

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΤΡΑΓΑΚΗ ΒΕΝΕΤΙΑ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2021

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ (ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΚΑΙ
ΜΥΚΗΤΕΣ) ΚΑΤΑ ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ
ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ**

**STUDY OF MICROBIOME (BACTERIA AND FUNGI) DURING
DIFFERENT STAGES OF GREEK BEE BREAD
MATURATION**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μόσιαλος Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αμούτζιας Γρηγόριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοπληροφορικής με έμφαση στην Μικροβιολογία, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δημητρίου Τηλέμαχος, Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (Ε.ΔΙ.Π.) στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων-Μοριακής Βακτηριολογίας-Ιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μελισσόψωμο είναι ένα πολύτιμο προϊόν που αποτελείται από ένα μείγμα γύρης, νέκταρος και σάλιου μέλισσας, και προκύπτει μετά από ζύμωση. Η γύρη, το κύριο συστατικό του, είναι αυτή που συλλέγεται από τις μέλισσες και αποτίθεται στα κελιά της κηρήθρας. Εκεί προστίθενται μέλι, πεπτικά ένζυμα και κερί μέλισσας, οπότε και ακολουθεί η γαλακτική ζύμωση. Το μελισσόψωμο συνιστά τη βασικότερη τροφή για τις μέλισσες της κυψέλης. Επίσης, είναι γνωστό για τις αντιμικροβιακές, αντιικές, αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές του.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του μικροβιώματος του μελισσόψωμου. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από δείγματα μελισσόψωμου με χρήση 2 διαφορετικών πρωτοκόλλων, για να επιλεγεί η καταλληλότερη μέθοδος. Στη συνέχεια, προκειμένου να διαπιστωθεί η επιτυχία της απομόνωσης βακτηριακού DNA, εφαρμόστηκε η τεχνική της PCR για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων. Για την απομόνωση DNA επιλέχθηκε το kit NucleoSpin Food από Macherey-Nagel, κυρίως με βάση την καθαρότητα του γενετικού υλικού.

Έπειτα, μετά την απομόνωση DNA, 9 δείγματα μελισσόψωμου στάλθηκαν στην εταιρεία MacroGen (Europe) για αλληλούχηση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing) μέσω Illumina, ώστε να διαπιστωθεί τόσο το βακτηριακό όσο και το μυκητιακό μικροβίωμα. Επιπλέον, τα δείγματα 1-5 αναλύθηκαν με βάση την περιοχή V3-V4 του γονιδίου 16S για τα βακτήρια, ενώ τα δείγματα 6-9 με βάση την ITS περιοχή για τους μύκητες. Όσον αφορά στα βακτήρια, διαπιστώθηκε πως κυριαρχούν τα γένη *Sphingomonas*, *Pseudomonas* και *Massilia*, ενώ ακολουθούν και τα *Acinetobacter*, *Lactobacillus*, *Hymenobacter*, *Pantoea*, *Mesoplasma*, *Phaseolibacter* και *Enterobacter*. Σχετικά με τα είδη *Lactobacillus* spp. και τη μεταβολή της σχετικής αφθονίας τους στο χρόνο, έδειξε μια αυξομείωση που κατέληξε σε αύξηση στο τελευταίο στάδιο, γεγονός μη αναμενόμενο με τα μέχρι τώρα δεδομένα.

Αναφορικά με τους μύκητες, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κυριαρχεί το γένος *Zygosaccharomyces*, φτάνοντας μέχρι και το 99% του συνόλου σε ένα δείγμα (S9), ενώ ακολουθούν και το γένος *Trichoderma* και άγνωστα γένη της τάξης *Saccharomycetales*. Σχετικά με τα είδη *Zygosaccharomyces* spp., η σχετική αφθονία τους παρουσίασε μεγάλη αύξηση στο τελευταίο στάδιο, γεγονός που ίσως να υποδεικνύει ότι συμβαίνει και αλκοολική ζύμωση εκτός από γαλακτική ζύμωση. Συνολικά από την ανάλυση έγινε φανερό η μικροβιακή ποικιλότητα του μελισσόψωμου, η οποία μπορεί να εξαρτάται σημαντικά από το περιβάλλον, ενώ χρήσιμη θεωρείται η περαιτέρω διερεύνηση.

Λέξεις-κλειδιά:

Μελισσόψωμο, γύρη, μικροβίωμα, αλληλούχηση επόμενης γενιάς, ποικιλότητα

ABSTRACT

Bee bread is a fermented product that consists of a mixture of pollen, nectar and bee saliva. Pollen is its main ingredient which is collected by bees. Then, bees store pollen in the honeycomb cells and fermentation process is induced by adding honey, digestive enzymes and beeswax. Bee bread is the main food source for honey bees and it is well known for its antimicrobial, antiviral, antioxidant, anticancer and anti-inflammatory activities.

The aim of this work was the study of bee bread's microbiome. First, we extracted DNA from bee bread samples by using 2 different protocols so as to select the most suitable method. Then, we applied PCR for the detection of 16S rRNA gene of bacteria as a DNA quality method. We chose NucleoSpin Food kit (Macherey-Nagel) based on DNA quality.

Following DNA extraction, 9 bee bread samples were sent to Macrogen (Europe) in order for them to apply Next Generation Sequencing by using Illumina to discover the bacterial and fungal microbiome. Samples 1-5 were analyzed based on V3-V4 region of the 16S rRNA gene for bacteria identification, while samples 6-9 were based on ITS region for fungi identification.

The most abundant bacterial genera were *Sphingomonas*, *Pseudomonas* and *Massilia*, while others were *Acinetobacter*, *Lactobacillus*, *Hymenobacter*, *Pantoea*, *Mesoplasma*, *Phaseolibacter* and *Enterobacter*. Also, *Lactobacillus* spp. were the most important bacterial species for bee bread fermentation and their abundance exhibited the expected change except for the final stage, where their abundance increased.

The most abundant fungal genus was *Zygosaccharomyces*, which represented 99% abundance in one sample (S9). Other abundant genera were *Trichoderma* and some unidentified genera in order Saccharomycetales. Abundance of *Zygosaccharomyces* spp. showed extreme increase at the final stage, implementing that alcoholic fermentation might also occur except for lactic fermentation. In this work, we studied microbial diversity in bee bread. We suggest that it highly depends on the environment. Nevertheless, further investigation is recommended.

Keywords:

Bee bread, pollen, microbiome, next generation sequencing, diversity

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1. Το μελισσόψωμο και τα χαρακτηριστικά του	7
1.2. Η διαδικασία παραγωγής και ωρίμανσης του μελισσόψωμου	7
1.3. Συλλογή και αποθήκευση μελισσόψωμου	8
1.4. Διατροφική αξία μελισσόψωμου	9
1.5. Χημική σύσταση μελισσόψωμου.....	9
1.6. Μικροβίωμα μελισσόψωμου	11
1.7. Μεταγονιδιωματική ανάλυση	12
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	13
2.1. Απομόνωση DNA	13
2.1.1. Βασισμένη στη βιβλιογραφία (Mahuku, 2004)	14
2.1.2. Με χρήση του kit NucleoSpin Food από Macherey-Nagel.....	14
2.2. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των δειγμάτων DNA με	15
χρήση του Nanodrop	15
2.3. PCR και ηλεκτροφόρηση.....	15
2.3.1. PCR στο 16S rRNA	15
2.3.2. Ηλεκτροφόρηση της PCR.....	16
2.4. Αλληλούχηση και βιοπληροφορική ανάλυση.....	16
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	17
3.1. Εύρεση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των δειγμάτων DNA με χρήση.....	17
του Nanodrop.....	17
3.2. Αποτελέσματα PCR.....	18
3.3. Αποτελέσματα αλληλούχησης και βιοπληροφορικής ανάλυσης	19
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	27
5. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	28
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	29

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Το μελισσόψωμο, έπειτα από συλλογή του	7
Εικόνα 2. Η διαδικασία παραγωγής του μελισσόψωμου από τις μέλισσες.....	8
Εικόνα 3. Στάδια μεταγονιδιωματικής ανάλυσης	13
Εικόνα 4. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR σε πηκτή αгарόζης 1,5%.....	18
Εικόνα 5. Η κατανομή των βακτηρίων σε κάθε δείγμα	21
Εικόνα 6. Η μεταβολή των λακτοβάκιλλων κατά την ωρίμανση του μελισσόψωμου.....	22
Εικόνα 7. Η κατανομή των μυκήτων σε κάθε δείγμα	23
Εικόνα 8. Η μεταβολή των ζυμομυκήτων κατά την ωρίμανση του μελισσόψωμου.....	23
Εικόνα 9. Rarefaction curves για τα βακτήρια	26
Εικόνα 10. Rarefaction curves για τους μύκητες.....	27

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Τα δείγματα του μελισσόψωμου και οι χρόνοι ωρίμανσης.....	17
Πίνακας 2. Μετρήσεις Nanodrop.....	18
Πίνακας 3. Περιγραφή των δειγμάτων με βάση την ανάλυσή τους	19
Πίνακας 4. Το σύνολο των βακτηρίων σε επίπεδο γένους και η επί τοις εκατό αφθονία τους	20
Πίνακας 5. Το σύνολο των μυκήτων σε επίπεδο γένους και η επί τοις εκατό αφθονία τους	22
Πίνακας 6. Δείκτες α-ποικιλότητας για τα βακτήρια.....	24
Πίνακας 7. Απόσταση Jaccard (δείκτης β-ποικιλότητας) για τα βακτήρια	25
Πίνακας 8. Δείκτες α-ποικιλότητας για τους μύκητες.....	25
Πίνακας 9. Απόσταση Jaccard (δείκτης β-ποικιλότητας) για τους μύκητες.....	26

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Το μελισσόψωμο και τα χαρακτηριστικά του

Τα μελισσοκομικά προϊόντα, όπως το μέλι, η πρόπολη, η γύρη και ο βασιλικός πολτός, περιλαμβάνονται στα πιο γνωστά φυσικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται στην κλινική πρακτική, χάρη στις ιδιότητές τους. Οι μέλισσες βασίζουν τη διατροφή τους σε δύο πηγές και συγκεκριμένα, στο νέκταρ και στη γύρη. Το νέκταρ είναι αυτό που δίνει το μέλι και αποτελεί σημαντική πηγή υδατανθράκων, ενώ η γύρη δίνει το μελισσόψωμο που προσφέρει στις μέλισσες, εκτός από υδατάνθρακες, και άλλα θρεπτικά στοιχεία, όπως πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα και βιταμίνες (Bakour *et al.*, 2019).

Το μελισσόψωμο είναι ένα πολύτιμο προϊόν που αποτελείται από ένα μείγμα γύρης, νέκταρος και σάλιου μέλισσας, ενώ προκύπτει μετά από ζύμωση. Διαθέτει καραμελένιο χρώμα (Εικόνα 1), ενώ η γεύση του έχει χαρακτηριστεί κυρίως ως ξινή, γεγονός που οφείλεται στα αρώματα που φέρει από τα άνθη και τα εσπεριδοειδή (Khalifa *et al.*, 2020; Dranca *et al.*, 2020). Η γεύση έχει αναφερθεί επίσης ως στυφή, φρουτώδης και γλυκιά (Mărgăoan *et al.*, 2020). Το κύριο συστατικό του, η γύρη, είναι αυτή που συλλέγεται από τις μέλισσες και αποτίθεται στην κυψέλη και στα κελιά της κηρήθρας, όπου και προστίθενται μέλι, πεπτικά ένζυμα και κερί μέλισσας, οπότε και γίνεται στη συνέχεια η γαλακτική ζύμωση (Kieliszek *et al.*, 2018; Mărgăoan *et al.*, 2020). Το μελισσόψωμο αποτελεί τη βασικότερη τροφή για τις μέλισσες της κυψέλης, και ιδιαίτερα για τις προνύμφες, καθώς και για τις εργάτριες μέλισσες στην κυψέλη που παράγουν το βασιλικό πολτό (Kieliszek *et al.*, 2018). Επιπλέον, θεωρείται πολύτιμο προϊόν, καθώς εμφανίζει σημαντική αντιμικροβιακή, αντιική, αντιοξειδωτική, αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδη δράση (Khalifa *et al.*, 2020).

