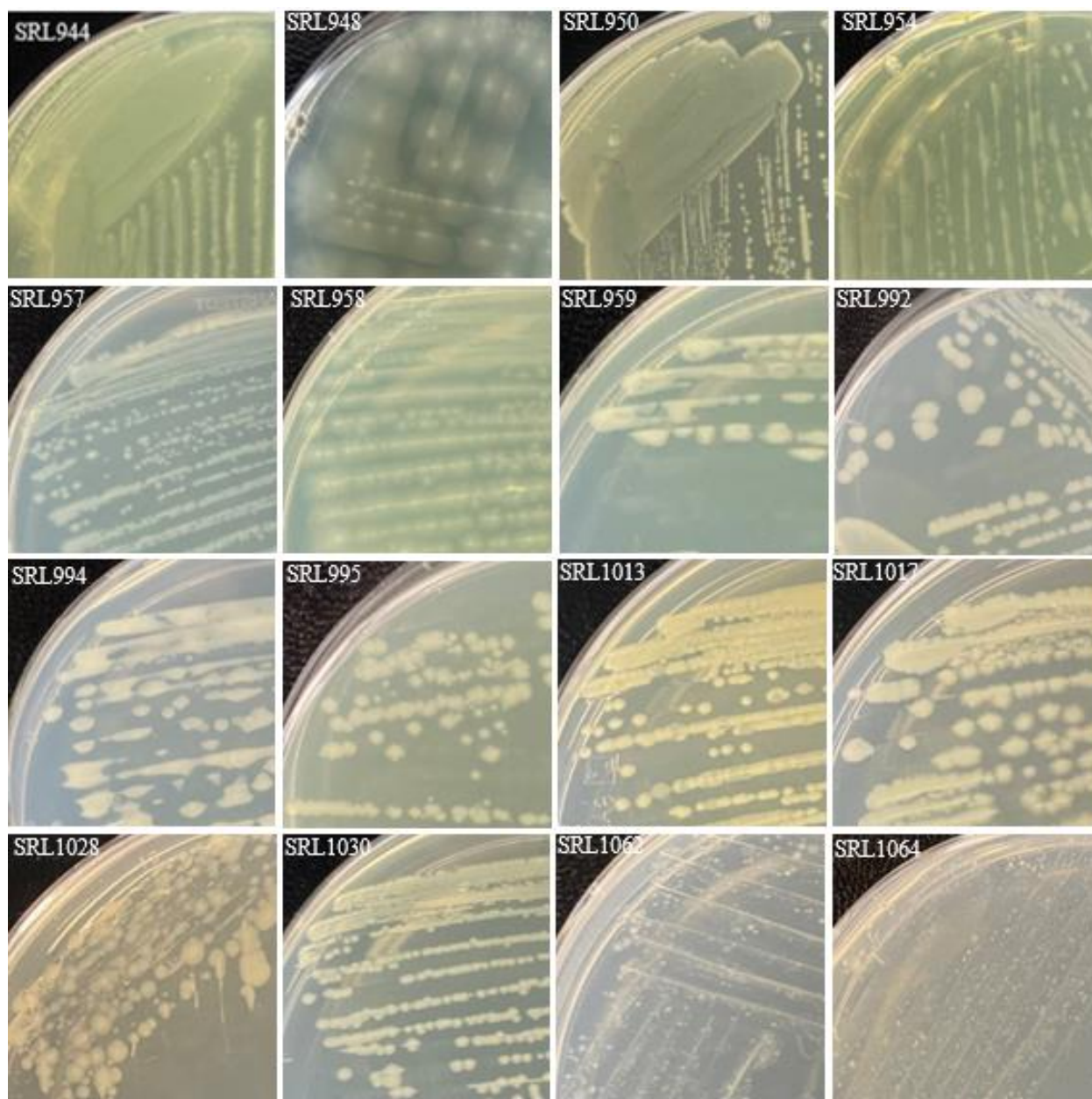
Εικόνα 3.1.2. Φαινότυποι στελεχών που στάλθηκαν για αλληλούχιση 16S rDNA.



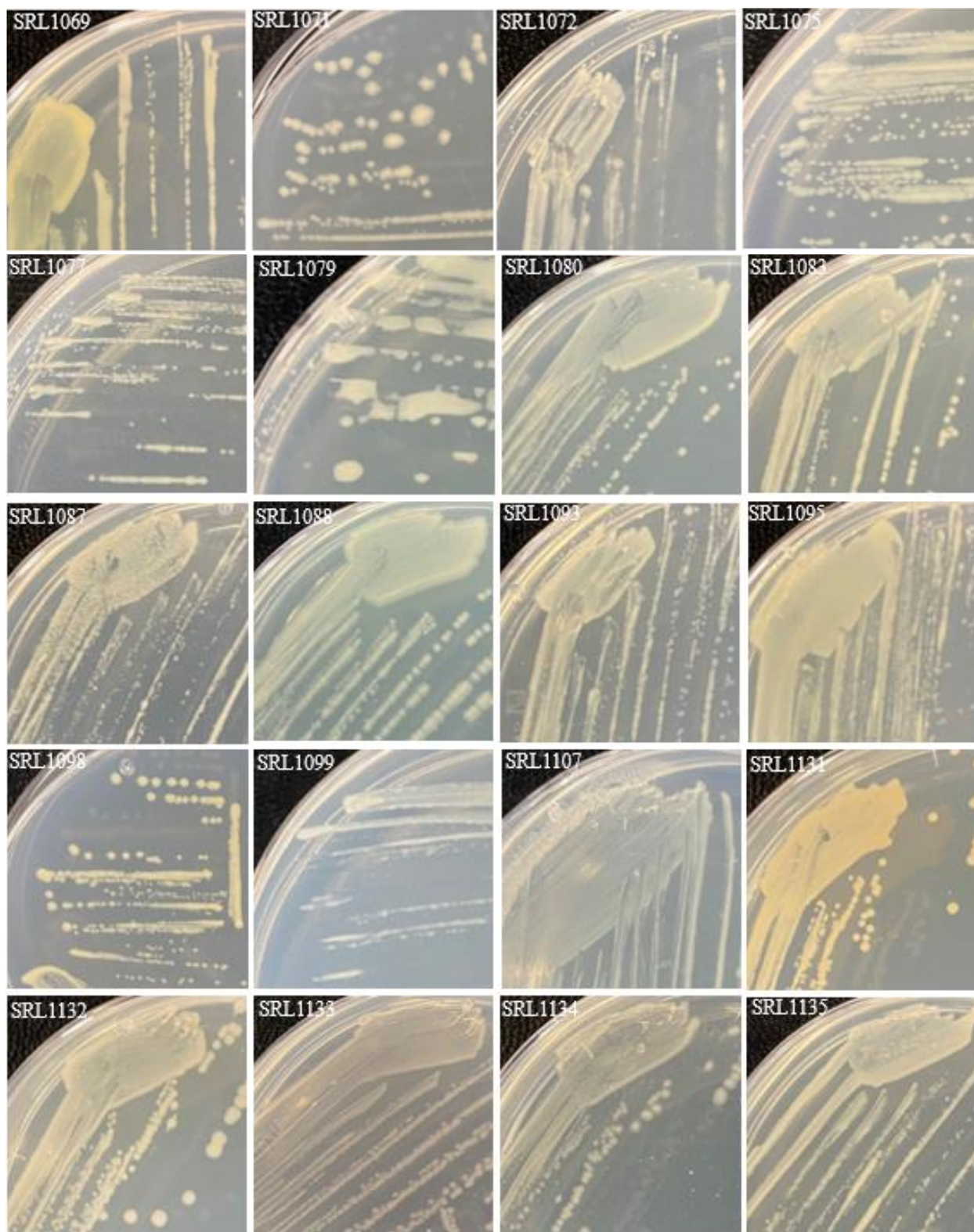


Εικόνα 3.1.3. Φαινότυποι στελεχών που στάλθηκαν για αλληλούχηση 16S rDNA.

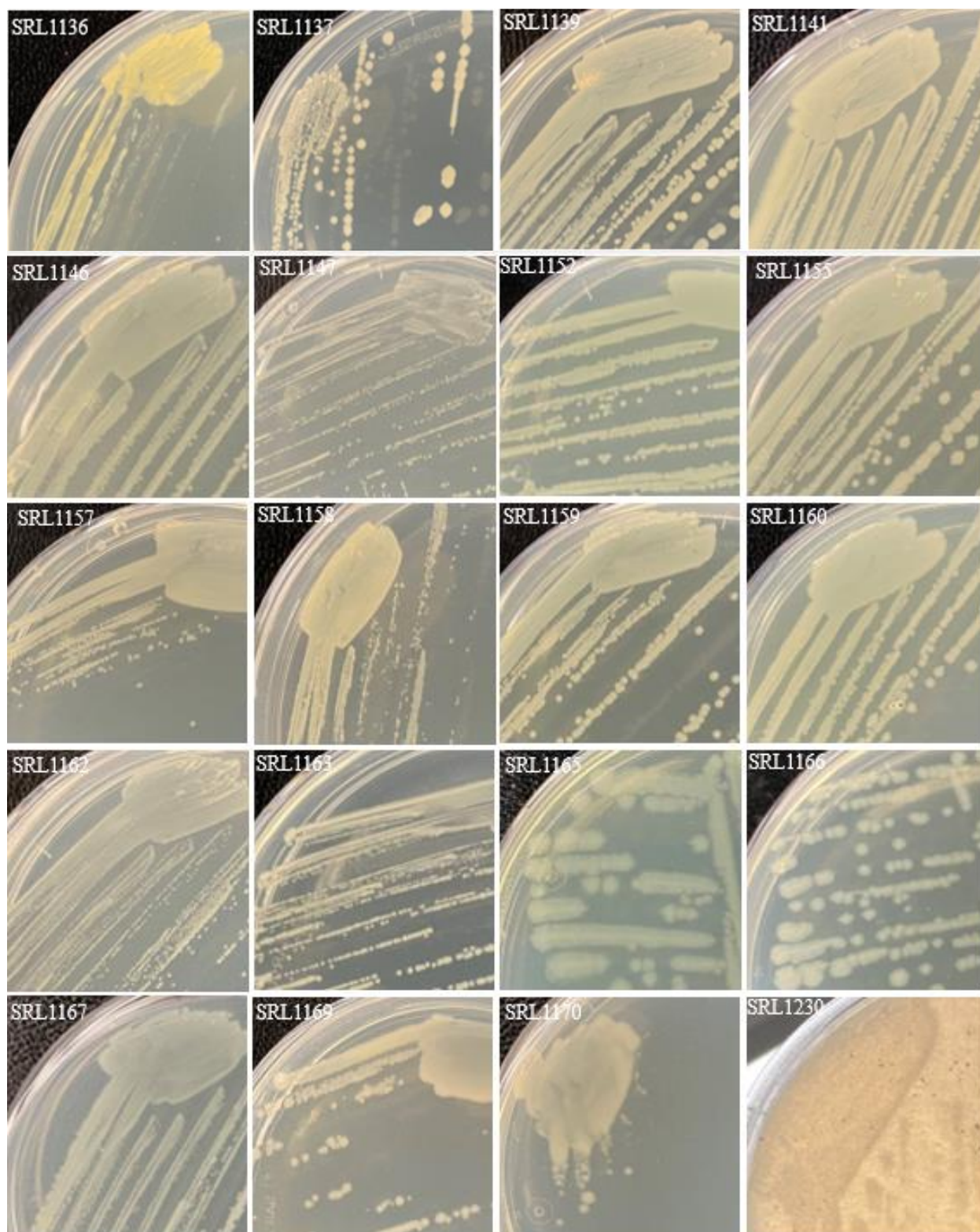




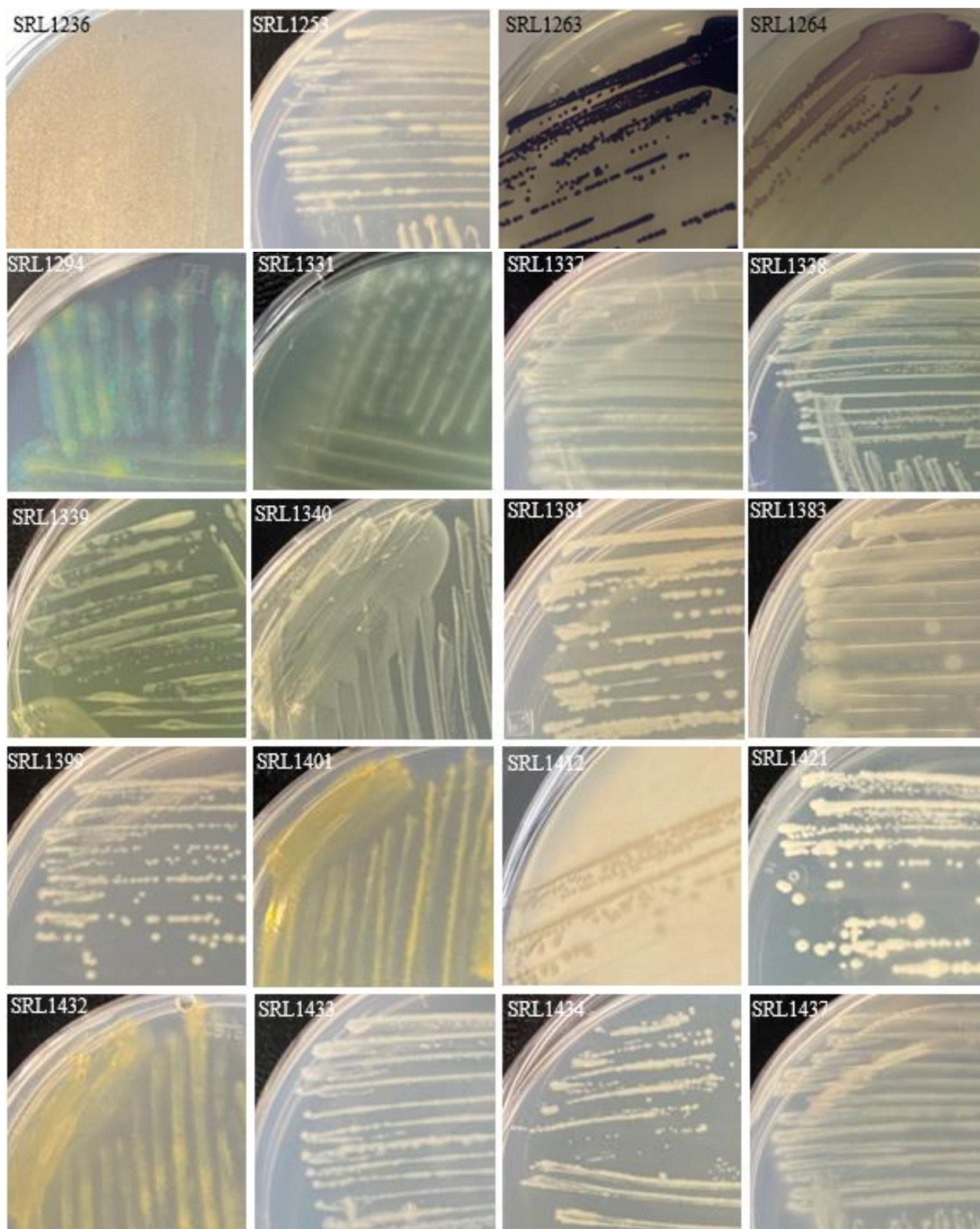
Εικόνα 3.1.4. Φαινότυποι στελεχών που στάλθηκαν για αλληλούχιση 16S rDNA.



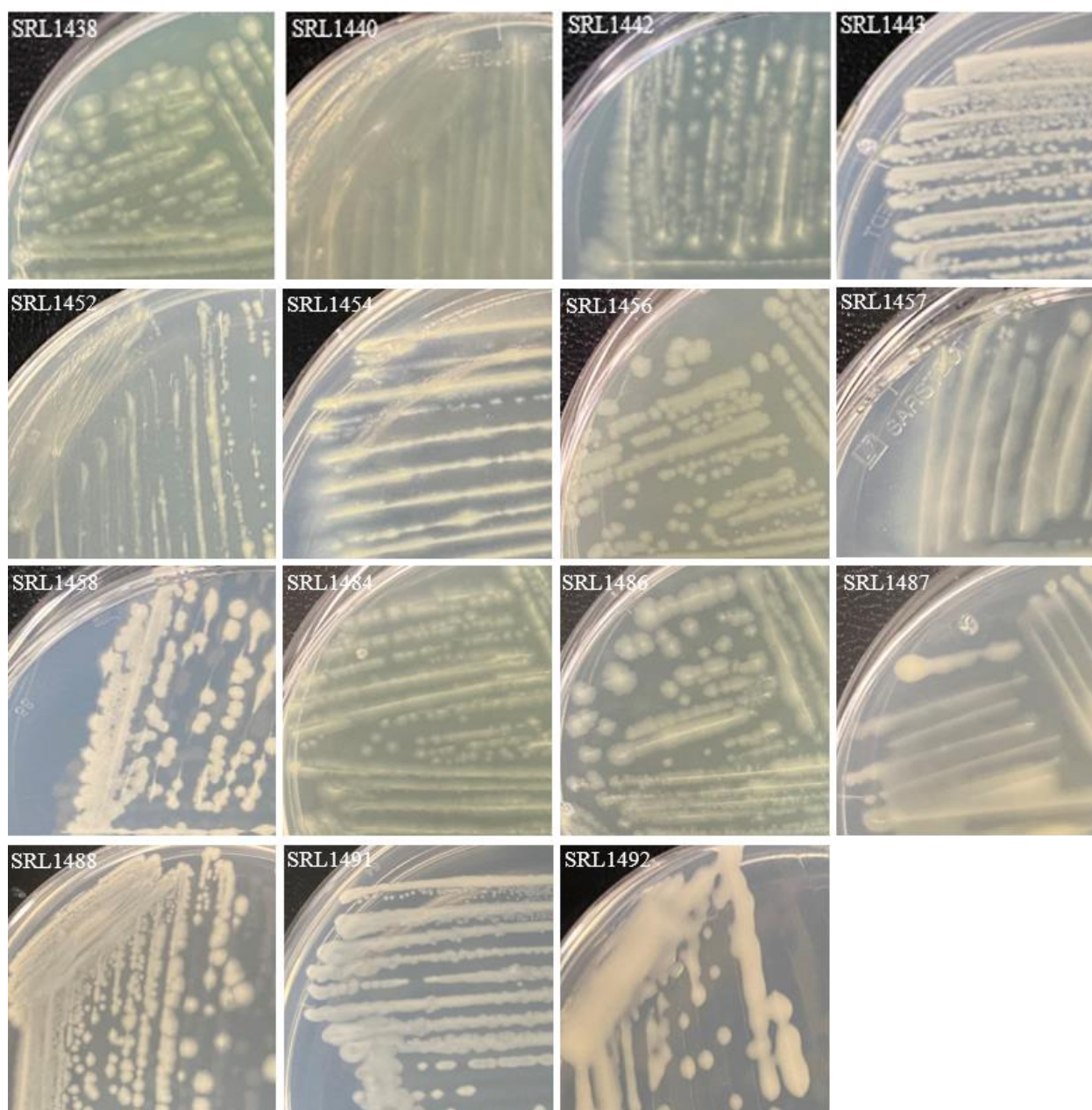
Εικόνα 3.1.5. Φαινότυποι στελεχών που στάλθηκαν για αλληλούχηση 16S rDNA.



Εικόνα 3.1.6. Φαινότυποι στελεχών που στάλθηκαν για αλληλούχιση 16S rDNA.

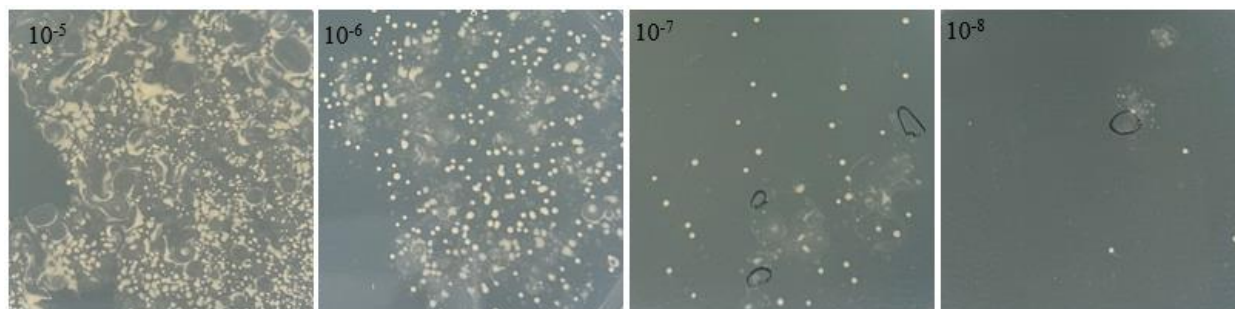


Εικόνα 3.1.7. Φαινότυποι στελεχών που στάλθηκαν για αλληλούχιση 16S rDNA.



Εικόνα 3.1.8. Φαινότυποι στελεχών που στάλθηκαν για αλληλούχιση 16S rDNA.

Στην Εικόνα 3.1.2. φαίνονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα διαχωρισμού στελεχών που βρίσκονταν σε ένα τρυβλίο, καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό και στη συνέχεια, έπειτα από διαδοχικές αραιώσεις, απλώθηκαν σε τρυβλίο.



Εικόνα 3.1.2. Διαχωρισμός στελεχών μέσω της μεθόδου διαδοχικών αραιώσεων.

3.2 Αποτελέσματα Μοριακής Ταυτοποίησης Μικροβιώματος

Στο γενετικό υλικό που απομονώθηκε από τους απομονωμένους μικροοργανισμούς, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rDNA μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Έπειτα, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR. Το ενισχυμένο προϊόν στάλθηκε για αλληλούχιση τύπου Sanger και τα αποτελέσματα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία από τον αλγόριθμο BLASTn, με σκοπό την μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών. Τα αποτελέσματα της ταξινόμησης παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2. Αποτελέσματα Μοριακής Ταυτοποίησης Μικροβιώματος.

Στέλεχος	Φύλο	Είδος	Ομολογία
SRL475	Firmicutes	<i>Cytobacillus oceanisediminis</i>	100%
SRL476	Firmicutes	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100%
SRL477	Firmicutes	<i>Bacillus cereus</i>	100%
SRL478	Firmicutes	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100%
SRL479	Firmicutes	<i>Bacillus sp. strain Z100</i>	100%
SRL480	Firmicutes	<i>Bacillus mycoides</i>	100%
SRL481	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. strain DYY12</i>	100%
SRL678	Firmicutes	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	99,69%
SRL679	Firmicutes	<i>Bacillus sp. FJAT-22412</i>	99,06%
SRL680	Firmicutes	<i>Paenibacillus lautus</i>	99,69%
SRL681	Firmicutes	<i>Lysinibacillus tabacifolii</i>	98,75%

SRL682	Firmicutes	<i>Paenibacillus lautus</i>	100%
SRL685	Actinomycetota	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	100%
SRL687	Firmicutes	<i>Bacillus sp. strain Z100</i>	100%
SRL695	Firmicutes	<i>Paenibacillus lautus</i>	100%
SRL696	Firmicutes	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100%
SRL697	Firmicutes	<i>Peribacillus frigoritolerans</i>	100%
SRL709	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas putida</i>	100%
SRL710	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. strain isolate BIO CEPA 22</i>	100%
SRL714	Firmicutes	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99.66%
SRL715	Firmicutes	<i>Bacillus proteolyticus</i>	99.62%
SRL716	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas helmanticensis</i>	99.18%
SRL717	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas helmanticensis</i>	99.18%
SRL718	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	100%
SRL720	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas baetica strain S42_BP2TU</i>	100%
SRL722	Firmicutes	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99.76%
SRL723	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. strain QL-D13</i>	100%
SRL724	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. strain 998</i>	99.78%
SRL737	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas baetica</i>	99.84%
SRL738	Firmicutes	<i>Peribacillus simplex</i>	100%
SRL739	Firmicutes	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99,6%
SRL744	Firmicutes	<i>Bacillus mycoides</i>	99.77%
SRL747	Firmicutes	<i>Bacillus mycoides</i>	99.77%
SRL748	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.78%
SRL751	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas lactis</i>	100%
SRL752	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas lactis</i>	100%
SRL763	Firmicutes	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.49%
SRL781	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas baetica</i>	99.89%
SRL786	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. ADAK20</i>	99.89%
SRL798	Firmicutes	<i>Paenibacillus profundus</i>	99.88%

SRL803	Firmicutes	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.65%
SRL805	Firmicutes	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99.54%
SRL831	Pseudomonadota	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	100%
SRL833	Pseudomonadota	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	100%
SRL855	Firmicutes	<i>Bacillus mycoides</i>	100%
SRL856	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas lactis</i>	100%
SRL869		<i>Uncultured bacterium clone OTU_133</i>	100%
SRL870	Pseudomonadota	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	100%
SRL875	Firmicutes	<i>Peribacillus simplex</i>	100%
SRL876	Pseudomonadota	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	100%
SRL878	Pseudomonadota	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	100%
SRL898	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas gessardii</i>	99.18%
SRL902	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. ADAK20 chromosome</i>	99.88%
SRL903	Firmicutes	<i>Bacillus subtilis</i>	100%
SRL905	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. ADAK20 chromosome</i>	99.88%
SRL906	Actinomycetota	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	100%
SRL907	Pseudomonadota	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	100%
SRL922	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. ADAK20 chromosome</i>	99.81%
SRL923	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas putida</i>	99.86%
SRL941	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas putida</i>	100%
SRL944	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. strain XJC-5</i>	99.60%
SRL948	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas lactis</i>	100%
SRL950	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas baetica</i>	99.76%
SRL954	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas baetica</i>	100%
SRL957	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. ADAK20 chromosome</i>	100%
SRL958	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas putida</i>	100%
SRL959	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. P8_229 chromosome</i>	100%
SRL992	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. strain SeaQual_P_B537</i>	100%
SRL994	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. strain UK35F5</i>	99.85%