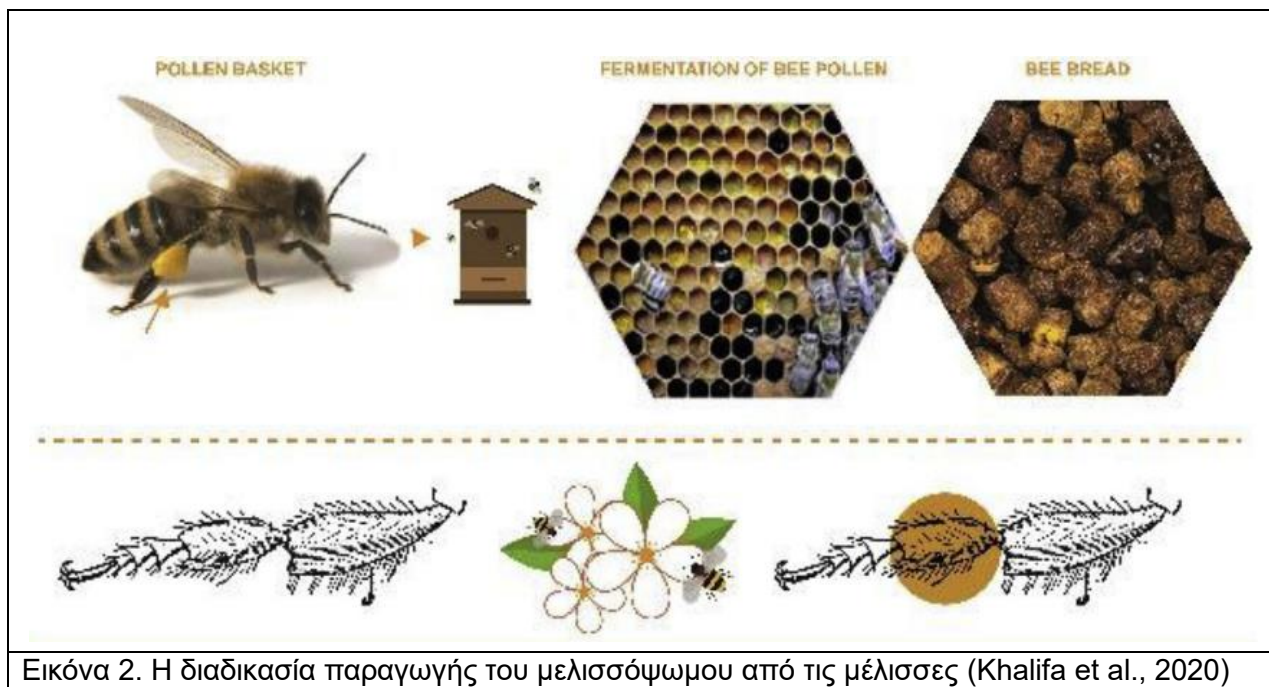


Εικόνα 1. Το μελισσόψωμο, έπειτα από συλλογή του (Khalifa *et al.*, 2020)

1.2. Η διαδικασία παραγωγής και ωρίμανσης του μελισσόψωμου

Οι εργάτριες μέλισσες που συλλέγουν την τροφή και άρα τη γύρη, την αποθέτουν στα άδεια κελιά της κηρήθρας (Εικόνα 2), όπου δημιουργούν μια στρώση για άμεση κατανάλωση από τις εργάτριες μέλισσες που φροντίζουν το γόνο στην κυψέλη. Στη συνέχεια, γίνεται η προσθήκη του μελιού και των

αδενικών εκκρίσεων. Οι μέλισσες ωθούν με το κεφάλι τους το περιεχόμενο μέσα στα κελιά, ώστε να πακεταριστεί σφιχτά. Έπειτα, πραγματοποιείται η διαδικασία της ζύμωσης, η οποία πιστεύεται πως συντελεί στη διατήρηση του μελισσόψωμου και ενισχύει τη διατροφική αξία του. Σε αυτό πιθανώς συμβάλλουν και η μερική πέψη που συμβαίνει στους γυρεόκοκκους από τα πεπτικά ένζυμα των μελισσών, καθώς και το μικροβίωμα του μελισσόψωμου (Asoutis Didaras et al., 2020).



Εικόνα 2. Η διαδικασία παραγωγής του μελισσόψωμου από τις μέλισσες (Khalifa et al., 2020)

Η διαδικασία της γαλακτικής ζύμωσης συμβαίνει με φυσικό τρόπο σε αναερόβιες συνθήκες (Urcan et al., 2017). Λαμβάνει χώρα 7 ημέρες μετά την ανάπτυξη των βακτηρίων γαλακτικού οξέος (Lactic Acid Bacteria – LAB), των ζυμομυκήτων, των βακτηρίων που παράγουν ινδόλη (*Escherichia*) και των αερόβιων βακτηρίων. Η διαδικασία παραγωγής του μελισσόψωμου περιλαμβάνει 4 στάδια. Συγκεκριμένα, το πρώτο στάδιο διαρκεί για 12 ώρες, κατά τις οποίες αναπτύσσεται μια ετερογενής ομάδα μικροοργανισμών, στους οποίους περιλαμβάνονται και οι ζυμομύκητες. Στο δεύτερο στάδιο, τα αναερόβια βακτήρια γαλακτικού οξέος (*Streptococcus*) χρησιμοποιούν τα θρεπτικά στοιχεία που παράγονται από ζύμες και βακτήρια, οπότε και μειώνεται το pH. Κατά το τρίτο στάδιο, παύουν να υπάρχουν βακτήρια του γένους *Streptococcus*, ενώ αναπτύσσονται αυτά του γένους *Lactobacillus*. Στο τέταρτο και τελευταίο στάδιο της ζύμωσης, που συμβαίνει στο τέλος της έβδομης ημέρας, πεθαίνουν πλέον τα βακτήρια γαλακτικού οξέος και ορισμένοι ζυμομύκητες, λόγω της αύξησης και συσσώρευσης γαλακτικού οξέος που έχει παραχθεί. Σε αυτό το σημείο, η γύρη αποστειρώνεται πλήρως, διαθέτοντας pH ίσο με 4 (Khalifa et al., 2020). Η ζύμωση σαν διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητας του μελισσόψωμου σε ορισμένα συστατικά, ενώ παράλληλα το προστατεύει και το διατηρεί σταθερό, μέσω της συσσώρευσης γαλακτικού οξέος (Urcan et al., 2017; Mărgăoan et al., 2020).

1.3. Συλλογή και αποθήκευση μελισσόψωμου

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι για τη συλλογή και την απομόνωση του μελισσόψωμου από τις κηρήθρες. Όμως, φέρουν και διαφορετικά μειονεκτήματα, διότι γίνονται με χειρωνακτικούς τρόπους. Συγκεκριμένα, αυτοί περιλαμβάνουν το μούλιασμα των κηρήθρων στο νερό, την απομόνωση μέσω δόνησης, την αποξήρανση και το διαχωρισμό των κόκκων μέσω ξήρανσης υπό κενό, ψύξης,

διαχωρισμού και φιλτραρίσματος των τμημάτων κεριού. Επιπρόσθετα, το μελισσόψωμο μπορεί να απομονωθεί με τη χρήση λαβίδων για προσωπική ή εργαστηριακή χρήση. Αυτές οι μέθοδοι δεν είναι και οι πλέον χρήσιμες για μεγαλύτερης κλίμακας παραγωγή μελισσόψωμου. Σε αυτήν την περίπτωση, η συλλογή γίνεται σε τέσσερα στάδια που αποτελούνται από την ξήρανση, το διαχωρισμό, το φιλτράρισμα και την αποστείρωση.

Για τη διατήρηση και αποθήκευση του μελισσόψωμου, αυτό πρέπει να παραμείνει σε θερμοκρασία 5–8 °C. Εναλλακτικά, μπορεί να αποθηκευτεί μετά από ανάμειξή του με μέλι ή μέσα σε ξηραντήρα για την αποφυγή υγρασίας (Khalifa *et al.*, 2020).

1.4. Διατροφική αξία μελισσόψωμου

Όσον αφορά στις μέλισσες, το μελισσόψωμο αποτελεί τη βασικότερη πηγή τους για την πρόσληψη πρωτεϊνών. Σημαντικό είναι και το γεγονός ότι το μελισσόψωμο γίνεται πιο εύπεπτο για αυτές κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής του, ενώ επίσης αυξάνεται και η βιοδιαθεσιμότητά του σε θρεπτικά στοιχεία για τις ίδιες (Urcan *et al.*, 2017). Λόγω της περιεκτικότητάς του σε λιπαρά οξέα, επιδρά θετικά στη γονιμότητα και την υγεία των μελισσών (Karlan *et al.*, 2016). Αναφορικά με τους ανθρώπους, το μελισσόψωμο επίσης γίνεται περισσότερο εύπεπτο και ανεκτό από τη γύρη μέσω της γαλακτικής ζύμωσης (Urcan *et al.*, 2017). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή ακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία με τη σειρά τους ωφελούν σε σημαντικό βαθμό την υγεία, καθώς μειώνουν τα επίπεδα της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων και φέρουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, ενώ προστατεύουν από καρδιαγγειακές παθήσεις. Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι το μελισσόψωμο αποτελεί πηγή μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία δε συντίθενται στον ανθρώπινο οργανισμό. Επομένως, μπορούν να προσληφθούν από τη διατροφή (Karlan *et al.*, 2016). Επίσης, το μελισσόψωμο μπορεί να επιδρά θετικά στο μεταβολισμό των λιπιδίων και να έχει θετικό αποτέλεσμα σε ασθενείς που πάσχουν από χρόνιες αρθρίτιδες (Khalifa *et al.*, 2020).

Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε, το μελισσόψωμο διαθέτει αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα σε σύγκριση με τη γύρη (Urcan *et al.*, 2017; Khalifa *et al.*, 2020; Kaškonienė *et al.*, 2020). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ένα μέρος του εξωτερικού στρώματος που περιβάλλει τους γυρεόκοκκους καταστρέφεται κατά τη ζύμωση, με αποτέλεσμα η πλούσια περιεκτικότητα της γύρης να μπορεί να αφομοιωθεί καλύτερα από το σώμα του ανθρώπου (Urcan *et al.*, 2017; Kaškonienė *et al.*, 2020). Έτσι, η απορρόφηση των βιταμινών είναι αρκετές φορές υψηλότερη από την αντίστοιχη της γύρης. Πολλές φορές θεωρείται υψηλότερης διατροφικής αξίας ακόμα και από το μέλι, καθώς είναι πιο πλούσιο σε φαινολικά συστατικά, σε βιταμίνες και σε μακροστοιχεία, όπως το μαγνήσιο, το ασβέστιο, το κάλιο και τον ψευδάργυρο (Khalifa *et al.*, 2020). Λόγω της περιεκτικότητάς του σε συγκεκριμένα συστατικά, το μελισσόψωμο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα σε άτομα που έχουν έλλειψη βιταμινών και θρεπτικών στοιχείων. Θεωρείται ιδιαίτερα ευεργετικό, διότι μπορεί να δράσει σε διάφορα επίπεδα, προκειμένου να επαναφέρει τον οργανισμό στη φυσιολογική λειτουργία (Kieliszek *et al.*, 2018).

1.5. Χημική σύσταση μελισσόψωμου

Η γύρη που αποτίθεται στην κυψέλη υπόκειται φυσιολογικά σε ζύμωση. Έτσι, προκύπτει το μελισσόψωμο, το οποίο αποτελεί μια πιο σταθερή και θρεπτική τροφή για τις μέλισσες, συγκριτικά με τη φρέσκια γύρη (Di Cagno *et al.*, 2019). Το μελισσόψωμο διαφέρει από τη φρέσκια γύρη στο pH, το οποίο μειώνεται γύρω στο 4 (3,8 – 4,3), καθώς και στο γεγονός ότι αυτό περιέχει λιγότερες πρωτεΐνες και

λιπαρά, ενώ διαθέτει περισσότερους υδατάνθρακες και ασφαλώς περιέχει και το γαλακτικό οξύ (Barene *et al.*, 2014). Επομένως, μέσα από τη διαδικασία της ζύμωσης, είναι λογικό να επηρεάζεται η σύσταση του μελισσόψωμου. Πιο συγκεκριμένα, κατά την ωρίμανσή του, αυτό υφίσταται κάποιες μεταβολές σε σύγκριση με τη φρέσκια γύρη, οι οποίες περιλαμβάνουν μεταβολές στα επίπεδα των αμινοξέων και των πρωτεϊνών, καθώς οι πρωτεΐνες διασπώνται σε αμινοξέα, όπως επίσης και στο επίπεδο των λιπαρών οξέων. Τέλος, όπως αναφέρθηκε, παρατηρείται αύξηση των υδατανθράκων, του γαλακτικού οξέος και άρα, και της οξύτητας (Barene *et al.*, 2014; Di Cagno *et al.*, 2019).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το μελισσόψωμο έχει αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα σε θρεπτικά στοιχεία συγκριτικά με την αρχική γύρη. Αυτό συμβαίνει επίσης κατά τη ζύμωση και άρα, κατά τη μετάβαση από τη γύρη στο μελισσόψωμο, όπου διαταράσσεται το εξωτερικό περίβλημα των γυρεόκοκκων. Πιο συγκεκριμένα, το περίβλημα αυτό είναι γνωστό ως εξίνη, η οποία αποτελείται κυρίως από τη σποροπολλενίνη. Η σποροπολλενίνη είναι μια ιδιαίτερα ελαστική και ανθεκτική ουσία, που προστατεύει τη γύρη και το περιεχόμενό της από εξωτερικές φθορές (Zuluaga *et al.*, 2015; Kaškonienė *et al.*, 2020).