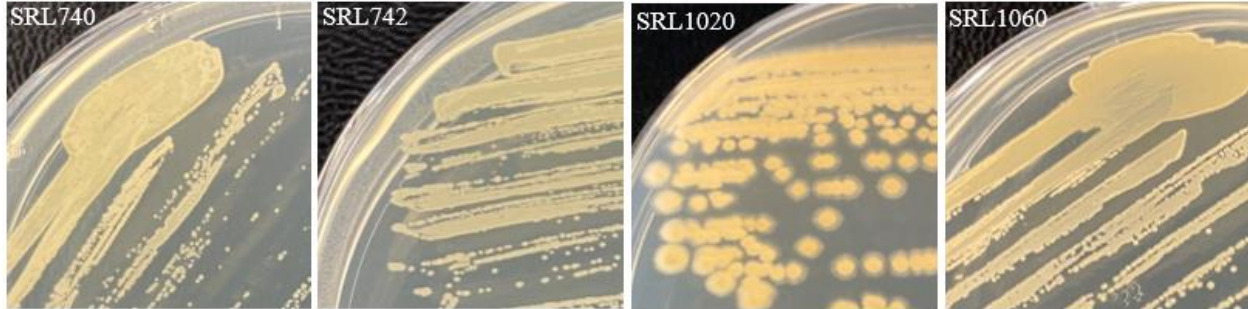
SRL995	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas</i> sp. ADAK20 chromosome	99.28%
SRL1013	Pseudomonadota	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	100%
SRL1017	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas lactis</i>	100%
SRL1028	Firmicutes	<i>Paenibacillus profundus</i>	99.88%
SRL1030	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas</i> sp. ADAK20 chromosome	100%
SRL1062	Firmicutes	<i>Paenibacillus lautus</i>	99.66%
SRL1064	Firmicutes	<i>Paenibacillus lautus</i>	99.67%
SRL1069	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas cedrina</i> strain T0a85	99.74%
SRL1071	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas</i> sp. strain PAMC_273	99.88%
SRL1072	Bacteroidota	<i>Pedobacter panaciterrae</i>	99.44%
SRL1075	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas</i> sp. ADAK20 chromosome	99.74%
SRL1077	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas brenneri</i>	100%
SRL1079	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas</i> sp. strain GBR506	99.75%
SRL1080	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas</i> sp. strain 992	100%
SRL1083	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas</i> sp. strain 992	100%
SRL1087	Pseudomonadota	<i>Acinetobacter albensis</i>	99.87%
SRL1088	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas poae</i>	99.89%
SRL1093	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas brenneri</i>	99.74%
SRL1095	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas</i> sp. strain Esraa 5	100%
SRL1098	Pseudomonadota	<i>Janthinobacterium lividum</i>	99.67%
SRL1099	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas</i> sp. strain PAMC 27361	99.77%
SRL1107	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas</i> sp. ADAK20 chromosome	99.33%
SRL1131	Actinomycetota	<i>Arthrobacter</i> sp. strain P-32-1	100%
SRL1132	Firmicutes	<i>Sporosarcina</i> sp. FSL K6-1540 chromosome	100%
SRL1133	Firmicutes	<i>Sporosarcina</i> sp. strain isolate 33	100%
SRL1134		Uncultured bacterium clone NT-4-50	99.66%
SRL1135	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas</i> sp. strain PAMC 27361	99.74%
SRL1136	Bacteroidota	<i>Sphingobacterium kitahiroshimense</i>	99.65%
SRL1137	Firmicutes	<i>Sporosarcina</i> sp. strain Z13-46	100%

SRL1139	Pseudomonadota	<i>Brevundimonas bullata</i>	100%
SRL1141	Pseudomonadota	<i>Serratia liquefaciens</i>	98.90%
SRL1146	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. ADAK20 chromosome</i>	100%
SRL1147	Pseudomonadota	<i>Acinetobacter albensis</i>	99.88%
SRL1152	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. ADAK20 chromosome</i>	100%
SRL1155	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. ADAK20 chromosome</i>	100%
SRL1157	Pseudomonadota	<i>Brevundimonas bullata</i>	100%
SRL1158	Actinomycetota	<i>Paeniglutamicibacter antarcticus</i>	100%
SRL1159	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. ADAK20 chromosome</i>	99.63%
SRL1160	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. ADAK20 chromosome</i>	99.88%
SRL1162	Pseudomonadota	<i>Acinetobacter sp. KB75 chromosome</i>	100%
SRL1163	Pseudomonadota	<i>Acinetobacter albensis</i>	99.70%
SRL1165	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas lactis</i>	99.88%
SRL1166	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. ADAK20 chromosome</i>	100%
SRL1167	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. ADAK20 chromosome</i>	100%
SRL1169	Firmicutes	<i>Sporosarcina sp. E3R19_pA</i>	98.73%
SRL1170	Firmicutes	<i>Sporosarcina sp. E3R19_pA</i>	100%
SRL1230	Bacteroidota	<i>Flavobacterium frigidimaris</i>	97.89%
SRL1236	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas lini</i>	100%
SRL1253	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. ADAK20 chromosome</i>	98.98%
SRL1260	Pseudomonadota	<i>Janthinobacterium lividum</i>	99.80%
SRL1263	Pseudomonadota	<i>Janthinobacterium lividum strain EIF2</i>	99.68%
SRL1264	Pseudomonadota	<i>Janthinobacterium lividum strain EIF1</i>	99.91%
SRL1294	Bacteroidota	<i>Flavobacterium sp. PL02</i>	99.31%
SRL1331	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas putida</i>	99.86%
SRL1337	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas lactis</i>	99.62%
SRL1338	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. ADAK20 chromosome</i>	100%
SRL1339	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas baetica</i>	99.87%
SRL1340	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas baetica</i>	99.88%

SRL1381	Firmicutes	<i>Paenibacillus apiarius</i>	99.33%
SRL1383	Pseudomonadota	<i>Stutzerimonas xanthomarina</i>	99.37%
SRL1399	Bacteroidota	<i>Flavobacterium frigidimaris</i>	99.48%
SRL1401	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. strain 2183</i>	99.79%
SRL1412	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas lini</i>	100%
SRL1416		<i>Uncultured bacterium clone FOOS7B_33</i>	98.76%
SRL1421	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. ADAK20 chromosome</i>	100%
SRL1432	Bacteroidota	<i>Flavobacterium frigidimaris</i>	99.76%
SRL1433	Pseudomonadota	<i>Janthinobacterium lividum</i>	99.55%
SRL1434	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. strain 2183</i>	100%
SRL1437	Pseudomonadota	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	100%
SRL1438	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas lactis</i>	99.69%
SRL1440	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas lactis</i>	100%
SRL1442	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas putida</i>	100%
SRL1443	Firmicutes	<i>Bacillus mycoides</i>	99.59%
SRL1452		<i>Uncultured soil bacterium clone L1A.14B04</i>	98.68%
SRL1454	Pseudomonadota	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	99.32%
SRL1456	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. ADAK20 chromosome</i>	100%
SRL1457	Pseudomonadota	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	100%
SRL1458	Firmicutes	<i>Bacillus cereus</i>	99.82%
SRL1484	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. S1Bt23</i>	100%
SRL1485	Pseudomonadota	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	100%
SRL1486	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas sp. strain WY12</i>	100%
SRL1487	Pseudomonadota	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	100%
SRL1488	Firmicutes	<i>Bacillus cereus</i>	99.83%
SRL1491	Actinomycetota	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	100%
SRL1492	Pseudomonadota	<i>Pseudomonas congelans</i>	100%

3.3 Αποτελέσματα Αλληλούχισης Ολικού Γονιδιωματικού DNA

Οι μικροοργανισμοί καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία με κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα και επώαστηκαν σε κατάλληλη θερμοκρασία έως ότου να παρατηρηθούν μοναδιαίες αποικίες. Οι φαινότυποι των στελεχών που στάλθηκαν για αλληλούχιση ολικού γονιδιωματικού DNA φαίνονται στην Εικόνα 3.3.1.



Εικόνα 3.3.1. Φαινότυποι στελεχών SRL 740, SRL742, SRL1020, SRL1060.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης μεγάλων αναγνώσεων, δηλαδή ο αριθμός των αναγνώσεων, ο συνολικός αριθμός βάσεων που αναγνώστηκαν, το ελάχιστο, μέγιστο και μέσο μήκος ανάγνωσης, και το ελάχιστο μήκος των contigs που συγκεντρωτικά καλύπτουν το 50% και το 90% του γονιδιώματος (Reads N50 και Reads N90 αντίστοιχα), φαίνονται στον Πίνακα 3.3.1. Τα αποτελέσματα αλληλούχισης μικρών αναγνώσεων, δηλαδή ο αριθμός των αναγνώσεων, ο συνολικός αριθμός βάσεων που αναγνώστηκαν, το ποσοστό των βάσεων με σκορ ποιότητας από 20% και άνω, και από 30% και άνω (Q20 και Q30 αντίστοιχα), και το ποσοστό περιεκτικότητας GC φαίνονται στον Πίνακα 3.3.2. Στον Πίνακα 3.3.2 φαίνεται επίσης το μήκος ανάγνωσης, PE150 (Paired-end 150), που σημαίνει ότι από κάθε άκρο του θραύσματος της αλληλουχίας έχουν διαβαστεί 150 βάσεις, προς την αντίθετη κατεύθυνση.

Πίνακας 3.3.1: Αποτελέσματα αλληλούχισης μεγάλων αναγνώσεων.

Sample Name (#)	Reads Number (#)	Reads Total Bases (bp)	Reads Mean Length (bp)	Reads N50 (bp)	Reads N90 (bp)	Reads Max Length (bp)	Reads Min Length (bp)
1020	133,850	1,562,498,109	11,673	17,274	5,460	183,261	2,000
1060	137,974	1,646,936,052	11,936	19,949	5,071	141,347	2,000
740	110,829	1,288,235,444	11,623	17,443	5,335	154,646	2,000
742	127,889	1,427,704,052	11,163	17,675	4,853	162,930	2,000

Πίνακας 3.3.2: Αποτελέσματα αλληλούχισης μικρών αναγνώσεων.

Sample Name	Clean Reads	Clean Base	Read Length	Q20(%)	Q30(%)	GC(%)
740	4,052,418	1,215,725,400	PE150	97.38	91.74	71.10
742	4,086,354	1,225,906,200	PE150	97.14	90.90	71.06
1020	4,056,904	1,217,071,200	PE150	97.05	91.01	72.59
1060	4,051,316	1,215,394,800	PE150	97.45	91.90	71.01

Η συναρμολόγηση των μεγάλων αναγνώσεων πραγματοποιήθηκε μέσω raven 1.8.1 (Vaser & Šikić, 2021), ενός συναρμολογητή που δίνει γρήγορα και έγκυρα αποτελέσματα, και μέσω του οποίου επιτεύχθηκε η συναρμολόγηση των γονιδιωμάτων σε ελάχιστο αριθμό contigs. Για τη συναρμολόγηση των μικρών αναγνώσεων, χρησιμοποιήθηκε ο συναρμολογητής Unicycler v0.5.0 (Wick et al., 2017), ο οποίος ενισχύει τη συναρμολόγηση μέσω SPAdes (Bankevich et al., 2012) με κάποιες περαιτέρω λειτουργίες, και αποτελεί κατάλληλο εργαλείο για βακτηριακά γονιδιώματα. Η αλληλούχιση των μικρών αναγνώσεων πραγματοποιήθηκε με σκοπό την μέγιστη αξιοπιστία λόγω του βάθους αλληλούχισης του γονιδιώματος, και όχι την πλήρη κάλυψή του, οπότε τα κενά κατά τη συναρμολόγηση και ο μεγάλος αριθμός των contigs ήταν αναμενόμενος. Για την υβριδική συναρμολόγηση μέσω Unicycler v0.5.0, πραγματοποιείται αρχικά η συναρμολόγηση των μικρών αναγνώσεων, και στη συνέχεια ολοκληρώνεται με τη συμπλήρωση των μεγάλων αναγνώσεων. Σύμφωνα με τις συναρμολογήσεις των γονιδιωμάτων, φαίνεται ότι το μέγεθος των γονιδιωμάτων των στελεχών SRL740 και SRL742 είναι περίπου 8Mb, του στελέχους SRL1020 είναι περίπου 7,5Mb, και του στελέχους SRL1060 είναι περίπου 9Mb. Τα αποτελέσματα της συναρμολόγησης των γονιδιωμάτων φαίνονται στον Πίνακα 3.3.3.

Πίνακας 3.3.3. Αποτελέσματα συναρμολόγησης γονιδιωμάτων.