Το μελισσόψωμο αποτελεί πηγή θρεπτικών και βιοδραστικών συστατικών, όπως πρωτεϊνών, βιταμινών (C, B, K, P και E) και πολυφαινολών, που περιλαμβάνουν τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα. Επιπλέον, στο μελισσόψωμο έχει βρεθεί υψηλή συγκέντρωση από ακόρεστα αλειφατικά οξέα, αμινοξέα και υδατάνθρακες, όπως γλυκόζη και φρουκτόζη (Dranca *et al.*, 2020). Η χημική σύστασή του εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος των φυτών από τα οποία οι μέλισσες συλλέγουν τη γύρη, καθώς επίσης από τη γεωγραφική προέλευση, τις κλιματικές συνθήκες, την εποχική ποικιλότητα, ακόμα και τη φύση του εδάφους. Για αυτό το λόγο, η σύστασή του μπορεί να ποικίλλει, ακόμα και στην ίδια κυψέλη (Urcan *et al.*, 2017; Mărgăoan *et al.*, 2019). Η ποικιλία αυτή μπορεί να παρατηρηθεί στη διαθέσιμη βιβλιογραφία.

Σύμφωνα με τους Karlan *et al.* (2016), στο μελισσόψωμο βρέθηκαν διακυμάνσεις στις περιεκτικότητες. Συγκεκριμένα, τα λιπίδια κυμαίνονταν από 5,9 μέχρι και 11,5% της συνολικής σύστασης, ενώ οι πρωτεΐνες από 14,8 μέχρι 24,3%. Σε δείγματα μελισσόψωμου που είχαν διαφορετική φυτική προέλευση, βρέθηκαν συνολικά 37 λιπαρά οξέα, από τα οποία τα 34 εμφάνιζαν σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους. Επιπλέον, υπολογίστηκε η αναλογία ακόρεστων προς κορεσμένα λιπαρά οξέα, από την οποία διαπιστώθηκε ότι το μελισσόψωμο αποτελεί σημαντική πηγή ακόρεστων λιπαρών, τόσο για τις μέλισσες όσο και για τον άνθρωπο (Karlan *et al.*, 2016). Αντίστοιχα, οι Zuluaga *et al.* (2015) σε δείγματα μελισσόψωμου από την Κολομβία κατέληξαν ότι τα λιπίδια κατείχαν $3,4 \pm 1,1$ γραμμάρια/100 γραμμάρια δείγματος, ενώ οι πρωτεΐνες αντιστοιχούσαν στα $23,1 \pm 2,9$ γραμμάρια. Επιπλέον, υπολόγισαν *in vitro* την πεπτικότητα του μελισσόψωμου με μέσο όρο τα $79,1 \pm 16$ γραμμάρια υδρολυμένης πρωτεΐνης ανά 100 γραμμάρια συνολικής πρωτεΐνης στα δείγματα, ενώ η πεπτικότητα της γύρης αντιστοιχούσε σε μέσο όρο $63,9 \pm 16,2$ γραμμάρια υδρολυμένης πρωτεΐνης ανά 100 γραμμάρια συνολικής πρωτεΐνης. Σύμφωνα με τους Bakour *et al.* (2019), οι οποίοι ανέλυσαν ένα δείγμα μελισσόψωμου από το Μαρόκο, κατέληξαν ότι αυτό περιείχε υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και συγκεκριμένα, αυτή αντιστοιχούσε σε $19,96 \pm 0,08$ γραμμάρια πρωτεΐνης ανά 100 γραμμάρια δείγματος. Στην ίδια δημοσίευση, βρέθηκε ότι το μελισσόψωμο αποτελούταν από $74,82 \pm 0,04$ γραμμάρια υδατανθράκων ανά 100 γραμμάρια δείγματος, καθώς επίσης ότι περιείχε υψηλή ποσότητα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία αποτελούσαν το $64,7 \pm 0,4\%$ των λιπαρών οξέων που βρέθηκαν στο υλικό (Bakour *et al.*, 2019).

Σχετικά με την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, υπάρχει επίσης πληθώρα δημοσιεύσεων. Σύμφωνα με τους Sobral et al. (2017), οι βασικότερες φαινολικές ενώσεις που βρέθηκαν σε δείγματα μελισσόψωμου, με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας, περιλάμβαναν παράγωγα φλαβονοειδών, κυρίως κερκετίνης, καμφερόλης, μυρισετίνης, ισοραμνετίνης και ερμπασετίνης. Οι Isidorov et al. (2009) εντόπισαν ως κυριότερα φαινολικά συστατικά την καμφερόλη, το π-κουμαρικό οξύ, την ισοραμνετίνη, την κερκετίνη και τη ναρινγενίνη. Επιπλέον, οι τελευταίοι διαπίστωσαν ότι το μελισσόψωμο περιέχει μεγάλες ποσότητες ακόρεστων αλειφατικών οξέων (α-λινολενικά και λινολεϊκά οξέα), καθώς και υδατάνθρακες και αμινοξέα. Οι Bakour et al. (2019), βασιζόμενοι και στη δημοσίευση των Sobral et al. (2017), κατέληξαν στην ύπαρξη 13 ενώσεων, κυρίως φλαβονοειδών γλυκοζιτών με τους βασικότερους να είναι η κερκετίνη, η καμφερόλη, η ισοραμνετίνη και η μεθυλερμπασετίνη και τα παράγωγά τους.

Το μελισσόψωμο, εκτός από τα παραπάνω συστατικά, περιλαμβάνει και μεταλλικά στοιχεία, όπως ασβέστιο (Ca), μαγνήσιο (Mg), φώσφορο (P), σίδηρο (Fe), νάτριο (Na), κάλιο (K), αλουμίνιο (Al), μαγγάνιο (Mn), θείο (S) και χαλκό (Cu) (Ανδελκονιό et al., 2012). Σύμφωνα με τους Bakour et al. (2019), οι οποίοι ανέλυσαν τη χημική σύσταση ενός δείγματος μελισσόψωμου, διαπίστωσαν ότι την υψηλότερη συγκέντρωση κατείχε το κάλιο (338 ± 8 mg ανά 100 γραμμάρια μελισσόψωμου). Στη συνέχεια, ακολουθούσε ο φώσφορος με συγκέντρωση 251 ± 4 mg ανά 100 γραμμάρια, το ασβέστιο που κατείχε 198 ± 4 mg ανά 100 γραμμάρια, και το μαγνήσιο με συγκέντρωση 61 ± 2 mg ανά 100 γραμμάρια μελισσόψωμου.

1.6. Μικροβίωμα μελισσόψωμου

Όπως αναφέρθηκε, το μελισσόψωμο προκύπτει έπειτα από τη ζύμωση ενός μείγματος που αποτελείται από γύρη, νέκταρ και ένζυμα προερχόμενα από το σάλιο της μέλισσας. Μετά από την αποθήκευση αυτών στις κηρήθρες, η διαδικασία της ζύμωσης πραγματοποιείται με απαραίτητη την παρουσία βακτηρίων και μυκήτων. Η σημαντικότερη κατηγορία βακτηρίων είναι αυτή των βακτηρίων γαλακτικού οξέος (LAB). Τα συγκεκριμένα βακτήρια συχνά χρησιμεύουν ως προβιοτικά για τους ανθρώπους, καθώς συμβάλλουν στην επαναφορά της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του εντέρου (Asama et al., 2015). Είναι γνωστό ότι το μελισσόψωμο περιέχει συστατικά, όπως υδατάνθρακες και γαλακτικό οξύ, τα οποία επιτυγχάνουν μείωση της ανάπτυξης ορισμένων μικροοργανισμών, οι οποίοι συνήθως οδηγούν σε αλλοιώσεις τροφίμων, όπως η μούχλα. Συγκεκριμένα, τα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* εμποδίζουν την ανάπτυξη των *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, καθώς και ορισμένων Gram αρνητικών βακτηρίων, όπως της *Escherichia coli*, και των μυκήτων *Candida albicans* (Kieliszek et al., 2018). Μάλιστα, σύμφωνα με τους Asama et al. (2015), που ταυτοποίησαν τη μικροχλωρίδα σε μελισσοκομικά προϊόντα, τα είδη *Lactobacillus* spp. επικρατούσαν στο μελισσόψωμο (με ποσοστό 83,9%), με κυρίαρχο είδος το *Lactobacillus kunkeei*. Αντίστοιχα, οι Mattila et al. (2012), έπειτα από αλληλούχηση, διαπίστωσαν ότι τα είδη *Oenococcus* spp. και *Lactobacillus* spp. αποτελούσαν την πλειονότητα στο μελισσόψωμο, καλύπτοντας το 52%.

Μέχρι στιγμής, υπάρχουν δύο διαθέσιμες δημοσιεύσεις στη βιβλιογραφία, σύμφωνα με τις οποίες έχει χρησιμοποιηθεί η μέθοδος αλληλούχησης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing – NGS) για την εύρεση της δομής της βακτηριακής κοινότητας στο μελισσόψωμο. Στην εργασία των Donkersley et al. (2018), εκτός από αλληλούχηση NGS, χρησιμοποίησαν και τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή με αποδιατακτική βαθμίδωση (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis – DGGE), προκειμένου να συνδυαστούν τα αποτελέσματα και να επιτευχθεί σύγκριση των μεθόδων. Συγκεκριμένα, η

αλληλούχηση NGS χρησιμοποιήθηκε σε ένα υποσύνολο των δειγμάτων λόγω του υψηλού της κόστους, ενώ η ηλεκτροφόρηση DGGE εφαρμόστηκε σε περισσότερα δείγματα. Με βάση αυτές τις μεθόδους, προέκυψε η ύπαρξη ενός κοινού μικροβιώματος, δηλαδή βακτηρίων που εντοπίστηκαν σε όλα τα διαθέσιμα δείγματα. Αυτοί οι μικροοργανισμοί ανήκαν στις οικογένειες Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae, Pseudomonadaceae, Comamonadaceae, Oxalobacteraceae και Sphingomonadaceae. Επιπλέον, με βάση την αλληλούχηση, διαπιστώθηκε πως το μικρόβιο του μελισσόψωμου αποτελούνταν κυρίως από είδη των γενών *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Lactobacillus*, *Arsenophonus* και *Erwinia*. Μάλιστα, τα *Acinetobacter* και *Lactobacillus* επιβεβαιώθηκαν ως τα πιο κοινά γένη και μέσω της ηλεκτροφόρησης DGGE. Συνολικά, τα περισσότερα από τα βακτήρια που εντοπίστηκαν, ανήκαν σε 5 φύλα και συγκεκριμένα, στα Bacteroidetes, Firmicutes, Alpha-proteobacteria, Beta-proteobacteria και Gamma-proteobacteria. Ο ρόλος και ο λόγος παρουσίας του κάθε βακτηριακού είδους στο μελισσόψωμο ποικίλλει. Για παράδειγμα, άλλα βακτήρια έχουν βρεθεί επίσης στο μικρόβιομα του εντέρου των μελισσών, ενώ άλλα διαθέτουν αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι παθογόνων (Donkersley et al., 2018).

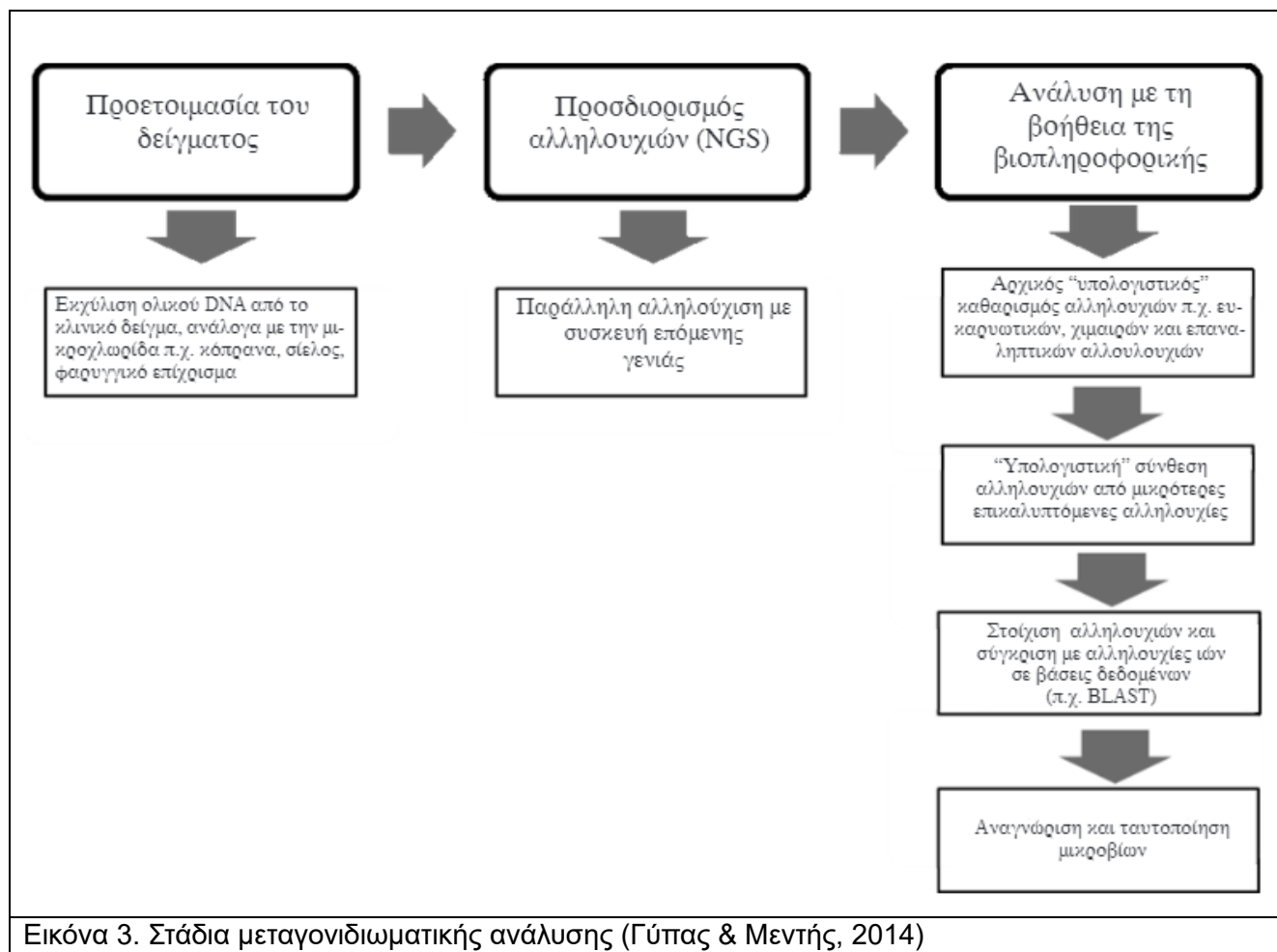
Η επόμενη δημοσίευση, η οποία βασίστηκε στην αλληλούχηση NGS, ήταν αυτή των Disayathanoowat et al. (2020), όπου η αλληλούχηση συνδυάστηκε με την κλασική μέθοδο καλλιέργειας. Μάλιστα, διερεύνησαν το μελισσόψωμο σε δύο διαφορετικά είδη μέλισσας, τα *Apis mellifera* και *Apis cerana*. Στα αποτελέσματά τους, τα πρωτεοβακτήρια βρέθηκαν ως το πιο άφθονο φύλο μεταξύ των δειγμάτων γύρης και στις δύο μέλισσες, ενώ ακολουθούσε το φύλο των Firmicutes. Επιπλέον, τα γένη τα οποία συναντήθηκαν σε όλα τα δείγματα, περιλάμβαναν αυτά των *Escherichia-Shiga*, *Pseudomonas*, *Buttiauxella*, *Pantoea*, *Bifidobacterium*, *Gilliamella* και *Snodgrassella*. Στα δύο πρώτα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση κατά τη μετάβαση της γύρης στο μελισσόψωμο. Όσον αφορά στους μύκητες, τα φύλα που βρέθηκαν περισσότερο ήταν αυτά των Ascomycota και των Basidiomycota, ενώ το γένος που κυριάρχησε ήταν αυτό του *Cladosporium*. Επιπλέον, η σχετική αφθονία των μυκήτων παρέμεινε κατά βάση σταθερή σε όλα τα δείγματα (Disayathanoowat et al., 2020).

Επιπλέον, άλλο ένα σημαντικό πεδίο κατά τη διερεύνηση του μικροβιώματος του μελισσόψωμου είναι και η συσχέτισή του με το μικρόβιομα του εντέρου της μέλισσας, καθώς έχει θεωρηθεί πως επηρεάζεται από αυτό σε ένα βαθμό. Βέβαια, η επιρροή του μικροβιώματος του εντέρου της μέλισσας σε αυτό του μελισσόψωμου ίσως να είναι μικρή, λαμβάνοντας υπόψη πως τα κυρίαρχα βακτήρια και στις δύο περιπτώσεις έχουν βρεθεί και σε άνθη ή σε νέκταρ, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει οριζόντια μεταφορά (Anderson et al., 2013). Επίσης, σε άλλη εργασία έχει βρεθεί ότι μόλις 10% των βακτηρίων του μελισσόψωμου εντοπίστηκαν τόσο σε αυτό όσο και στο έντερο της μέλισσας (Mattila et al., 2012).

1.7. Μεταγονιδιωματική ανάλυση

Η μεταγονιδιωματική αφορά τη γενωμική ανάλυση ενός πληθυσμού μικροοργανισμών και αναφέρθηκε και περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Handelsman et al. το 1998. Πρόκειται για ένα χρήσιμο εργαλείο που έχει ανοίξει νέους ορίζοντες στη βιοτεχνολογική ανάπτυξη, δεδομένου ότι η πλειοψηφία των μικροοργανισμών είναι δύσκολο να καλλιεργηθούν. Για αυτό το λόγο, έχει οδηγήσει στην ανακάλυψη ορισμένων που δε θα ήταν εφικτό να βρεθούν με τις κλασικές μεθόδους καλλιέργειας (Bashir et al., 2014). Έτσι, η μεταγονιδιωματική χρησιμοποιείται συχνά για τη διερεύνηση του μικροβιώματος σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα. Όμως, εκτός από τη δυνατότητα ταυτοποίησης των ειδών σε μια κοινότητα, παρέχει και τη δυνατότητα εύρεσης των μεταβολικών δραστηριοτήτων και των ρόλων των μικροβίων σε ένα δείγμα (Ghosh et al., 2019).

Η μεταγονιδιωματική ανάλυση βασίζεται στη μαζική αλληλούχηση, κατά την οποία αρχικά πραγματοποιείται απομόνωση του γενετικού υλικού και ακολουθεί τυχαία τμηματοποίησή του και αλληλούχηση επόμενης γενιάς (NGS). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η βιοπληροφορική ανάλυση με χρήση των κατάλληλων λογισμικών και εργαλείων (Γύπας και Μεντής, 2014) (Εικόνα 3. Στάδια μεταγονιδιωματικής ανάλυσης (Γύπας & Μεντής, 2014)Εικόνα 3).



Για την ανάλυση της ποικιλότητας σε ένα δείγμα, γίνεται ενίσχυση συγκεκριμένων γονιδίων, όπως του 16S rRNA και του ITS. Συγκεκριμένα, η αλληλούχηση του 16S rRNA βασίζεται στις μεταβλητές του περιοχές (V1-V9) και χρησιμοποιείται για την ομαδοποίηση βακτηρίων σε ξεχωριστές λειτουργικές ταξινομικές μονάδες με βάση το βαθμό στον οποίο ταυτίζονται. Επιπλέον, μπορεί να εφαρμοστεί σε διάφορα περιβαλλοντικά δείγματα. Όσον αφορά στην ενδομεταγραφόμενη περιοχή ITS, αυτή χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση της ποικιλότητας των μυκήτων σε περιβαλλοντικά δείγματα και χαρακτηρίζεται από υψηλή παραλλακτικότητα στην αλληλουχία (Ghosh et al., 2019).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του DNA από το μελισσόψωμο, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα, τα οποία αναλύονται παρακάτω.

2.1.1. Βασισμένη στη βιβλιογραφία (Mahuku, 2004)

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο απομόνωσης βασίστηκε στη βιβλιογραφία (Mahuku, 2004), όπου αναλύθηκαν τα βήματα για την απομόνωση DNA από μικροοργανισμούς και φυτά. Πριν την πειραματική διαδικασία, ήταν απαραίτητη η δημιουργία των διαλυμάτων που χρειάστηκαν. Συγκεκριμένα, χρειάστηκαν: TES extraction buffer (που περιείχε 0,2 M Tris-HCl [pH 8], 10 mM EDTA [pH 8], 0,5 M NaCl, 1% SDS), πρωτεΐνάση K, οξικό αμμώνιο (7,5 M ammonium acetate), ισοπροπανόλη, αιθανόλη και TE buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8], 1 mM EDTA).

Αρχικά, ζυγίστηκε ποσότητα 150 mg από το δείγμα μελισσόψωμου, το οποίο μεταφέρθηκε σε σωληνάριο Eppendorf των 1,5 ml, όπου και έγινε προσθήκη 300 μl από το TES extraction buffer. Μετά από αναμονή 2 λεπτών για να διαβραχεί το υλικό, έγινε καλή ανάδευση (vortex) του δείγματος για 30 δευτερόλεπτα. Έπειτα, προστέθηκαν επιπλέον 200 μl από το TES buffer που να περιέχει πρωτεΐνάση K (με τελική συγκέντρωση 50 μg/ml). Μετά από καλή ανάδευση, το δείγμα τοποθετήθηκε για επώαση σε υδατόλουτρο στους 65°C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 250 μl (μισός όγκος) από το οξικό αμμώνιο ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) και μετά από ανάδευση του δείγματος, αυτό τοποθετήθηκε για επώαση στον πάγο για 10 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 20800 g για 15 λεπτά. Το καθαρό υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο, όπου και έγινε προσθήκη ίσου όγκου παγωμένης ισοπροπανόλης. Ακολούθησε επώαση στους -20°C για 1-2 ώρες και φυγοκέντρηση στα 20800 g για 10 λεπτά, ώστε να κατακρημνιστεί το DNA. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε πλήρως, ενώ το ίζημα ξεπλύθηκε με 800 μl 70% παγωμένης αιθανόλης και στη συνέχεια, το σωληνάριο αφέθηκε γυρισμένο ανάποδα πάνω σε καθαρό χαρτί, ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη. Στη συνέχεια, έγινε έκλυση του DNA από το ίζημα με δύο διαδοχικές πλύσεις με 250 μl από το TE buffer, αποφεύγοντας κάθε φορά τη συλλογή πολυσακχαριτών από το ίζημα με φυγοκέντρηση. Το διάλυμα με το DNA μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο, όπου επαναλήφθηκαν τα παραπάνω βήματα (από την προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης μέχρι την πλύση με αιθανόλη) για τη συλλογή του DNA. Το ίζημα του απομονωμένου DNA στο τελευταίο στάδιο διαλύθηκε σε 100 μl νερό και αποθηκεύτηκε στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

2.1.2. Με χρήση του kit NucleoSpin Food από Macherey-Nagel

Για την απομόνωση του DNA με τη χρήση του kit NucleoSpin Food της εταιρείας Macherey-Nagel, ακολουθήθηκαν κατά βάση τα βήματα που περιγράφονται σε αυτό. Αρχικά, ζυγίστηκε ποσότητα 0,2 γραμμαρίων από το κάθε δείγμα μελισσόψωμου, αφού είχε προηγηθεί λειοτρίβηση του υλικού σε γουδί. Αυτό αφορούσε την ομογενοποίηση που αναφέρεται στο kit, ώστε να γίνει καλύτερη επεξεργασία του υλικού στα επόμενα βήματα. Η ποσότητα που ζυγίστηκε για το καθένα, μεταφέρθηκε σε σωληνάρια Eppendorf των 1,5 ml, όπου και έγινε προσθήκη 550 μl από το lysis buffer CF, το οποίο προηγουμένως είχε θερμανθεί στους 65°C, σύμφωνα με τις οδηγίες. Μετά από σύντομη ανάδευση, προστέθηκαν 10 μl από την πρωτεΐνάση K. Ακολούθησε καλή ανάδευση των δειγμάτων και επώασή τους σε υδατόλουτρο στους 65°C για 30 λεπτά, προκειμένου να γίνει η λύση των κυτταρινών και η διάσπαση των πρωτεϊνών.

Μετά την επώαση, έγινε φυγοκέντρηση των σωληνάρων στα 14000g για 10 λεπτά. Ακολούθησε η μεταφορά 300 μl από το καθαρό υπερκείμενο κάθε δείγματος σε ένα καινούριο σωληνάριο. Στη συνέχεια, σε αυτό έγινε προσθήκη 300 μl από το Buffer C4 και 200 μl από την αιθανόλη. Μετά από καλή ανάδευση, μεταφέρθηκαν 750 μl από το κάθε μείγμα σε ένα σωληνάριο φυγοκέντρησης που περιέχει τη στήλη Nucleospin και παρέχεται από την εταιρεία, οπότε και έγινε φυγοκέντρηση στα 10000g για 1 λεπτό.

Για τις πλύσεις που ακολούθησαν, προστέθηκαν 400 µl από το Buffer CQW στη στήλη και έγινε φυγοκέντρωση στα 10000g για 1 λεπτό. Αντίστοιχα, στη συνέχεια προστέθηκαν 700 µl από το Buffer C5 στη στήλη και έγινε φυγοκέντρωση στα 10000g για 1 λεπτό. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, έγινε και πάλι προσθήκη 200 µl από το Buffer C5 για την τελική πλύση και ακολούθησε η φυγοκέντρωση στα 16000g για 2 λεπτά για την καλή απομάκρυνσή του.