Συναρμολογητής		Στελέχη			
		SRL740	SRL742	SRL1020	SRL1060
Raven	length	7.938.217	7.940.134	7.551.420, 32.625	8.348.793, 261.833, 349.369
	contigs	1	1	2	3
Unicycler	max. length	1.023.492	1.018.891	1.178.281	817.479
	contigs	98	85	99	115
Unicycler (Hybrid Assembly)	length	3.798.516, 2.555.223, 972.192, 201.322, 145.009, 118.500, 104.191, 19.766, 657, 598, 318, 178, 174, 130	7.916.459	7.550.638	4.362.888, 3.735.016, 302.632, 249.649, 242.800, 2.154, 897, 175, 143
	contigs	14	1	1	9

Για τις περαιτέρω αναλύσεις των γονιδιωμάτων, χρησιμοποιήθηκε το προϊόν της υβριδικής συναρμολόγησης των μικρών και μεγάλων αναγνώσεων, το οποίο και αναμένεται να είναι το πιο ακριβές.

Τα αποτελέσματα της ταξινομικής ταυτοποίησης βάσει της σύγκρισης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (ANI) με τις ήδη γνωστές και καταχωρημένες στη βάση δεδομένων GenomesDB του JSpeciesWS (Richter et al., 2016), φαίνονται στον Πίνακα 3.3.4. Επίσης, τα ποσοστά περιεκτικότητας σε GC του χρωμοσώματος, φαίνονται στον Πίνακα 3.3.5.

Πίνακας 3.3.4: Αποτελέσματα σύγκρισης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

Στέλεχος	Είδος	Ομολογία
SRL740	<i>Streptomyces microflavus</i>	97,9%
SRL742	<i>Streptomyces microflavus</i>	97,94%
SRL1020	<i>Nocardiopsis sp.</i>	<94%
SRL1060	<i>Streptomyces microflavus</i>	97,32%

Πίνακας 3.3.5: Ποσοστό περιεκτικότητας GC χρωμοσώματος.

Στέλεχος	Περιεκτικότητα σε GC (%)
SRL740	71.4%
SRL742	71.4%
SRL1020	72.9%
SRL1060	71.2%

Τα στελέχη SRL740, SRL742 και SRL1060 παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό ομοιότητας με το είδος *Streptomyces microflavus*. Το στέλεχος SRL1020, παρά τη φαινοτυπική του ομοιότητα με τους στρεπτομυκήτες, και ενώ αρχικά συσχετίστηκε με το είδος *Streptomonospora nanhaiensis*, βάσει περαιτέρω αναλύσεων φαίνεται να ανήκει στο γένος *Nocardiosis*, του φύλου των Actinomycetota. Το μικρό ποσοστό ομοιότητάς του με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία των συγγενικότερων του ειδών, δεν επέτρεψε τον χαρακτηρισμό του SRL1020 σε επίπεδο είδους. Το γένος *Nocardiosis* αποτελείται επίσης από αερόβια, θετικά κατά Gram βακτήρια, με ικανότητα παραγωγής πλήθους βιοδραστικών ενώσεων, μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η επιβίωσή τους στα ακραία περιβάλλοντα που αποικίζουν (Shi et al., 2022).

Οι χάρτες των γονιδιωμάτων των στελεχών δημιουργήθηκαν με το Proksee, και φαίνονται στις Εικόνες 3.3.4-3.3.7. Το Proksee δίνει τη δυνατότητα στο χρήστη να επεξεργαστεί το χάρτη του γονιδιώματος με πληθώρα εργαλείων. Στην προκειμένη, επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί το annotation με τα εργαλεία Bakta και Prokka, καθώς επίσης χρησιμοποιήθηκε και το εργαλείο CARD, το οποίο ταυτοποιεί γονίδια αντίστασης σε αντιβιοτικά. Το annotation παρείχε πληροφορίες σχετικά με το πλήθος των κωδικών περιοχών του γονιδιώματος (CDS), οι οποίες διαχωρίζονται περαιτέρω σε υποθετικές πρωτεΐνες, μη ταυτοποιημένες πρωτεΐνες, και ταυτοποιημένες πρωτεΐνες. Τα αποτελέσματα του annotation φαίνονται στον Πίνακα 3.3.6. Στους χάρτες των γονιδιωμάτων απεικονίζεται μέρος των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών, καθώς και οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν μέσω του CARD. Επιλέχθηκε επίσης η οπτικοποίηση της σύστασης των γονιδιωμάτων σε γουανίνη και κυτοσίνη, λόγω των αξιοσημείων, υψηλών ποσοστών περιεκτικότητάς τους στα γονιδιώματα των στρεπτομυκήτων.

Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν κάποια πολύ χαρακτηριστικά γονίδια των στρεπτομυκήτων. Η γεωσμίνη είναι ένας πτητικός μικροβιακός μεταβολίτης που παράγεται από το μεγαλύτερο ποσοστό των στρεπτομυκήτων, και αποτελεί παράγωγο του διφωσφορικού ή πυροφωσφορικού φαρνεσυλίου (Jiang et al., 2007). Το γονίδιο που κωδικοποιεί τη συνθάση του (2E, 6E)-διφωσφορικού φαρνεσυλίου, και συμμετέχει στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της γεωσμίνης (Cavalcanti et al., 2017), ταυτοποιήθηκε στα γονιδιώματα των στελεχών SRL740, SRL742, και SRL1060. Επίσης, η ακτινοροδίνη, είναι ένας δευτερογενής μεταβολίτης με χαρακτηριστική μπλε χρωστική και ισχυρή βακτηριοστατική δράση ως απόκριση σε διαφορετικά είδη στρες, ο οποίος απομονώθηκε αρχικά από το στέλεχος *Streptomyces coelicolor* (Mak and Nodwell, 2017). Στο

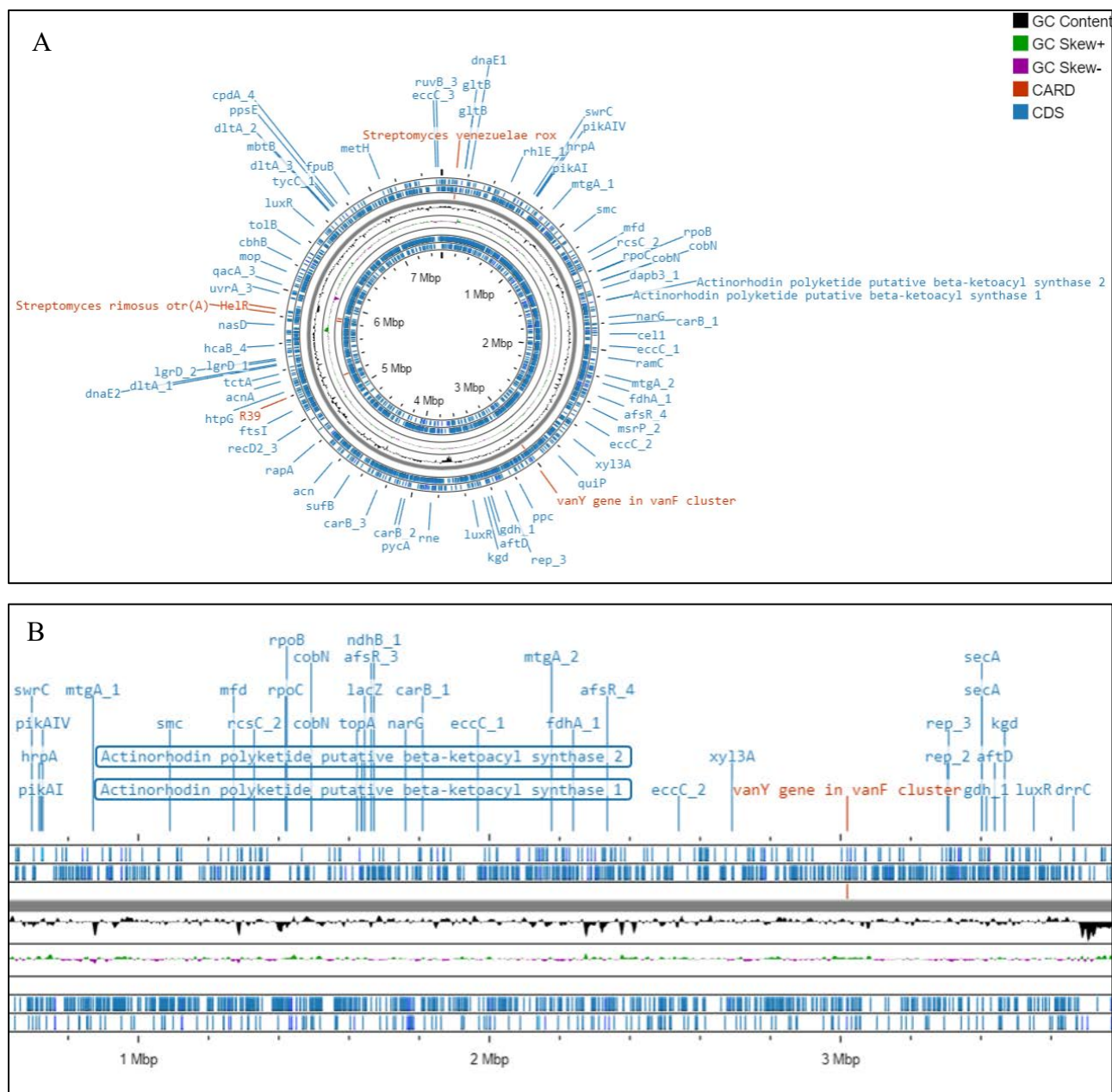
γονιδίωμα των στελεχών SRL 740, SRL742, SRL1020, SRL1060, ταυτοποιήθηκε το γονίδιο για την υποθετική πολυκετιδική β-κετοακυλική συνθάση 1 και 2 της ακτινοροδίνης, υποδεικνύοντας την ενδεχόμενη δυνατότητά τους να παράγουν την βιοδραστική αυτή ένωση. Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν δύο πολυπεπίδια, μεγέθους 55.5kDa και 49.5kDa, η μεταγραφή των οποίων επάγεται κατά τη σπορίωση του *Streptomyces griseus*, στο γονιδίωμα του οποίου βρέθηκαν αρχικά (Babcock and Kendrick, 1990). Τα δύο πολυπεπίδια αυτά φαίνεται να έχουν το ίδιο σημείο εκκίνησης της μεταγραφής, ωστόσο το πολυπεπίδιο μεγέθους 49.5kDa δεν έχει το αμινοτελικό άκρο του πολυπεπτιδίου μεγέθους 55.5kDa, ενώ επίσης παράγεται σε μικρότερες ποσότητες από ότι το μεγαλύτερο πολυπεπίδιο. Οι πρωτεΐνες σπορίωσης αυτές ταυτοποιήθηκαν στα γονιδιώματα των στελεχών SRL740, SRL742, και SRL1060.

Και στα τέσσερα στελέχη ταυτοποιήθηκαν μέσω του CARD τα ίδια τρία γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Οι μονοξυγενάσες της ριφαμυκίνης (Rox) έχουν ταυτοποιηθεί σε πλήθος μικροοργανισμών και είναι υπεύθυνες για την αδρανοποίηση του αντιβιοτικού ριφαμυκίνης μέσω διάσπασης του δακτυλίου της και κατά συνέπεια απενεργοποίησης της απαραίτητης δομής για προσβολή του μοριακού της στόχου, που είναι η RNA πολυμεράση (Koteva et al., 2018). Στα γονιδιώματα που μελετήθηκαν, ταυτοποιήθηκε το γονίδιο για μια μονοξυγενάση φλαβοπρωτεϊνών κατηγορίας A από το *Streptomyces venezuelae*, η οποία έχει βρεθεί ότι απενεργοποιεί ένα ευρύ φάσμα αντιβιοτικών ριφαμυκίνης (Koteva et al., 2018). Το γονίδιο για άλλη μια πρωτεΐνη του *Streptomyces venezuelae*, την όμοια με ελικάση πρωτεΐνη HeIR, ταυτοποιήθηκε σε όλα τα στελέχη. Η HeIR προσδίδει επίσης ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά ριφαμυκίνης, μέσω συμπλοκοποίησης της RNA πολυμεράσης και προστασίας της μέσω εκτοπισμού της ριφαμυκίνης (Surette et al., 2022). Ένα ακόμη γονίδιο ανθεκτικότητας, το γονίδιο αντίστασης στην οξυτετρακυκλίνη (OTC), otrA, του στελέχους *Streptomyces rimosus*, ταυτοποιήθηκε σε όλα τα στελέχη. Το otrA, μέσω μιας μη ομοιοπολικής ριβοσωμικής τροποποίησης, εμποδίζει την οξυτετρακυκλίνη από το να προσβάλλει τον μοριακό της στόχο, που είναι το ριβόσωμα (Petković et al., 2006).