Στο τελευταίο στάδιο, έγινε η έκλυση του DNA με προσθήκη 100 µl Elution Buffer CE, το οποίο είχε προηγουμένως θερμανθεί στους 70°C. Μετά από αναμονή τουλάχιστον 5 λεπτών, προκειμένου να διαβραχεί η μεμβράνη της στήλης και το DNA που έχει παραμείνει σε αυτήν, έγινε η φυγοκέντρωση στα 16000g για 1 λεπτό. Το DNA από κάθε δείγμα μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο και αποθηκεύτηκε στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

2.2. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των δειγμάτων DNA με χρήση του Nanodrop

Ο υπολογισμός τόσο της συγκέντρωσης όσο και της καθαρότητας των απομονωμένων δειγμάτων DNA θεωρήθηκε απαραίτητος, προτού εφαρμοστεί η μέθοδος της PCR, καθώς και πριν οδηγηθούν τα δείγματα σε αλληλούχηση νέας γενιάς στα επόμενα στάδια. Προκειμένου να βρεθούν η συγκέντρωση και η καθαρότητα των δειγμάτων DNA που απομονώθηκαν με τις παραπάνω μεθόδους, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Nanodrop. Για τη μέτρησή τους, τοποθετήθηκαν με τη χρήση πιπέτας 2 µl από το κάθε δείγμα στην ειδική θέση της συσκευής για τη μέτρηση, με βάση τις οδηγίες. Συγκεκριμένα, αρχικά ήταν απαραίτητη η εφαρμογή ενός δείγματος που θα χρησίμευε ως τυφλό (νερό) για το μηδενισμό, ενώ ενδιάμεσα των εκάστοτε μετρήσεων ήταν απαραίτητο το ξέπλυμα του σημείου όπου τοποθετούνταν τα 2 µl και πάλι με τη χρήση του τυφλού δείγματος.

2.3. PCR και ηλεκτροφόρηση

2.3.1. PCR στο 16S rRNA

Προκειμένου να διαπιστωθεί η επιτυχία της απομόνωσης βακτηριακού DNA, εφαρμόστηκε στη συνέχεια η τεχνική της PCR για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές από τη διαθέσιμη βιβλιογραφία, και συγκεκριμένα οι εκκινητές 27F με αλληλουχία 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (Lane *et al.*, 1991) και 1492R με αλληλουχία 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3' (Turner *et al.*, 1999). Αρχικά, προετοιμάστηκε το μείγμα (mix) της αντίδρασης, το οποίο αποτελούνταν από 47µl για το κάθε δείγμα. Το μείγμα αυτό σε τελική συγκέντρωση περιείχε: dNTPs 1 mM, Buffer 1X, MgCl₂ 2 mM, 27F/1492R 25 pmol και 2 Units από το ένζυμο Fast Gene Taq DNA πολυμεράση. Το υπόλοιπο μείγμα συμπληρώθηκε με δις απεσταγμένο νερό ddH₂O μέχρι τα 47µl. Η αντίδραση της PCR έγινε σε μικροσωληνάρια με τελικό όγκο 50µl, οπότε σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 3µl DNA από το εκάστοτε δείγμα. Μεταξύ των δειγμάτων που προέρχονταν από μελισσόψωμο, χρησιμοποιήθηκαν και ένας θετικός μάρτυρας μυκοπλάσματος, καθώς και ένας αρνητικός μάρτυρας (νερό αντί για DNA). Στη συνέχεια, τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή με συνθήκες που περιλάμβαναν την αρχική αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 3 λεπτά, 40 κύκλους που αποτελούνταν από τρία στάδια, την αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, τον υβριδισμό των εκκινητών στους 50°C για 30 δευτερόλεπτα και την επιμήκυνση από την πολυμεράση στους 72°C για 2 λεπτά, και την τελική επιμήκυνση στους 72°C για 2 λεπτά.

2.3.2. Ηλεκτροφόρηση της PCR

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης PCR, ήταν απαραίτητη η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, ώστε να οπτικοποιηθεί το αποτέλεσμα και να διαπιστωθεί αν πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων. Για αυτό το λόγο, δημιουργήθηκε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%, υπολογίζοντας και ζυγίζοντας την κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης που χρειάστηκε ανάλογα με την ποσότητα διαλύματος ηλεκτροφόρησης TBE (Tris/Borate Acid/EDTA). Ενδεικτικά, στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκαν 40 ml TBE με βάση το μέγεθος του δοχείου (tray) για την προετοιμασία του πηκτώματος, χρειάστηκαν αντίστοιχα 0,6 γραμμάρια αγαρόζης που διαλύθηκαν μέσω θέρμανσης σε φούρνο μικροκυμάτων, μέχρις ότου ρευστοποιηθεί πλήρως η αγαρόζη και γίνει διαυγές το διάλυμα. Αφότου κρύωσε ελάχιστα το διάλυμα, προστέθηκε το βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο συνδέεται με το DNA και φθορίζει έπειτα από την έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία. Ενδεικτικά, στο προηγούμενο παράδειγμα, όπου χρησιμοποιήθηκαν 40 ml διαλύματος, προστέθηκαν 40 μl βρωμιούχου αιθιδίου. Έπειτα, το ρευστό διάλυμα αγαρόζης μεταφέρθηκε στο tray, αφού προηγουμένως τοποθετήθηκε σε αυτό το ειδικό χτενάκι, ώστε να δημιουργηθούν οι θέσεις υποδοχής των δειγμάτων (πηγαδάκια). Το πήκτωμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 20-30 λεπτά πριν τη συνέχιση της διαδικασίας, ώστε να πήξει.

Μετά την πήξη, το τζελ αγαρόζης τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναμείχθηκαν με το διάλυμα της χρωστικής (μπλε της βρωμοφαινόλης και γλυκερόλη) και «φορτώθηκαν» σε διαφορετικές θέσεις της πηκτής αγαρόζης. Επιπλέον, στην πρώτη θέση «φορτώθηκε» και ο δείκτης μοριακού βάρους, ώστε να είναι εμφανές το μέγεθος των δειγμάτων. Στο πήκτωμα εφαρμόστηκε ηλεκτρικό πεδίο (τάση 120 V), ώστε το γενετικό υλικό να μεταφερθεί από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο, καθώς είναι αρνητικά φορτισμένο. Τέλος, για την οπτικοποίηση της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή τοποθετήθηκε σε υπεριώδη (UV) ακτινοβολία. Τα αποτελέσματα φωτογραφήθηκαν και αποθηκεύτηκαν για περαιτέρω ανάλυση.

2.4. Αλληλούχηση και βιοπληροφορική ανάλυση

Σε ορισμένα δείγματα μελισσόψωμου (συνολικά 9 δείγματα, Πίνακας 1), τα οποία αναλύονται και στα αποτελέσματα (Πίνακας 3), πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA με τη χρήση του kit NucleoSpin Food από Macherey-Nagel, το οποίο και επιλέχθηκε με βάση τα αποτελέσματα. Τα δείγματα DNA στάλθηκαν για αλληλούχηση NGS στην εταιρεία MacroGen (Europe). Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η κατασκευή βιβλιοθηκών για βακτήρια (δείγματα 1-5) και για μύκητες (δείγματα 6-9), ενώ στη συνέχεια έγινε η αλληλούχηση μέσω Illumina. Αναλυτικότερα, σύμφωνα με την εταιρεία, πραγματοποιήθηκε θραύση του DNA, ενώ ακολούθησε η σύνδεση των προσαρμοστών (adapters) στα άκρα κάθε τμήματος. Έπειτα, τα τμήματα που προέκυψαν, ενισχύθηκαν μέσω PCR γέφυρας. Τα τμήματα DNA τοποθετήθηκαν σε μια επιφάνεια στην οποία υπήρχαν ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές PCR) συμπληρωματικά προς τους προσαρμοστές που βρίσκονταν ήδη στα άκρα των τμημάτων DNA. Μετά την ενίσχυσή τους, οδηγήθηκαν για αλληλούχηση, από την οποία προέκυψαν τα ακατέργαστα/πρωτογενή δεδομένα (raw data).

Πίνακας 1. Τα δείγματα του μελισσόψωμου και οι χρόνοι ωρίμανσης

Δείγματα	Χρονική στιγμή	Χρόνος ωρίμανσης
S1 και S6	Γύρη T0	Γύρη
S2 και S7	Μελισσόψωμο T1	Μελισσόψωμο 1 ημέρας
S3 και S8	Μελισσόψωμο T2	Μελισσόψωμο 11 ημερών
S4 και S9	Μελισσόψωμο T3	Μελισσόψωμο 17 ημερών
S5	Μελισσόψωμο T4	Μελισσόψωμο 41 ημερών

Στη συνέχεια, ακολούθησε η βιοπληροφορική ανάλυση των ακατέργαστων δεδομένων, η οποία πραγματοποιήθηκε από το εργαστήριο Βιοπληροφορικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Αρχικά, τα ακατέργαστα δεδομένα σε μορφή αρχείων FASTQ χρησιμοποιήθηκαν μέσω του Trimmomatic, ώστε να αφαιρεθούν τα άκρα-προσαρμοστές. Έπειτα, χρησιμοποιήθηκε η πλατφόρμα QIIME2 για την περαιτέρω ανάλυση. Συγκεκριμένα, η αφαίρεση του θορύβου και το φιλτράρισμα των χιμαιρικών μορίων πραγματοποιήθηκαν μέσω του DADA2, όπου οι βακτηριακές ακολουθίες περικόπηκαν (trimmed) στα 290 και 220 νουκλεοτίδια για τα forward και reverse reads αντίστοιχα, ενώ οι μυκητιακές ακολουθίες στα 290 και 240 νουκλεοτίδια αντίστοιχα. Το φιλτράρισμα των χιμαιρικών μορίων βασίστηκε στη μέθοδο της συναίνεσης (consensus), ενώ η ανάλυση ποικιλότητας (diversity analysis) πραγματοποιήθηκε με βάθος 7000 για τα βακτήρια (περιοχή 16S) και 40000 για τους μύκητες (περιοχή ITS) ως κατώφλι (cutoff). Η ομαδοποίηση (clustering) των διαφορετικών ταξινομικών μονάδων (Operational Taxonomic Units – OTUs) βασίστηκε σε 97% ταυτοποίηση της ακολουθίας (sequence identity) ως κατώφλι. Η ταξινομική κατάταξη πραγματοποιήθηκε μέσω της βάσης δεδομένων Silva για τη περιοχή 16S και άρα για βακτήρια, ενώ στην περίπτωση της περιοχής ITS και των μυκήτων χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων UNITE. Ως κατώφλι για το διαχωρισμό εφαρμόστηκαν το 97% για την στοίχιση των νουκλεοτιδίων και το 80% για την κάλυψη της ακολουθίας. Τέλος, μέσω της πλατφόρμας QIIME2, έγινε ο υπολογισμός των διαφόρων δεικτών α- και β-ποικιλότητας, που παρουσιάζονται στα αποτελέσματα.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Εύρεση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των δειγμάτων DNA με χρήση του Nanodrop

Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, προκειμένου να υπολογιστεί τόσο η συγκέντρωση όσο και η καθαρότητα των απομονωμένων δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Nanodrop. Η συγκεκριμένη συσκευή μετράει την οπτική απορρόφηση (O.D.) του DNA στα 260 nm και αυτήν των πρωτεϊνών στα 280 nm, υπολογίζοντας με αυτόν τον τρόπο την καθαρότητα του δείγματος DNA που είναι υπό διερεύνηση, καθώς η καθαρότητα αντιστοιχεί στο λόγο $O.D._{260nm}/O.D._{280nm}$. Επιπλέον, είναι θεμιτό η καθαρότητα να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερη με ελάχιστο το 1,8, ειδάλλως να το πλησιάζει κατά το μέγιστο δυνατό.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2), φαίνονται οι μετρήσεις που έγιναν στο Nanodrop για ένα δείγμα μελισσόψωμου, από το οποίο πραγματοποιήθηκε απομόνωση του γενετικού υλικού με τους διαφορετικούς τρόπους, προκειμένου να βρεθεί η καλύτερη μέθοδος. Για το κάθε πρωτόκολλο, έγιναν δύο μετρήσεις, ώστε να περιοριστεί η πιθανότητα λανθασμένης δειγματοληψίας, πριν τη μέτρηση.

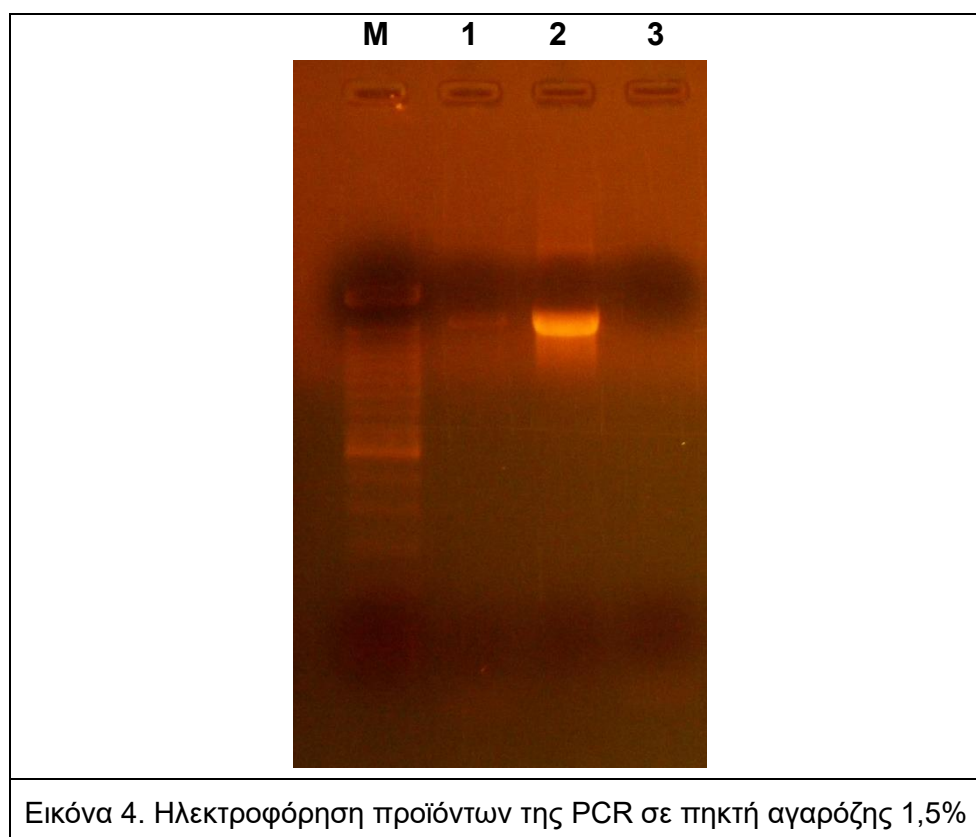
Πίνακας 2. Μετρήσεις Nanodrop

Πρωτόκολλο απομόνωσης DNA	Μέτρηση	Συγκέντρωση (ng/μl)	Οπτική απορρόφηση (O.D.)
NucleoSpin Food kit	Πρώτη	28,4	1,7
	Δεύτερη	29,8	1,78
Mahuku (2004)	Πρώτη	12,1	1,38
	Δεύτερη	11,5	1,49

Όπως παρατηρείται, με τη χρήση του kit NucleoSpin Food της Macherey-Nagel επετεύχθη μεγαλύτερη συγκέντρωση γενετικού υλικού στο δείγμα, καθώς επίσης καλύτερη καθαρότητα που άγγιξε το 1,8. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, η συγκεκριμένη μέθοδος επιλέχθηκε με τα διαθέσιμα δεδομένα ως η καλύτερη, για να απομονωθεί το DNA από περισσότερα δείγματα μελισσόψωμου και έτσι, να σταλούν για αλληλούχηση για τη διερεύνηση του μικροβιώματος.

3.2. Αποτελέσματα PCR

Για τη διερεύνηση της επιτυχίας απομόνωσης του DNA βακτηρίων, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που αναφέρθηκαν στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι» για την ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA. Το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος αντιστοιχεί σε τμήμα μήκους 1400-1500 bp.



Στην παραπάνω εικόνα (Εικόνα 4), παρουσιάζεται ενδεικτικά το αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR που περιγράφηκε παραπάνω για ένα δείγμα από μελισσόψωμο, όπου M: ο δείκτης μοριακού βάρους

(ladder) 100 bp, 1: το δείγμα από ελληνικό μελισσόψωμο, 2: ο θετικός μάρτυρας, 3: ο αρνητικός μάρτυρας (νερό αντί για δείγμα DNA). Όπως παρατηρείται στην εικόνα, ο αρνητικός μάρτυρας είναι καθαρός, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι δεν υπήρξε κάποια επιμόλυνση κατά την ετοιμασία της αντίδρασης PCR και επομένως, έχει γίνει όπως έπρεπε. Επιπλέον, καθίσταται φανερό το προϊόν ενίσχυσης στο θετικό μάρτυρα, όπως επίσης ότι δεν υπήρξαν καθόλου παραπροϊόντα, τα οποία υποδεικνύουν και πάλι πως πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η αντίδραση στο σύνολο των δειγμάτων.

Όσον αφορά στο δείγμα που προέρχεται από μελισσόψωμο, παρατηρήθηκε ενίσχυση ενός τμήματος αναμενόμενου μεγέθους, καθώς αντιστοιχεί στο ίδιο ύψος με το προϊόν που προέκυψε στο θετικό μάρτυρα που χρησιμοποιήθηκε. Παρόλα αυτά, ο φθορισμός της ζώνης που αντιστοιχεί στο δείγμα μελισσόψωμου είναι φανερά πιο αχνός σε σύγκριση με αυτόν του θετικού μάρτυρα, γεγονός που σημαίνει ότι ίσως να ήταν μικρή η συγκέντρωση του DNA που απομονώθηκε. Μπορεί όμως, να οφείλεται στο συγκεκριμένο δείγμα και στην προέλευση του μελισσόψωμου. Από την άλλη, ίσως να ήταν μικρή η ποσότητα του DNA που χρησιμοποιήθηκε για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Η ζώνη αυτή υποδηλώνει την ύπαρξη βακτηριακού DNA, για να προχωρήσουμε σε αλληλούχηση.

3.3. Αποτελέσματα αλληλούχησης και βιοπληροφορικής ανάλυσης

Στην ενότητα «Υλικά και μέθοδοι» περιγράφηκε η διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά τη βιοπληροφορική ανάλυση. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3) περιλαμβάνονται το σύνολο των δειγμάτων και η περιγραφή τους.

Πίνακας 3. Περιγραφή των δειγμάτων με βάση την ανάλυσή τους

Sample	Sample description	Sequence type	Reads raw	Reads trimmed	filtered	denoised	merged	non-chimeric
S1	Pollen	16S	124720	122018	72602	72379	71788	10537
S2	Beebread_T1	16S	118044	115435	70506	70299	69110	10871
S3	Beebread_T2	16S	133896	130782	81815	80873	77463	11391
S4	Beebread_T3	16S	134656	132207	83099	82265	78867	9048
S5	Beebread_T4	16S	105227	102125	60677	60334	59154	7353
S6	Pollen	ITS	186764	75891	42365	42269	40914	40486
S7	Beebread_T1	ITS	178273	134286	79456	79153	74882	73303
S8	Beebread_T2	ITS	194546	137775	85530	85284	80938	79837
S9	Beebread_T3	ITS	196838	130956	81686	81470	74888	74056

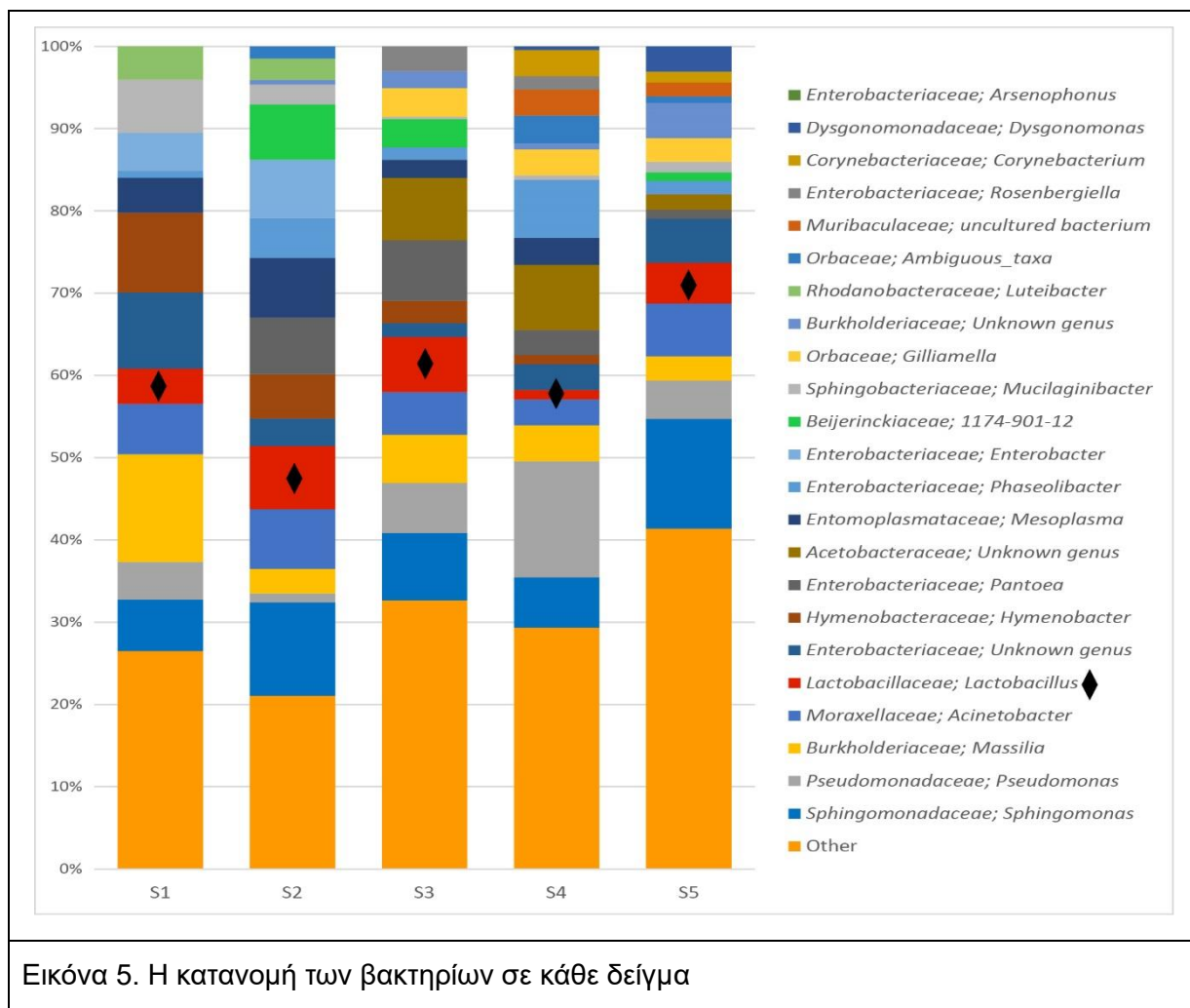
Συγκεκριμένα, τα δείγματα χωρίστηκαν στη γύρη και στο μελισσόψωμο με βάση το χρόνο ωρίμανσής του. Επιπλέον, η ανάλυση βασίστηκε στην περιοχή V3-V4 του γονιδίου 16S για τα βακτήρια και στην περιοχή ITS για τους μύκητες. Στην τέταρτη στήλη του πίνακα παρατηρείται ο αριθμός των ακατέργαστων “reads” που προέκυψαν από την αλληλούχηση, ενώ στην πέμπτη στήλη ο αριθμός αυτών μετά την αφαίρεση των άκρων. Στις επόμενες στήλες φαίνεται ο αριθμός των reads που προέκυψε σε κάθε διεργασία του λογισμικού DADA2. Πιο συγκεκριμένα, στην έκτη στήλη φαίνεται ο αριθμός αυτών μετά το φιλτράρισμα, ενώ στις αμέσως επόμενες στήλες παρατηρούνται ο αριθμός αυτός μετά την αφαίρεση του θορύβου και έπειτα από τη συγχώνευση των forward και των reverse reads. Τέλος, ακολουθεί ο αριθμός τους μετά την αφαίρεση των χιμαιρικών μορίων για το κάθε δείγμα, ο οποίος και χρησιμοποιήθηκε για την ταξινομική κατάταξη του μικροβιώματος. Αυτές οι ακολουθίες οδήγησαν στην

εύρεση τόσο του γένους των βακτηρίων και των μυκήτων σε κάθε δείγμα, όσο και του ποσοστού που καταλαμβάνει κάθε γένος αυτών. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στους πίνακες Πίνακας 4 και Πίνακας 5.