Στο στέλεχος SRL1020, ταυτοποιήθηκαν δύο ακόμη γονίδια ανθεκτικότητας. Το γονίδιο vanY της οικογένειας γονιδίων vanF είναι ένα γονίδιο αντίστασης στο γλυκοπεπτίδιο βανκομυκίνη (Fraimow et al., 2005). Το γονίδιο R39 κωδικοποιεί μία β-λακταμάση τάξης A του γένους *Actinomadura*, που βρίσκεται στην ίδια τάξη με το γένος *Nocardiosis* (Houba et al., 1989).

Πίνακας 3.3.6. Αποτελέσματα Annotation Γονιδιώματος.

Στέλεχος	Hypothetical proteins	CDS (null)	Identified proteins	CARD Identified
SRL740	3.625	6.054	4.194	3
SRL742	7.242	6.023	7.799	3
SRL1020	3.538	5.840	3.806	5
SRL1060	4.493	7.002	4.414	3



Εικόνα 3.3.6. Χάρτης Γονιδιώματος SRL1020 (Α). Μεγέθυνση της περιοχής του γονιδιώματος όπου συναντώνται τα γονίδια που κωδικοποιούν την υποθετική πολυκετιδική β-κετοακυλική συνθάση 1 και 2 της ακτινοροδίνης, και του γονιδίου ανθεκτικότητας vanY στο vanF cluster (Β).

Κατά την εξόρυξη των γονιδιωμάτων με το εργαλείο antiSMASH 7.0 (Blin et al., 2023), αποκαλύφθηκε η ύπαρξη νησίδων βιοσυνθετικών γονιδίων, γνωστών για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, όπως τερπένια, μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθετάσες (NRPS), πολυκετιδικές συνθάσες τύπου I και II (PKSs) και ριβοσωμικά συντιθέμενα και μετα-μεταφραστικά τροποποιημένα πεπτίδια (RiPP), όπως λανθιπεπτίδια, θειοπεπτίδια και λασσοπεπτίδια. με διακυμάνσεις ομοιότητας με τις ήδη γνωστές και ταυτοποιημένες νησίδες γονιδίων σε άλλα στελέχη. Ταυτοποιήθηκαν και κάποια γονίδια, ωστόσο, τα οποία βρίσκονταν ενσωματωμένα σε νησίδες γονιδίων που δεν παρουσίαζαν ομοιότητα με τις ήδη ταυτοποιημένες στη βάση δεδομένων. Το πλήθος των νησίδων βιοσυνθετικών γονιδίων που βρέθηκε σε κάθε στέλεχος, φαίνεται στους Πίνακες 3.3.7-3.3.10.

Πίνακας 3.3.7: Αποτελέσματα antiSMASH για το στέλεχος SRL740.

Region	Type	Most similar known cluster		Similarity
Region 1.1	betalactone	divergolide A/divergolide B/ divergolide C/divergolide D	Polyketide: Modular type I polyketide	6%
Region 1.2	NRPS	phosphonoglycans	Saccharide	3%
Region 1.3	LAP, thiopeptide			
Region 1.4	NRPS-like	bottromycin A2	RiPP: Bottromycin	42%
Region 1.5	NI- siderophore	desferrioxamin B	Other	100%
Region 1.6	lanthipeptide- class-iii, lanthipeptide- class-ii			
Region 1.7	NRPS, PKS- like	streptozotocin	Other	19%
Region 1.8	ectoine	ectoine	Other	100%
Region 1.9	terpene	steffimycin D	Polyketide: Type II polyketide + Saccharide: Hybrid/ tailoring saccharide	19%
Region 1.10	T3PKS	naringenin	Polyketide: Type III polyketide	100%
Region 1.11	T1PKS, NRPS, NRP- metallophore	griseobactin	NRP	100%
Region 1.12	transAT-PKS, NRPS, T1PKS, PKS- like	alpiniamide	Polyketide + NRP + Other: Aminocoumarin	100%

Region 1.13	terpene	geosmin	Terpene	100%
Region 1.14	butyrolactone	coelimycin P1	Polyketide: Modular type I polyketide	16%
Region 1.15	ectoine			
Region 2.1	T2PKS	prejadomycin/ rabelomycin/ gaudimycin C/ gaudimycin D/ UWM6/ gaudimycin A	Polyketide: Type II polyketide + Saccharide: Hybrid/ tailoring saccharide	27%
Region 2.2	lassopeptide	keywimysin	RiPP	100%
Region 2.3	T1PKS	argimycin PI/ argimycin PII/ nigrifactin/ argimycin PIV/ argimycin PV/argimycin PVI/argimycin PIX	Polyketide: Modular type I polyketide	27%
Region 2.4	lanthipeptide-class-iii	AmfS	RiPP:Lanthipeptide	100%
Region 2.5	terpene	aurachin C/aurachin D/aurachin SS	Polyketide+Terpene	20%
Region 2.6	NI-siderophore	kinamycin	Polyketide	16%
Region 2.7	hydrogen-cyanide, lanthipeptide-class-i	aborycin	RiPP	21%
Region 2.8	NRPS-like	minimycin	NRP + Saccharide	60%
Region 2.9	RiPP-like			
Region 3.1	NRPS, T1PKS, thiopeptide, LAP	lactazole	RiPP: Thiopeptide	33%
Region 3.2	terpene	isorenieratene	Terpene	100%
Region 3.3	T3PKS	alkylresorcinol	Polyketide	100%
Region 3.4	melanin	melanin	Other	100%
Region 3.5	RiPP-like, NRPS-like	streptamidine	RiPP: Other	91%
Region 3.6	RiPP-like	tetronasin	Polyketide	3%
Region 3.7	T1PKS,NRPS	10-epi-HSAF/10-epi-3-deOH-HSAF/10-epi-maltophilin/10-epi-xanthobaccin C/10-epi-hydroxymaltophilin/10-epi-FI-2	Other + Polyketide	100%
Region 3.8	terpene	hopene	Terpene	69%

Region 4.1	NRPS-like, NRPS	salinomycin	Polyketide:Modular type I polyketide	14%
Region 5.1	prodigiosin	tambjamine BE-18591	Alkaloid+Polyketide	67%
Region 7.1	arylpolyene, NRPS-like	formicamycins A-M	Polyketide	11%
No secondary metabolite regions were found in Regions 6 and 8				

Πίνακας 3.3.8: Αποτελέσματα antiSMASH για το στέλεχος SRL742.

Region	Type	Most similar known cluster		Similarity
Region 1	T1PKS, NRPS, thiopeptide, LAP	lactazole	RiPP: Thiopeptide	33%
Region 2	terpene	isorenieratene	Terpene	100%
Region 3	T3PKS	alkylresorcinol	Polyketide	100%
Region 4	melanin	melanin	Other	100%
Region 5	RiPP-like, NRPS-like	streptamidine	RiPP: Other	91%
Region 6	RiPP-like	tetronasin	Polyketide	3%
Region 7	NRPS, T1PKS	10-epi-HSAF/ 10-epi-3-deOH-HSAF/ 10-epi-maltophilin/ 10-epi-xanthobaccin C/ 10-epi-hydroxymaltophilin/ 10-epi-FI-2	Other + Polyketide	100%
Region 8	terpene	hopene	Terpene	69%
Region 9	arylpolyene, NRPS-like	formicamycins A-M	Polyketide	11%
Region 10	NRPS, NRPS-like	salinomycin	Polyketide: Modular type I polyketide	14%
Region 11	RiPP-like			
Region 12	NRPS-like	minimycin	NRP + Saccharide	60%
Region 13	lanthipeptide-class-i, hydrogen-cyanide	aborycin	RiPP	21%
Region 14	NI-siderophore	kinamycin	Polyketide	16%
Region 15	terpene	aurachin C/ aurachin D/ aurachin SS	Polyketide +Terpene	20%
Region 16	lanthipeptide-class-iii	AmfS	RiPP: Lanthipeptide	100%
Region 17	T1PKS	camporidine A/ camporidine B	Alkaloid + Polyketide	45%
Region 18	lassopeptide	SRO15-2005	RiPP: Lassoepptide	100%

Region 19	T2PKS	prejadomycin/ rabelomycin/ gaudimycin C/ gaudimycin D/ UWM6/ gaudimycin A	Polyketide: Type II polyketide + Saccharide: Hybrid/ tailoring saccharide	27%
Region 20	prodigiosin	tambjamine BE-18591	Alkaloid + Polyketide	67%
Region 21	betalactone	divergolide A/ divergolide B/ divergolide C/ divergolide D	Polyketide: Modular type I polyketide	6%
Region 22	NRPS	phosphonoglycans	Saccharide	3%
Region 23	thiopeptide, LAP			
Region 24	NRPS-like	bottromycin A2	RiPP: Bottromycin	42%
Region 25	NI-siderophore	desferrioxamin B	Other	100%
Region 26	lanthipeptide- class-iii, lanthipeptide- class-ii			
Region 27	NRPS, PKS-like	streptozotocin	Other	19%
Region 28	ectoine	ectoine	Other	100%
Region 29	terpene	steffimycin D	Polyketide: Type II polyketide + Saccharide: Hybrid/ tailoring saccharide	19%
Region 30	T3PKS	naringenin	Polyketide: Type III polyketide	100%
Region 31	T1PKS, NRPS, NRP-metallophore	griseobactin	NRP	100%
Region 32	transAT-PKS, NRPS, T1PKS, PKS-like	alpiniamide	Polyketide + NRP + Other: Aminocoumarin	100%
Region 33	terpene	geosmin	Terpene	100%
Region 34	butyrolactone	coelimycin P1	Polyketide: Modular type I polyketide	16%
Region 35	ectoine			

Πίνακας 3.3.9: Αποτελέσματα antiSMASH για το στέλεχος SRL1020.

Region	Type	Most similar known cluster		Similarity
Region 1	terpene			
Region 2	T1PKS	aldgamycin J/ aldgamycin K/ aldgamycin P/ aldgamycin E	Polyketide	13%
Region 3	ectoine	ectoine	Other: Ectoine	75%

Region 4	T2PKS	formicamycins A-M	Polyketide	11%
Region 5	lanthipeptide-class-iv	duramycin	RiPP: Lanthipeptide	25%
Region 6	oligosaccharide, other, PKS-like, lanthipeptide-class-iii	cosmomycin C	Polyketide	19%
Region 7	lassopeptide	streptomomicin	RiPP: Lasso peptide	60%
Region 8	thioamide-NRP, HR-T2PKS, butyrolactone	colabomycin E	Polyketide: Type II polyketide	13%
Region 9	terpene	isorenieratene	Terpene	87%
Region 10	guanidinotides	mannopeptimycin	NRP	7%
Region 11	lassopeptide			
Region 12	butyrolactone	murayaquinone	Polyketide	3%
Region 13	NI-siderophore, betalactone	petrichorin A/ petrichorin B	NRP	11%
Region 14	butyrolactone			
Region 15	T3PKS			
Region 16	terpene	legonindolizidine A6	NRP + Alkaloid	12%
Region 17	RiPP-like			
Region 18	NRPS, lasso peptide	omnipeptin	NRP: Cyclic depsipeptide	17%
Region 19	T1PKS	uncialamycin	Polyketide	12%
Region 20	RiPP-like			
Region 21	NRP-metallophore, NRPS, T1PKS	coelibactin	NRP	72%
Region 22	phosphonate			
Region 23	NRPS-like	guanipiperazine A/ guanipiperazine B	NRP	80%

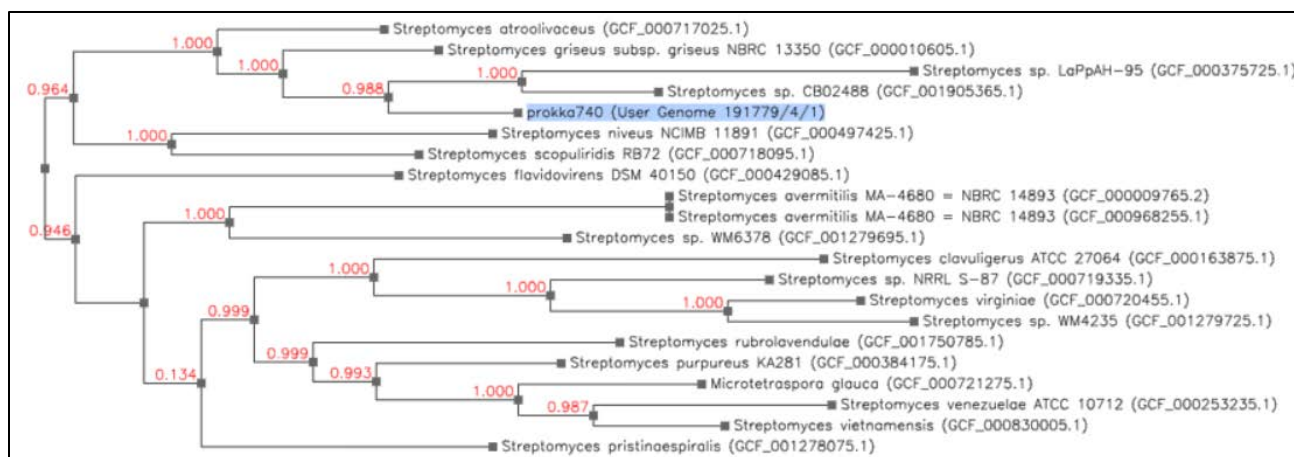
Πίνακας 3.3.10: Αποτελέσματα antiSMASH για το στέλεχος SRL1060.

Region	Type	Most similar known cluster		Similarity
Region 1.1	prodigiosin	tambjamine BE-18591	Alkaloid + Polyketide	67%
Region 1.2	lanthipeptide-class-i			
Region 1.3	T2PKS	prejadomycin/ rabelomycin/ gaudimycin C/ gaudimycin D/ UWM6/ gaudimycin A	Polyketide: Type II polyketide + Saccharide: Hybrid/ tailoring saccharide	27%
Region 1.4	lassopeptide	keywimysin	RiPP	100%

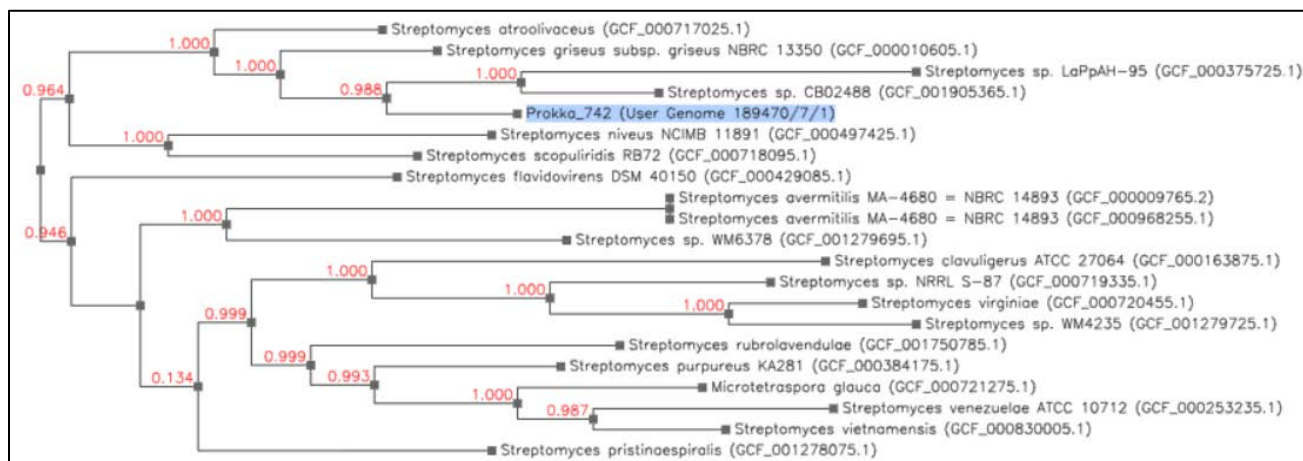
Region 1.5	T1PKS	streptazone E	Polyketide	83%
Region 1.6	lanthipeptide-class-iii	AmfS	RiPP: Lanthipeptide	100%
Region 1.7	terpene	aurachin C/ aurachin D/ aurachin SS	Polyketide + Terpene	20%
Region 1.8	NI-siderophore	kinamycin	Polyketide	16%
Region 1.9	hydrogen-cyanide	aborycin	RiPP	21%
Region 1.10	NRPS-like	minimycin	NRP + Saccharide	60%
Region 1.11	RiPP-like			
Region 1.12	NRPS-like, NRPS	salinomycin	Polyketide: Modular type I polyketide	14%
Region 1.13	NRPS-like, arylpolyene	formicamycins A-M	Polyketide	11%
Region 1.14	terpene	hopene	Terpene	69%
Region 1.15	NRPS, T1PKS	10-epi-HSAF/ 10-epi-3-deOH-HSAF/ 10-epi-maltophilin/ 10-epi-xanthobaccin C/ 10-epi-hydroxymaltophilin/ 10-epi-FI-2	Other + Polyketide	100%
Region 1.16	RiPP-like			
Region 1.17	NRPS-like, RiPP-like	streptamidine	RiPP: Other	91%
Region 1.18	melanin	melanin	Other	100%
Region 1.19	T3PKS	alkylresorcinol	Polyketide	100%
Region 1.20	terpene	isorenieratene	Terpene	100%
Region 1.21	T1PKS, NRPS, thiopeptide, LAP	lactazole	RiPP: Thiopeptide	33%
Region 1.22	terpene			
Region 2.1	NRPS	phthoxazolin	NRP + Polyketide	4%
Region 2.2	LAP, thiopeptide			
Region 2.3	NRPS-like	bottromycin A2	RiPP: Bottromycin	42%
Region 2.4	NI-siderophore	desferrioxamin B	Other	100%
Region 2.5	lanthipeptide-class-iii, lanthipeptide-class-ii			
Region 2.6	NRPS, PKS-like	streptozotocin	Other	19%
Region 2.7	ectoine	ectoine	Other	100%
Region 2.8	terpene	steffimycin D	Polyketide: Type II polyketide +	19%

			Saccharide: Hybrid/ tailoring saccharide	
Region 2.9	T3PKS	naringenin	Polyketide: Type III polyketide	100%
Region 2.10	T1PKS, NRPS, NRP-metallophore	griseobactin	NRP	100%
Region 2.11	transAT-PKS, NRPS, T1PKS, PKS-like	alpiniamide	Polyketide + NRP + Other: Aminocoumarin	100%
Region 2.12	terpene	geosmin	Terpene	100%
Region 2.13	butyrolactone	coelimycin P1	Polyketide: Modular type I polyketide	16%
Region 2.14	ectoine			
Region 3.1	terpene	cyslabdan	Terpene	72%
Region 4.1	CDPS			
Region 4.2	CDPS	A54145	NRP	5%
Region 5.1	betalactone	divergolide A/ divergolide B/ divergolide C/ divergolide D	Polyketide: Modular type I polyketide	6%
No secondary metabolite regions were found in Region 6				

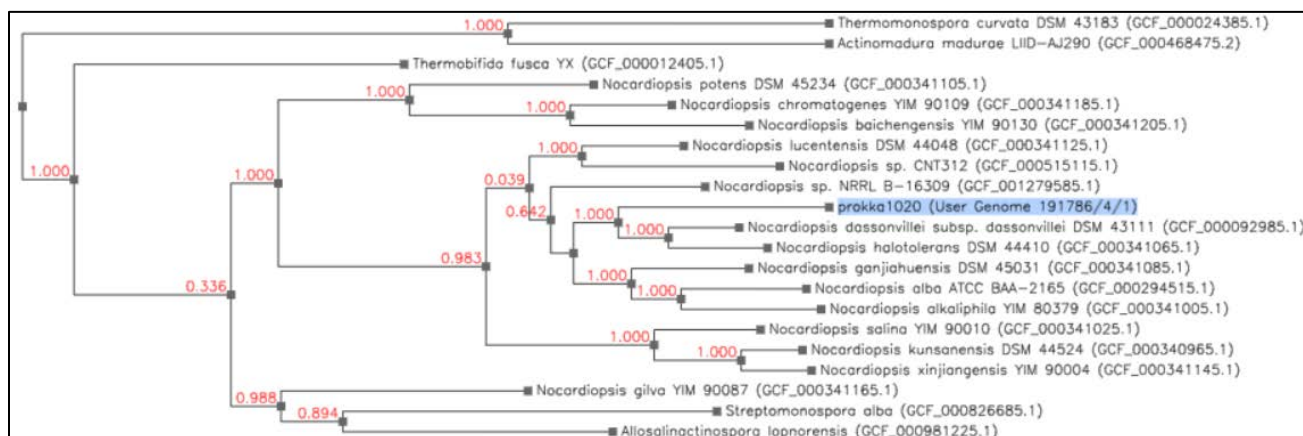
Μέσω της πλατφόρμας KBase (Arkin et al., 2018), κατασκευάστηκαν τα φυλογενετικά δέντρα των στελεχών κατόπιν του annotation. Τα στελέχη SRL740 και SRL742 φαίνεται να σχετίζονται με τα στελέχη *Streptomyces sp. CB02488* και *Streptomyces sp. LaPpAH-95* των γειτονικών τους τάξεων, ενώ το στέλεχος SRL1060 σχετίζεται με τα στελέχη *Streptomyces griseus NBRC 13350* και *Streptomyces atroolivaceus*. Το στέλεχος SRL1020 συγγενεύει με τα στελέχη *Nocardiosis dassonvillei DSM 43111* και *Nocardiosis halotolerans DSM 44410*. Τα φυλογενετικά δέντρα των στελεχών φαίνονται στις Εικόνες 3.3.8-3.3.11.



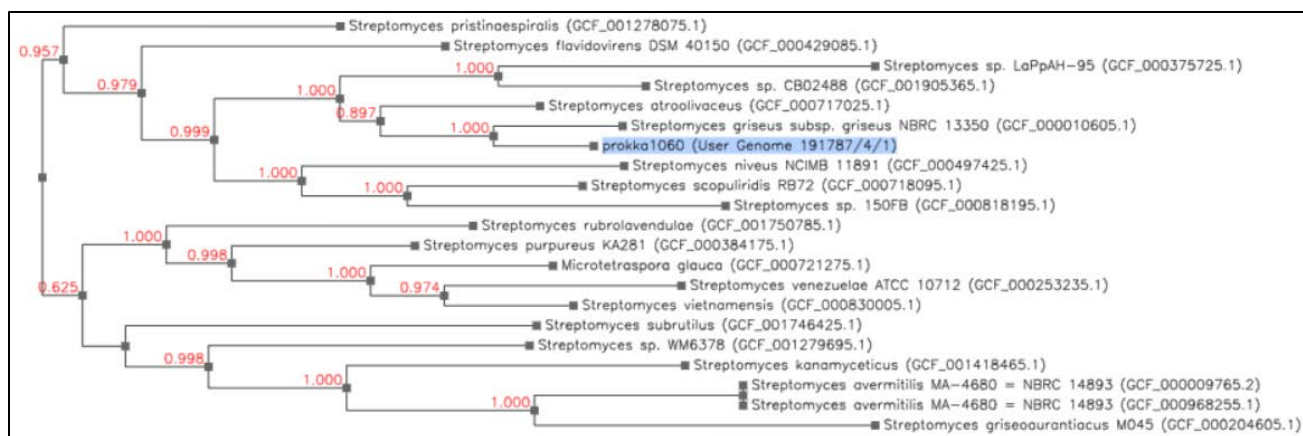
Εικόνα 3.3.8: Φυλογενετικό δέντρο στελέχους SRL740.



Εικόνα 3.3.9: Φυλογενετικό δέντρο στελέχους SRL742.



Εικόνα 3.3.10: Φυλογενετικό δέντρο στελέχους SRL1020.

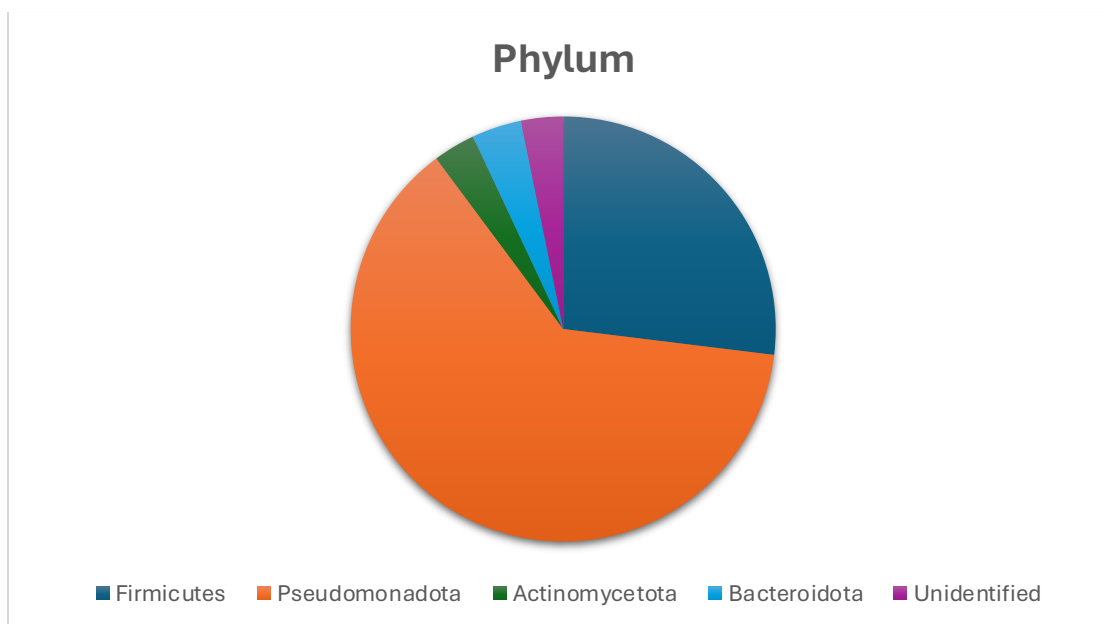


Εικόνα 3.3.11: Φυλογενετικό δέντρο στελέχους SRL1060.