Πίνακας 4. Το σύνολο των βακτηρίων σε επίπεδο γένους και η επί τοις εκατό αφθονία τους

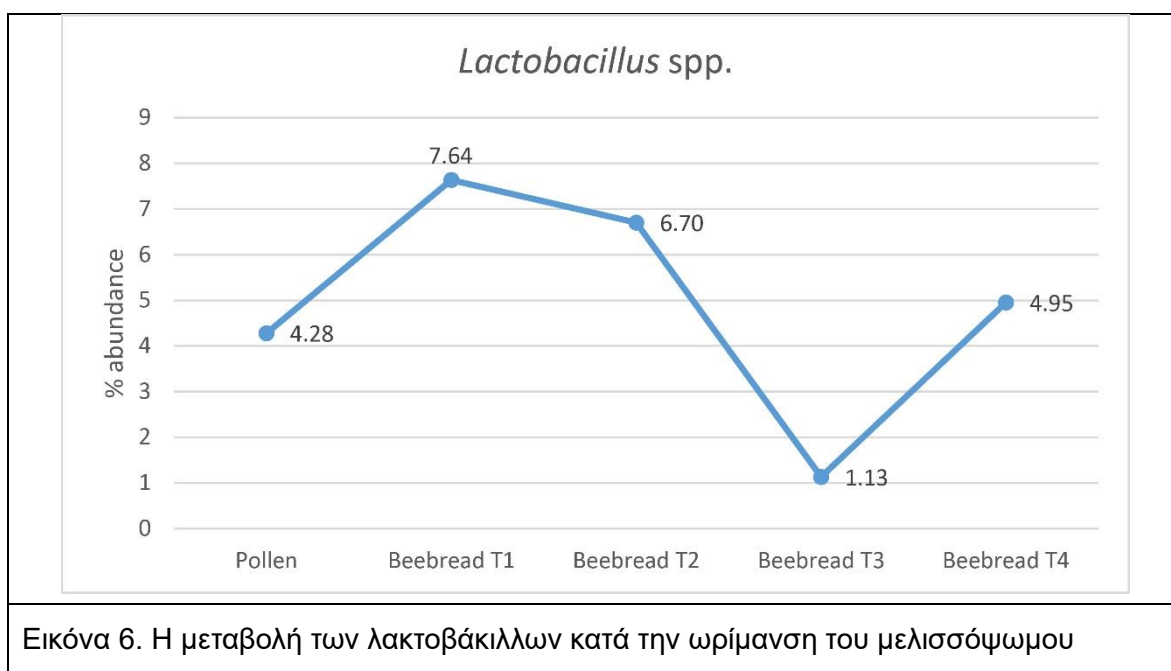
Bacterial genera	S1 %	S2 %	S3 %	S4 %	S5 %
Sphingomonadaceae; <i>Sphingomonas</i>	6,24	11,36	8,15	6,09	13,34
Pseudomonadaceae; <i>Pseudomonas</i>	4,62	1,12	6,10	14,14	4,68
Burkholderiaceae; <i>Massilia</i>	13,06	2,98	5,86	4,36	2,93
Moraxellaceae; <i>Acinetobacter</i>	6,13	7,26	5,19	3,16	6,42
Lactobacillaceae; <i>Lactobacillus</i>	4,28	7,64	6,70	1,13	4,95
Enterobacteriaceae; Unknown genus	9,25	3,35	1,69	3,10	5,36
Hymenobacteraceae; <i>Hymenobacter</i>	9,71	5,40	2,72	1,13	0,00
Enterobacteriaceae; <i>Pantoea</i>	0,00	6,89	7,37	3,04	1,10
Acetobacteraceae; Unknown genus	0,00	0,00	7,55	7,94	1,88
Entomoplasmataceae; <i>Mesoplasma</i>	4,28	7,26	2,23	3,28	0,00
Enterobacteriaceae; <i>Phaseolibacter</i>	0,81	4,84	1,51	7,04	1,60
Enterobacteriaceae; <i>Enterobacter</i>	4,62	7,08	0,00	0,00	0,00
Beijerinckiaceae; 1174-901-12	0,00	6,70	3,44	0,00	1,05
Sphingobacteriaceae; <i>Mucilaginibacter</i>	6,47	2,42	0,24	0,54	1,28
Orbaceae; <i>Gilliamella</i>	0,00	0,00	3,50	3,16	2,89
Burkholderiaceae; Unknown genus	0,00	0,56	2,05	0,72	4,26
Rhodanobacteraceae; <i>Luteibacter</i>	4,05	2,61	0,00	0,00	0,00
Orbaceae; Ambiguous_taxa	0,00	1,49	0,00	3,40	0,78
Muribaculaceae; uncultured bacterium	0,00	0,00	0,00	3,16	1,70
Enterobacteriaceae; <i>Rosenbergiella</i>	0,00	0,00	3,02	1,61	0,00
Corynebacteriaceae; <i>Corynebacterium</i>	0,00	0,00	0,00	3,22	1,33
Dysgonomonadaceae; <i>Dysgonomonas</i>	0,00	0,00	0,00	0,42	3,07
Other	26,47	21,04	32,67	29,36	41,36

Τα γένη βακτηρίων που βρέθηκαν με ποσοστό μεγαλύτερο του 3% σε τουλάχιστον ένα από τα 5 δείγματα φαίνονται στον Πίνακα 4. Η κατηγορία "Other" περιλαμβάνει τα γένη που δεν εντοπίστηκαν σε ποσοστό τουλάχιστον 3% σε κάποιο από τα δείγματα. Αυτά που δείχνουν ότι κυριαρχούν στο σύνολο των δειγμάτων είναι τα γένη *Sphingomonas*, *Pseudomonas* και *Massilia*. Σε σημαντικά επίπεδα εντοπίζονται και τα γένη *Acinetobacter*, *Lactobacillus*, *Hymenobacter*, *Pantoea*, *Mesoplasma*, *Phaseolibacter* και *Enterobacter*. Προκειμένου να καταστεί πιο φανερή η μικροβιακή διαδοχή μεταξύ των δειγμάτων κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, δημιουργήθηκε το διάγραμμα (Εικόνα 5). Σε αυτήν, παρατηρούνται οι μεταβολές που συμβαίνουν στη σχετική αφθονία των βακτηρίων όσο ωριμάζει το μελισσόψωμο.



Όσον αφορά στα επικρατέστερα γένη, η αφθονία του καθενός φαίνεται να μεταβάλλεται με διαφορετικό μοτίβο. Συγκεκριμένα, στο *Sphingomonas* αρχικά παρατηρείται αύξηση μετά την πρώτη ημέρα, ενώ ακολουθεί μείωση και στο τέλος αύξηση, ενώ στο *Pseudomonas* παρατηρείται ακριβώς αντίστροφο πρότυπο μεταβολής.

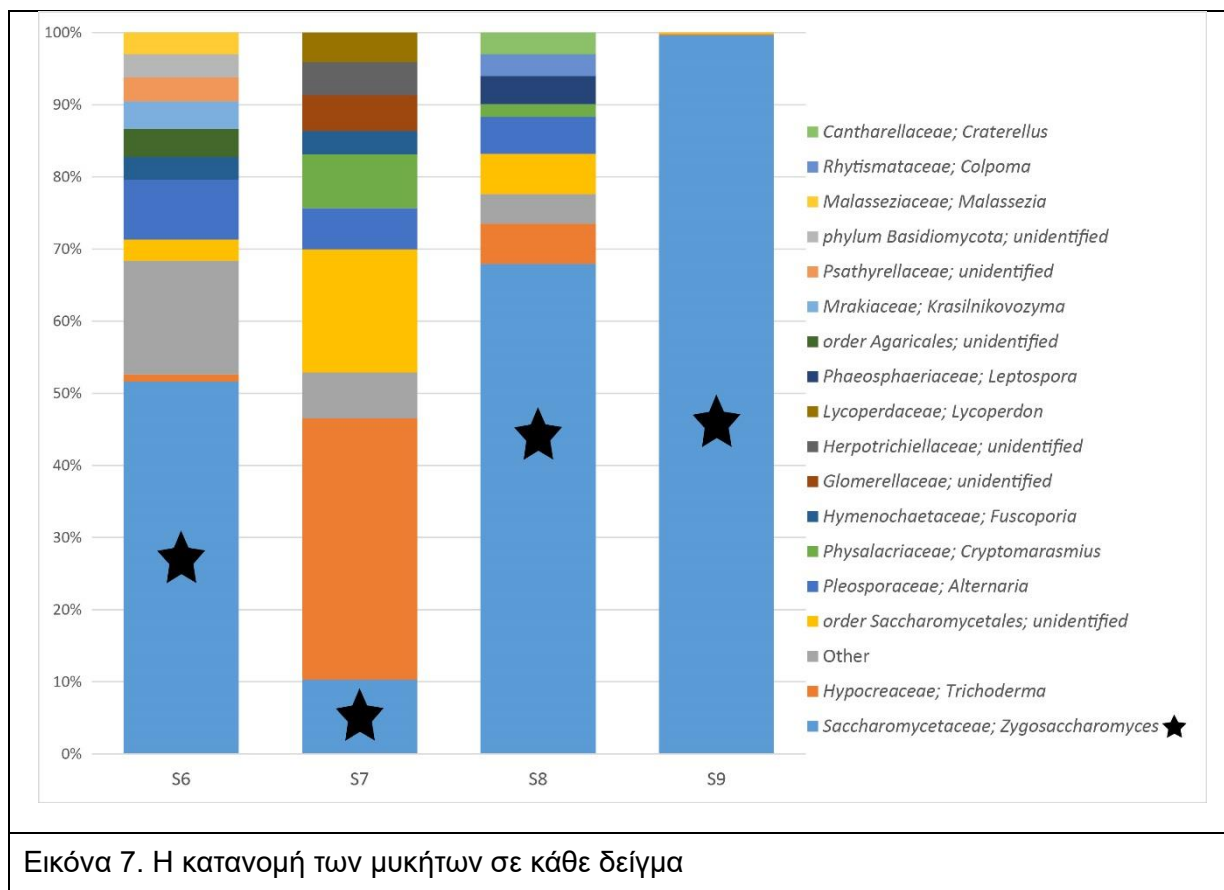
Στο σύνολο των βακτηρίων, μας ενδιαφέρει σημαντικά η αφθονία των λακτοβάκιλλων, δεδομένου ότι τα βακτήρια γαλακτικού οξέος διαδραματίζουν καίριο ρόλο στη γαλακτική ζύμωση. Το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 6) παρουσιάζει τον τρόπο με τον οποίο μεταβάλλονται οι λακτοβάκιλλοι μεταξύ των δειγμάτων. Παρατηρείται αύξηση από την πρώτη στη δεύτερη μέρα, ενώ ακολουθούν πτώση και αύξηση στο τέλος, μετά το πέρας των 41 ημερών. Η τελική αύξηση δεν είναι αναμενόμενη, καθώς η σχετική αφθονία θα έπρεπε να μειώνεται σε μεγάλο βαθμό προς το τελευταίο στάδιο, γνωρίζοντας ότι είναι αυξημένη πλέον η συσσώρευση γαλακτικού οξέος και μειωμένη η περιεκτικότητα σε νερό. Επομένως, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.



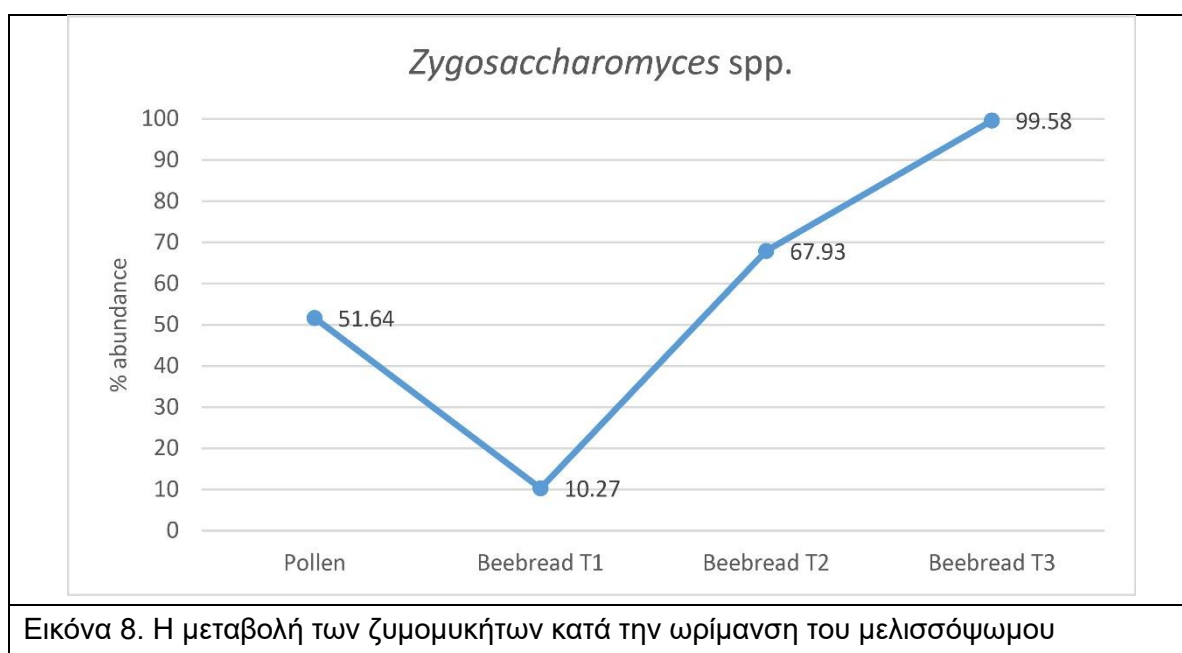
Η αντίστοιχη ανάλυση έχει πραγματοποιηθεί και για τους μύκητες και τα αποτελέσματα της ταξινόμησης φαίνονται στον Πίνακας 5. Όπως γίνεται φανερό, το γένος *Zygosaccharomyces* κυριαρχεί με υψηλό ποσοστό που ανέρχεται μέχρι και στο 99% του μυκητιακού μικροβιώματος στη χρονική στιγμή T3 (S9). Επιπλέον, εμφανίζονται ως επικρατή το γένος *Trichoderma*, όπως επίσης άγνωστα γένη της τάξης *Saccharomycetales*. Αυτά τα αποτελέσματα καθίστανται εμφανή και στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 7), όπου παρατηρείται η κατανομή των μυκήτων.