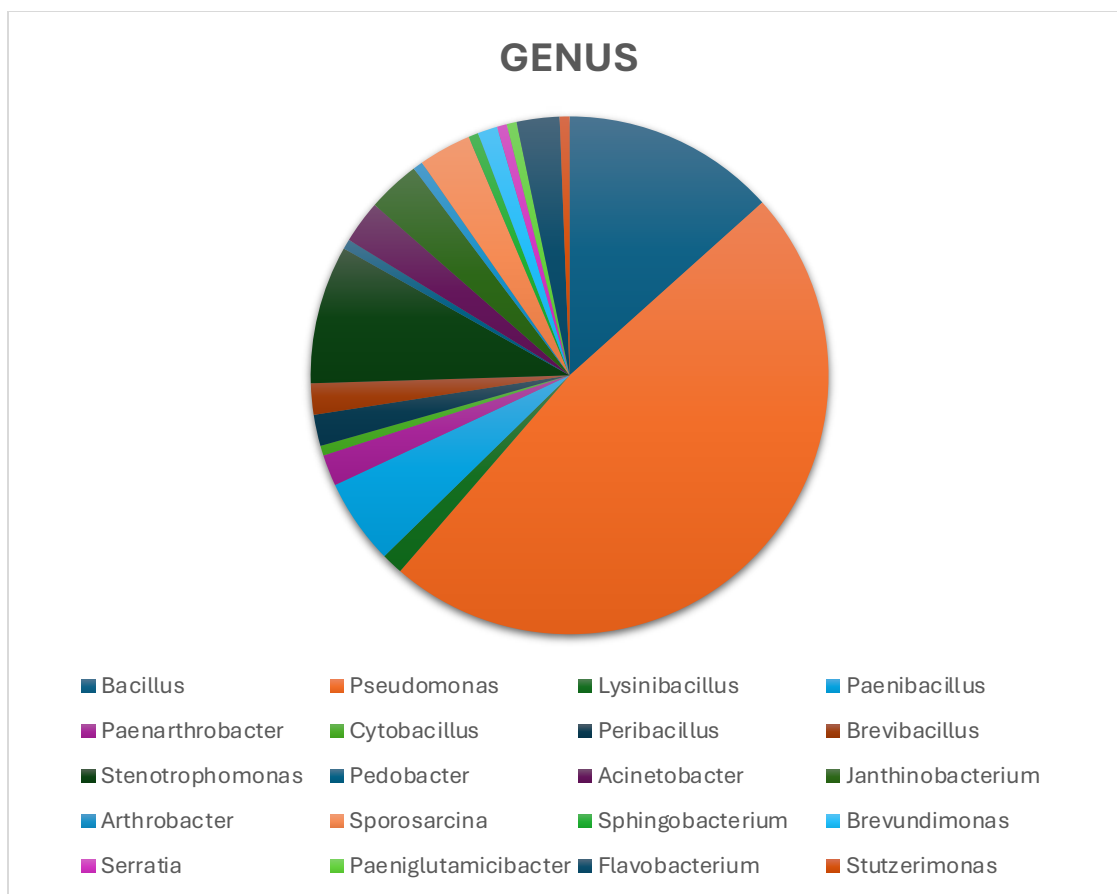
Κεφάλαιο 4: Συζήτηση και Συμπεράσματα

4.1 Μοριακή ταυτοποίηση μικροβιώματος

Τα μικροβιώματα σπηλαίων αποτελούνται από μικροοργανισμούς με αξιοσημείωτες ιδιότητες, κατά την εξελικτική τους προσαρμογή στις ακραίες συνθήκες του οικοσυστήματός τους. Οι διαφορές μεταξύ των μικροβιακών πληθυσμών δεν αφορούν μόνο το περιβάλλον του σπηλαίου συγκριτικά με το εξωτερικό περιβάλλον, αλλά είναι εξίσου αξιοσημείωτες οι διαφορές μεταξύ πληθυσμών διαφορετικών σπηλαίων, καθώς η ορυκτολογική ποικιλομορφία επιβάλλει διαφορετικές εξελικτικές πιέσεις. Μελέτες, ωστόσο, που έχουν διεξαχθεί σε διαφορετικά περιβάλλοντα σπηλαίων, αποικίζονται όλα κυρίως από Pseudomonadota και Actinobacteria, καθώς επίσης και από Firmicutes και Bacteroidetes σε μεγαλύτερες διακυμάνσεις ανά σπήλαιο (Zada et al., 2021, Samanta et al., 2023). Τα αντίστοιχα ευρήματα περιεκτικότητας σε φύλα και γένη του σπηλαίου μελέτης μας, φαίνονται στις εικόνες 4.1.1. και 4.1.2. Πρέπει να τονιστεί, ωστόσο, ότι δεν έχει ταυτοποιηθεί το σύνολο των μικροβιακών απομονώσεων του σπηλαίου του Γουργούθακα, αλλά ένα ποσοστό τυχαία επιλεγμένων στελεχών αυτού.



Εικόνα 4.1.1. Κατανομή φύλων μεταξύ των ταυτοποιημένων μικροοργανισμών.



Εικόνα 4.1.2. Κατανομή γενών μεταξύ των ταυτοποιημένων μικροοργανισμών.

4.2 Ανάλυση Αλληλουχίας Ολικού Γονιδιωματικού DNA

Το φύλο Actinobacteria, και ιδιαίτερα το γένος των στρεπτομυκήτων, είναι γνωστά για το πλήθος βιοσυνθετικών τους γονιδίων, στα οποία οφείλεται η αξιοσημείωτη παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών τους. Η αλληλούχηση και η ανάλυση του ολικού γονιδιωματικού υλικού τους, παρέχει την απαραίτητη πληροφορία για τη δυνατότητα των υπό μελέτη στελεχών να παράγουν φυσικά προϊόντα με προοπτικές αξιοποίησης σε φαρμακευτικούς, κτηνιατρικούς, γεωργικούς τομείς κλπ. (Rodríguez-Rojas et al., 2013, Li et al., 2023).

Τα αποτελέσματα της γονιδιωματικής ανάλυσης των στελεχών SRL740, SRL742, SRL1020 και SRL1060, απέδειξαν την ύπαρξη πλήθους νησίδων βιοσυνθετικών γονιδίων (BGCs) δευτερογενών μεταβολιτών στο γονιδίωμα τους, μέρος των οποίων εμφανίζουν μικρή ή ακόμη και ελάχιστη ομοιότητα με ήδη γνωστές, ταυτοποιημένες BGCs. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τις προσαρμογές που έχουν πραγματοποιήσει λόγω των εξελικτικών πιέσεων υπό τις συνθήκες του ακραίου, ανεξερεύνητου περιβάλλοντος του σπηλαίου, ενισχύουν την πεποίθηση ανακάλυψης νέων βιοδραστικών ενώσεων, ή έστω παραλλαγών των ήδη γνωστών. Παραδείγματος χάριν, βρέθηκαν νησίδες γονιδίων τερπενίων, μη ριβοσωμικών πεπτιδικών συνθετασών (NRPS),

πολυκετιδικών συνθασών (PKSs) και ριβοσωμικά συντιθέμενων και μετα-μεταφραστικά τροποποιημένων πεπτιδίων (RiPP), που είναι γνωστές για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών (Blin et al., 2023). Το χαμηλό ποσοστό ομοιότητας ορισμένων με τις ταυτοποιημένες BGCs χαρακτηρισμένων στελεχών, ενέχει την προοπτική ανακάλυψης βιοδραστικών ενώσεων με παρόμοιες, αλλά νέες, επιθυμητές ιδιότητες.

Ήδη οι ερευνητικές μελέτες για την ανάπτυξη αντιβιοτικών από στρεπτομύκητες που έχουν απομονωθεί από σπήλαια, έχουν δώσει πολύ ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Από κοιτάσματα γάλακτος σελήνης, μίας χαρακτηριστικής ουσίας που απαντάται σε σπήλαια, απομονώθηκε στέλεχος *Streptomyces lunaelactis* που παράγει Lunaemycin, ένα κυκλικό εξαιπεπτίδιο με βακτηριοκτόνο δράση έναντι θετικών κατά Gram βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων κάποιων πολυανθεκτικών παθογόνων (Martinet et al., 2023). Το γεγονός αυτό το καθιστά δυνητικό υποψήφιο για ανάπτυξη αντιβιοτικών. Από ένα καρστικό σπήλαιο στην Κίνα, απομονώθηκε το νέο αντιβιοτικό Xiakemycin A, μια πυρανο-ναφθοκινόνη που παράγεται από το στέλεχος *Streptomyces* sp. CC8-201, με αξιοσημείωτες βακτηριοστατικές ιδιότητες έναντι θετικών κατά Gram βακτηρίων (Jiang et al., 2015). Το στέλεχος *Streptomyces* sp. GLD25, που απομονώθηκε από το σπήλαιο Gueldaman της Αλγερίας, φαίνεται να έχει πολλά υποσχόμενες αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Djebbah et al., 2022). Οι μελέτες που επικεντρώνονται στην αναζήτηση νέων στελεχών στρεπτομυκήτων με πιθανές βιοτεχνολογικές και φαρμακευτικές εφαρμογές είναι αμέτρητες, και ενισχύουν ολοένα το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας.

4.3 Μελλοντικές Προσεγγίσεις

Η μελέτη των μικροβιωμάτων σπηλαίων για την ανακάλυψη νέων στελεχών με μοναδικές ιδιότητες φαίνεται να είναι ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο έρευνας. Η έλλειψη θρεπτικών υποστρωμάτων στα οικοσυστήματα αυτά έχει στρέψει τους μικροοργανισμούς που τα αποικίζουν σε εναλλακτικούς τρόπους συλλογής της απαραίτητης ενέργειας. Είναι αξιοσημείωτη η δυνατότητα συμμετοχής των σπηλαιόβιων μικροοργανισμών στην ανακύκλωση του θείου και του αζώτου, και η μελέτη του μεταγονιδιώματός τους ως προς τα γονίδια και τους μεταβολίτες που εμπλέκονται στους βιογεωχημικούς αυτούς κύκλους ενδέχεται να αποκαλύψει σημαντικές προοπτικές εκμετάλλευσής τους, καθώς παίζουν βασικό ρόλο στη διατήρηση και την παραγωγή ενέργειας στα οικοσυστήματα αυτά (Zada et al., 2021, Samanta et al., 2023). Η μελέτη του δευτερογενούς μεταβολισμού των μικροοργανισμών σπηλαίων αναμένεται επίσης να αποτελέσει ανεξάντλητη πηγή νέων βιοδραστικών ενώσεων, η αναζήτηση των οποίων αποτελεί καίριο ζήτημα. Το κλειδί φαίνεται να κρύβεται στην επίλυση του προβλήματος της μη έκφρασης πλήθους βιοσυνθετικών γονιδίων υπό την εργαστηριακή καλλιέργεια των μικροοργανισμών (Culp et al., 2019). Ελπιδοφόρα είναι μια ακόμη νέα προοπτική εξόρυξης νησίδων βιοσυνθετικών γονιδίων (BGCs), καθώς έχει δειχθεί ότι μέσω αποσιώπησης των ευρέως διαδεδομένων BGCs, επάγεται η έκφραση «κρυφών» BGCs, που αναμένεται να κρύβουν σημαντική και δυνητικά χρήσιμη γενετική πληροφορία (Culp et al., 2019).

Κεφάλαιο 5: Βιβλιογραφία

- Saleem, M. (2015). *Microbiome Community Ecology: Fundamentals and Applications*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-11665-5>
- Tazi, L., Breakwell, D. P., Harker, A. R., & Crandall, K. A. (2014). Life in extreme environments: Microbial diversity in Great Salt Lake, Utah. *Extremophiles*, 18(3), 525–535. <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0637-x>
- Northup, E., Kathleen, H., Lavoie, D. (2001). Geomicrobiology of Caves: A Review. *Geomicrobiology Journal*, 18(3), 199–222. <https://doi.org/10.1080/01490450152467750>
- Zhu, H.-Z., Jiang, C.-Y., & Liu, S.-J. (2022). Microbial roles in cave biogeochemical cycling. *Frontiers in Microbiology*, 13, 950005. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.950005>
- Cheeptham, N. (Ed.). (2013). *Cave Microbiomes: A Novel Resource for Drug Discovery* (Vol. 1). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5206-5>
- Romero, A. (2012). CAVES AS BIOLOGICAL SPACES. *Polymath: An Interdisciplinary Arts and Sciences Journal*, 2(3).
- Northup, E., Kathleen, H., Lavoie, D. (2001). Geomicrobiology of Caves: A Review. *Geomicrobiology Journal*, 18(3), 199–222. <https://doi.org/10.1080/01490450152467750>
- Biagioli, F., Coleine, C., Delgado-Baquerizo, M., Feng, Y., Saiz-Jimenez, C., & Selbmann, L. (2024). Outdoor climate drives diversity patterns of dominant microbial taxa in caves worldwide. *Science of The Total Environment*, 906, 167674. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167674>
- Zada, S., Sajjad, W., Rafiq, M., Ali, S., Hu, Z., Wang, H., & Cai, R. (2022). Cave Microbes as a Potential Source of Drugs Development in the Modern Era. *Microbial Ecology*, 84(3), 676–687. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01889-3>
- Demain, A. L. (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(4), 455–463. <https://doi.org/10.1007/s002530051546>
- Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., & Blázquez, J. (2013). Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6–7), 293–297. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.004>
- Masłowska, K. H., Makiela-Dzubska, K., & Fijalkowska, I. J. (2019). The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage. *Environmental and molecular mutagenesis*, 60(4), 368–384. <https://doi.org/10.1002/em.22267>

- Sayed, A. M., Hassan, M. H. A., Alhadrami, H. A., Hassan, H. M., Goodfellow, M., & Rateb, M. E. (2020). Extreme environments: Microbiology leading to specialized metabolites. *Journal of Applied Microbiology*, 128(3), 630–657. <https://doi.org/10.1111/jam.14386>
- Maciejewska, M., Adam, D., Naômé, A., Martinet, L., Tenconi, E., Całusińska, M., Delfosse, P., Hanikenne, M., Baurain, D., Compère, P., Carnol, M., Barton, H. A., & Rigali, S. (2017). Assessment of the Potential Role of Streptomyces in Cave Moonmilk Formation. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01181>
- Alam, K., Mazumder, A., Sikdar, S., Zhao, Y.-M., Hao, J., Song, C., Wang, Y., Sarkar, R., Islam, S., Zhang, Y., & Li, A. (2022). Streptomyces: The biofactory of secondary metabolites. *Frontiers in Microbiology*, 13, 968053. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.968053>
- Paradkar, A., Trefzer, A., Chakraborty, R., & Stassi, D. (2003). Streptomyces Genetics: A Genomic Perspective. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23(1), 1–27. <https://doi.org/10.1080/713609296>
- Bhat, M. P., & Nayaka, S. (2023). Cave Soil Streptomyces sp. Strain YC69 Antagonistic to Chilli Fungal Pathogens Exhibits In Vitro Anticancer Activity Against Human Cervical Cancer Cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(10), 6232–6255. <https://doi.org/10.1007/s12010-023-04388-y>
- Chung, Y.-H., Kim, H., Ji, C.-H., Je, H.-W., Lee, D., Shim, S. H., Joo, H.-S., & Kang, H.-S. (2021). Comparative Genomics Reveals a Remarkable Biosynthetic Potential of the Streptomyces Phylogenetic Lineage Associated with Rugose-Ornamented Spores. *mSystems*, 6(4), e00489-21. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00489-21>
- De Lima Procópio, R. E., Da Silva, I. R., Martins, M. K., De Azevedo, J. L., & De Araújo, J. M. (2012). Antibiotics produced by Streptomyces. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(5), 466–471. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>
- Yagüe, P., López-García, M. T., Rioseras, B., Sánchez, J., & Manteca, A. (2013). Pre-sporulation stages of Streptomyces differentiation: state-of-the-art and future perspectives. *FEMS microbiology letters*, 342(2), 79–88. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12128>
- Vester, J. K., Glaring, M. A., & Stougaard, P. (2015). Improved cultivation and metagenomics as new tools for bioprospecting in cold environments. *Extremophiles*, 19(1), 17–29. <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0704-3>
- Hawkins, R. D., Hon, G. C., & Ren, B. (2010). Next-generation genomics: An integrative approach. *Nature Reviews Genetics*, 11(7), 476–486. <https://doi.org/10.1038/nrg2795>

Challis G. L. (2008). Genome mining for novel natural product discovery. *Journal of medicinal chemistry*, 51(9), 2618–2628. <https://doi.org/10.1021/jm700948z>

Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840–862. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>

Woo, P. C., Lau, S. K., Teng, J. L., Tse, H., & Yuen, K. Y. (2008). Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14(10), 908–934. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02070.x>

Ng, P. C., & Kirkness, E. F. (2010). Whole genome sequencing. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 628, 215–226. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-367-1_12

Wikipedia contributors. (2023, June 3). Gourgouthakas. Wikipedia. <https://en.wikipedia.org/wiki/Gourgouthakas>

Yorgos Sotiriadis, Markos Vaxevanopoulos, Alexandros Mariolis, Katerina Vasilopoulou, Kostas Adamopoulos, Markos Digenis, Giorgos Aggelopoulos, Savvas Paragkamian, Vasilis Pantelios, Michalis Tsopelas, & Katerina Ahaka Chalabardaki. (2023). Gourgouthakas 2022: report of the cave expedition of LOC1, Crete, Greece (1.0). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7674013>

Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, editors. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: Wiley. pp. 115–175.

Sayers, E. W., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D. C., Connor, R., Funk, K., Kelly, C., Kim, S., Madej, T., Marchler-Bauer, A., Lanczycki, C., Lathrop, S., Lu, Z., Thibaud-Nissen, F., Murphy, T., Phan, L., Skripchenko, Y., Tse, T., ... Sherry, S. T. (2022). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic acids research*, 50(D1), D20–D26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>

Bradburn, S., PhD. (2019, August 9). *The Nanodrop results explained*. Top Tip Bio. https://toptipbio.com/the-nanodrop-results-explained/?utm_content=cmp-true

Nakayama, Y., Yamaguchi, H., Einaga, N., & Esumi, M. (2016). Pitfalls of DNA Quantification Using DNA-Binding Fluorescent Dyes and Suggested Solutions. *PloS one*, 11(3), e0150528. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150528>

Vaser, R., & Šikić, M. (2021). Time- and memory-efficient genome assembly with Raven. *Nature Computational Science*, 1(5), 332–336. <https://doi.org/10.1038/s43588-021-00073-4>

Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLOS Computational Biology*, 13(6), e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>

Richter, M., Rosselló-Móra, R., Oliver Glöckner, F., & Peplies, J. (2016). JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics* (Oxford, England), 32(6), 929–931. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>

Grant, J. R., Enns, E., Marinier, E., Mandal, A., Herman, E. K., Chen, C. Y., Graham, M., Van Domselaar, G., & Stothard, P. (2023). Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic acids research*, 51(W1), W484–W492. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad326>

Blin, K., Shaw, S., Augustijn, H. E., Reitz, Z. L., Biermann, F., Alanjary, M., Fetter, A., Terlouw, B. R., Metcalf, W. W., Helfrich, E. J. N., van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Weber, T. (2023). antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. *Nucleic acids research*, 51(W1), W46–W50. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad344>

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Pribelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology*, 19(5), 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>

Jiang, J., He, X., & Cane, D. E. (2007). Biosynthesis of the earthy odorant geosmin by a bifunctional *Streptomyces coelicolor* enzyme. *Nature chemical biology*, 3(11), 711–715. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.29>

Shi, T., Wang, Y. F., Wang, H., & Wang, B. (2022). Genus *Nocardiopsis*: A Prolific Producer of Natural Products. *Marine drugs*, 20(6), 374. <https://doi.org/10.3390/md20060374>

Cavalcanti, É. B. V. S., Emerenciano, V. de P., Scotti, L., & Scotti, M. T. (2017). Chapter 7—Flavonoids From Asteraceae as Multitarget Source of Compounds Against Protozoal Diseases. In A. Speck-Planche (Ed.), *Multi-Scale Approaches in Drug Discovery* (pp. 149–190). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101129-4.00007-2>

Mak, S. and Nodwell, J.R. (2017), Actinorhodin is a redox-active antibiotic with a complex mode of action against Gram-positive cells. *Molecular Microbiology*, 106: 597-613. <https://doi.org/10.1111/mmi.13837>

Babcock, M. J., & Kendrick, K. E. (1990). Transcriptional and translational features of a sporulation gene of *Streptomyces griseus*. *Gene*, 95(1), 57–63. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90413-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90413-1)

Koteva, K., Cox, G., Kelso, J. K., Surette, M. D., Zubyk, H. L., Ejim, L., Stogios, P., Savchenko, A., Sørensen, D., & Wright, G. D. (2018). Rox, a Rifamycin Resistance Enzyme with an Unprecedented Mechanism of Action. *Cell Chemical Biology*, 25(4), 403–412.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.01.009>

Surette, M. D., Wagglechner, N., Koteva, K., & Wright, G. D. (2022). HelR is a helicase-like protein that protects RNA polymerase from rifamycin antibiotics. *Molecular Cell*, 82(17), 3151–3165.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.06.019>

Petković, H., Cullum, J., Hranueli, D., Hunter, I. S., Perić-Concha, N., Pigac, J., Thamchaipenet, A., Vujaklija, D., & Long, P. F. (2006). Genetics of *Streptomyces rimosus*, the oxytetracycline producer. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 70(3), 704–728. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00004-06>

Fraimow, H., Knob, C., Herrero, I. A., & Patel, R. (2005). Putative VanRS-like two-component regulatory system associated with the inducible glycopeptide resistance cluster of *Paenibacillus popilliae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(7), 2625–2633. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2625-2633.2005>

Houba, S., Willem, S., Duez, C., Molitor, C., Dusart, J., Frère, J. M., & Ghuysen, J. M. (1989). Nucleotide sequence of the gene encoding the active-site serine beta-lactamase from *Actinomadura R39*. *FEMS microbiology letters*, 53(3), 241–246. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(89\)90224-3](https://doi.org/10.1016/0378-1097(89)90224-3)

Arkin, A. P., Cottingham, R. W., Henry, C. S., Harris, N. L., Stevens, R. L., Maslov, S., Dehal, P., Ware, D., Perez, F., Canon, S., Sneddon, M. W., Henderson, M. L., Riehl, W. J., Murphy-Olson, D., Chan, S. Y., Kamimura, R. T., Kumari, S., Drake, M. M., Brettin, T. S., ... Yu, D. (2018). KBase: The United States Department of Energy Systems Biology Knowledgebase. *Nature Biotechnology*, 36(7), 566–569. <https://doi.org/10.1038/nbt.4163>

Zada, S., Xie, J., Yang, M., Yang, X., Sajjad, W., Rafiq, M., Hasan, F., Hu, Z., & Wang, H. (2021). Composition and functional profiles of microbial communities in two geochemically and mineralogically different caves. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(23), 8921–8936. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11658-4>

Samanta, B., Sharma, S., & Budhwar, R. (2023). Metagenome Analysis of Speleothem Microbiome from Subterranean Cave Reveals Insight into Community Structure, Metabolic

Potential, and BGCs Diversity. *Current Microbiology*, 80(10), 317. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03431-9>

Li, L.-F., Wu, Q.-X., Wu, H., Li, Y., Peng, Q., Han, R.-H., Zhang, D.-H., Yu, W.-D., Xu, R., Wang, J., Fan, Z., & Hou, S.-Y. (2023). Complete Genome Sequence of *Streptomyces* sp. HP-A2021, a Promising Bacterium for Natural Product Discovery. *Biochemical Genetics*, 61(5), 2042–2055. <https://doi.org/10.1007/s10528-023-10350-8>

Martinet, L., Naômé, A., Rezende, L. C. D., Tellatin, D., Pignon, B., Docquier, J.-D., Sannio, F., Baiwir, D., Mazzucchelli, G., Frédérick, M., & Rigali, S. (2023). Lunaemycins, New Cyclic Hexapeptide Antibiotics from the Cave Moonmilk-Dweller *Streptomyces lunaelactis* MM109T. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1114. <https://doi.org/10.3390/ijms24021114>

Jiang, Z., Guo, L., Chen, C., Liu, S., Zhang, L., Dai, S., He, Q., You, X., Hu, X., Tuo, L., Jiang, W., & Sun, C. (2015). Xiakemycin A, a novel pyranonaphthoquinone antibiotic, produced by the *Streptomyces* sp. CC8-201 from the soil of a karst cave. *The Journal of Antibiotics*, 68(12), 771–774. <https://doi.org/10.1038/ja.2015.70>

Djebbah, F. Z., Al-Dhabi, N. A., Arasu, M. V., Belyagoubi, L., Kherbouche, F., Abdelouahid, D. E., & Ravindran, B. (2022). Isolation and characterisation of *Streptomyces* sp. Strain GLD25 with antimicrobial and antioxidant effects from Gueldaman cave (GLD1), Akbou-Algeria. *Journal of King Saud University - Science*, 34(1), 101719. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101719>

Culp, E. J., Yim, G., Waglechner, N., Wang, W., Pawlowski, A. C., & Wright, G. D. (2019). Hidden antibiotics in actinomycetes can be identified by inactivation of gene clusters for common antibiotics. *Nature Biotechnology*, 37(10), 1149–1154. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0241-9>