Πίνακας 5. Το σύνολο των μυκήτων σε επίπεδο γένους και η επί τοις εκατό αφθονία τους

Fungal genera	S6 %	S7 %	S8 %	S9 %
Saccharomycetaceae; <i>Zygosaccharomyces</i>	51,64	10,27	67,93	99,58
Pleosporaceae; <i>Alternaria</i>	8,32	5,67	5,12	0,00
Hypocreaceae; <i>Trichoderma</i>	1,00	36,23	5,57	0,13
order Saccharomycetales; unidentified	2,93	17,09	5,57	0,21
order Agaricales; unidentified	3,85	0,00	0,00	0,00
Mrakiaceae; <i>Krasilnikovozyma</i>	3,83	0,00	0,00	0,00
Hymenochaetaceae; <i>Fuscoporia</i>	3,16	3,19	0,00	0,00
Psathyrellaceae; unidentified	3,34	0,00	0,00	0,00
phylum Basidiomycota; unidentified	3,18	0,00	0,00	0,00
Malasseziaceae; <i>Malassezia</i>	3,01	0,00	0,00	0,00
Physalacriaceae; <i>Cryptomarasmius</i>	0,00	7,53	1,78	0,00
Glomerellaceae; unidentified	0,00	4,96	0,00	0,00
Herpotrichiellaceae; unidentified	0,00	4,61	0,00	0,00
Lycoperdaceae; <i>Lycoperdon</i>	0,00	4,07	0,00	0,00
Phaeosphaeriaceae; <i>Leptospora</i>	0,00	0,00	3,90	0,00
Rhytismataceae; <i>Colpoma</i>	0,00	0,00	3,01	0,00
Cantharellaceae; <i>Craterellus</i>	0,00	0,00	3,01	0,00
Other	15,74	6,38	4,12	0,09



Στην περίπτωση των μυκήτων μας ενδιαφέρει ιδιαίτερα η αφθονία των ζυμομυκήτων, γνωρίζοντας ότι συμμετέχουν στη διαδικασία της ζύμωσης. Στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 8) παρατηρείται ο τρόπος με τον οποίο εξελίσσονται οι ζυμομύκητες. Μετά από την αρχική μείωση, η σχετική αφθονία αυξάνεται, αγγίζοντας το μέγιστο. Αυτό υποδηλώνει ότι πιθανότατα εκτός από γαλακτική ζύμωση, λαμβάνει χώρα και αλκοολική ζύμωση στα δείγματα.



Ορισμένα από τα γένη βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα ανάλυση έχουν εντοπιστεί και σε αντίστοιχες δημοσιεύσεις. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση των Donkersley et al. (2018), βρέθηκαν επίσης τα γένη *Pseudomonas*, *Acinetobacter* και *Lactobacillus*, τα οποία κυριαρχούσαν στα δείγματα μελισσόψωμου, καθώς και τα *Massilia*, *Sphingomonas* και *Enterobacter*. Στη δημοσίευση των Disayathanoowat et al. (2020) εντοπίστηκαν τα γένη *Pseudomonas*, *Pantoea* και *Acinetobacter*.

Αναλυτικότερα, σχετικά με τον τρόπο που πιθανώς προκύπτει η ποικιλότητα στο μικροβίωμα του μελισσόψωμου, τα γένη *Acinetobacter*, *Lactobacillus* και *Enterobacter* έχουν συνδεθεί με την πεπτική οδό της μέλισσας με συνδυασμό μεθόδων. Επιπλέον, τα γένη *Lactobacillus* και *Enterobacter* έχουν βρεθεί και σε περιοχές των ανθέων. Τα γένη *Gilliamella*, *Massilia* και *Sphingomonas* έχουν εντοπιστεί στη μικροχλωρίδα του εντέρου της μέλισσας, δεδομένου ότι δεν έχει βρεθεί κάποιος ρόλος τους (Donkersley et al., 2018). Επιπρόσθετα, τα *Pseudomonas* και *Pantoea* σχετίζονται με τμήματα των φυτών, όπως τα φρούτα, τα πέταλα των ανθέων και τα φύλλα. Ορισμένα *Acinetobacter* spp. έχουν βρεθεί ως κυρίαρχα στο νέκταρ φυτών, ενώ έχουν συσχετιστεί και με την εντερική οδό της μέλισσας (Disayathanoowat et al., 2020).

Όσον αφορά στους μύκητες, το γένος *Alternaria* έχει βρεθεί στη δημοσίευση των Disayathanoowat et al. (2020), οι οποίοι ταυτοποίησαν ως κυρίαρχο γένος το *Cladosporium*, καθώς ήταν παρόν στο σύνολο των δειγμάτων και συνήθως προέρχεται από το περιβάλλον. Στην παρούσα ανάλυση δεν εντοπίστηκε το συγκεκριμένο γένος, γεγονός που εγείρει κάποια ερωτήματα. Πιθανότατα οφείλεται στο περιβάλλον, από το οποίο προκύπτει και ωριμάζει το μελισσόψωμο.

Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένοι δείκτες α- και β-ποικιλότητας (alpha and beta diversity), προκειμένου να παρατηρηθεί και να ποσοτικοποιηθεί η ποικιλότητα τόσο μέσα στο ίδιο το δείγμα όσο και μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων της παρούσας ανάλυσης.

Συγκεκριμένα, στον Πίνακα 6 περιλαμβάνονται ο δείκτης Shannon, τα παρατηρούμενα OTUs (στη συγκεκριμένη εργασία αφορούν τα γένη), καθώς και ο δείκτης Chao1, όσον αφορά στο βακτηριακό μικροβίωμα του μελισσόψωμου.

Πίνακας 6. Δείκτες α-ποικιλότητας για τα βακτήρια

Sample	Shannon	Observed OTUs	Chao1
S1	5,121	46	46
S2	4,778	35	35
S3	5,714	76	80
S4	5,603	80	82
S5	5,146	52	52

Ο δείκτης Shannon χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ποικιλότητας εντός ενός δείγματος, λαμβάνοντας υπόψιν τον πλούτο και την αφθονία που παρατηρούνται σε αυτό. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του, τόσο μεγαλύτερη είναι και η ποικιλότητα του δείγματος. Σύμφωνα με τον Πίνακα 6, η μεγαλύτερη βακτηριακή ποικιλότητα εντοπίζεται στο δείγμα S3, ενώ ακολουθεί το S4, και στη συνέχεια τα S5 και S1 με τελευταίο να έρχεται το δείγμα S2. Όσον αφορά στο δείκτη Chao1, ο συγκεκριμένος εκτιμά τον πλούτο των δειγμάτων και υπολογίζει τα αναμενόμενα OTUs με βάση τα OTUs που παρατηρούνται. Σύμφωνα με τον πίνακα, ο δείκτης Chao1 υπολογίζει ότι τα OTUs θα έπρεπε να

είναι περισσότερα στα δείγματα S3 και S4, καθώς η τιμή είναι 80 αντί για 76 και 82 αντί για 80, αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές εκτιμούν και υποδηλώνουν τον αριθμό των γενών που χάθηκαν κατά την ανάλυση και προκύπτουν με βάση τα γένη που εμφανίζουν τη μικρότερη αφθονία σε κάθε δείγμα.

Στον Πίνακα 7 παρατηρείται η απόσταση Jaccard όσον αφορά στα δείγματα με τα βακτήρια, ώστε να γίνει η σύγκριση της βακτηριακής ποικιλότητας μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων.

Πίνακας 7. Απόσταση Jaccard (δείκτης β-ποικιλότητας) για τα βακτήρια

	S1	S2	S3	S4	S5
S1	0,000	0,791	0,870	0,865	0,911
S2	0,791	0,000	0,844	0,883	0,885
S3	0,870	0,844	0,000	0,836	0,847
S4	0,865	0,883	0,836	0,000	0,832
S5	0,911	0,885	0,847	0,832	0,000

Αναλυτικότερα, καθίσταται φανερό πως το μέτρο 0 (μηδέν) υποδηλώνει πως δεν υπάρχει καμιά διαφορά μεταξύ των δειγμάτων που συγκρίνονται. Δεδομένου ότι η μικρότερη τιμή απόστασης είναι το 0,791 και ότι αυτή αφορά τα δείγματα S1 και S2, συμπεραίνεται ότι από το σύνολο τα συγκεκριμένα δείγματα έχουν την κοντινότερη ποικιλότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς τα S1 και S2 έχουν χρονική διαφορά μόλις μιας ημέρας. Επιπλέον, γνωρίζουμε πως τα δείγματα S1 και S5 έχουν διαφορά 41 ημερών και πράγματι, σε αυτά παρατηρείται η μεγαλύτερη απόσταση (0,911), σύμφωνα με τον πίνακα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το δείγμα S2 απέχει σχεδόν το ίδιο από τα δείγματα S4 και S5, με βάση τις τιμές 0,883 και 0,885, αντίστοιχα. Επίσης, η ποικιλότητα του δείγματος S4 δείχνει να είναι το ίδιο κοντά με αυτή των δειγμάτων S3 και S5.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8) περιλαμβάνονται οι δείκτες α-ποικιλότητας που αφορούν το μυκητιακό μικροβίωμα.

Πίνακας 8. Δείκτες α-ποικιλότητας για τους μύκητες

Sample	Shannon	Observed OTUs	Chao1
S6	3,380	26	26
S7	3,367	17	17
S8	2,843	12	12
S9	0,586	6	8

Πιο συγκεκριμένα, με βάση το δείκτη Shannon η μεγαλύτερη ποικιλότητα εντοπίζεται στο δείγμα S6, ενώ ακολουθούν τα S7 και S8. Το δείγμα S9 εμφανίζει την μικρότερη τιμή, γεγονός που θεωρείται αναμενόμενο αν ληφθεί υπόψη ότι το μεγαλύτερο μέρος της αφθονίας καλύπτεται από ένα και μόνο γένος (Εικόνα 7). Επιπλέον, σχετικά με το δείκτη Chao1, παρατηρείται ότι μόνο στην περίπτωση του δείγματος S9 πιθανότατα χάθηκαν 2 γένη (OTUs), καθώς ο δείκτης εκτιμά 8 OTUs, ενώ από την ανάλυση προκύπτουν 6.

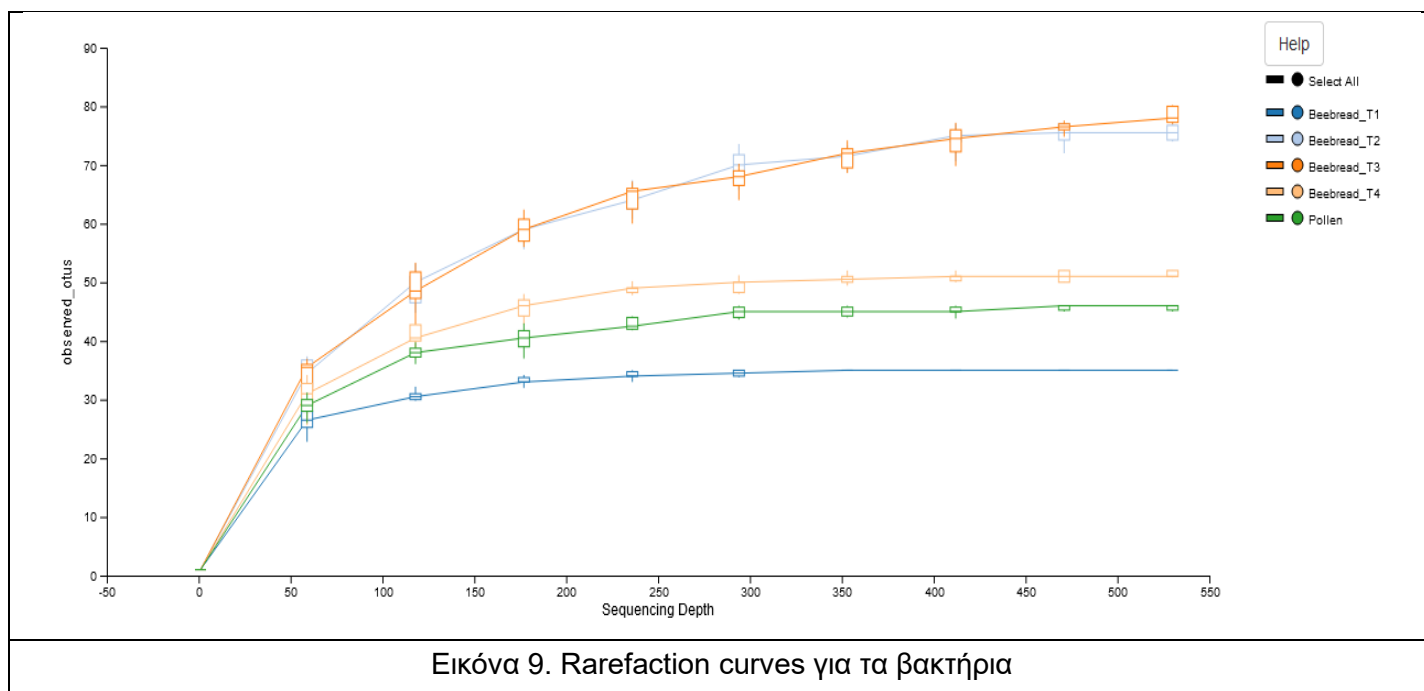
Στον Πίνακα 9 περιλαμβάνονται οι τιμές απόστασης Jaccard αναφορικά με το μυκητιακό μικροβίωμα και τη διαφορετική ποικιλότητα που παρατηρείται μεταξύ των δειγμάτων.

Πίνακας 9. Απόσταση Jaccard (δείκτης β-ποικιλότητας) για τους μύκητες

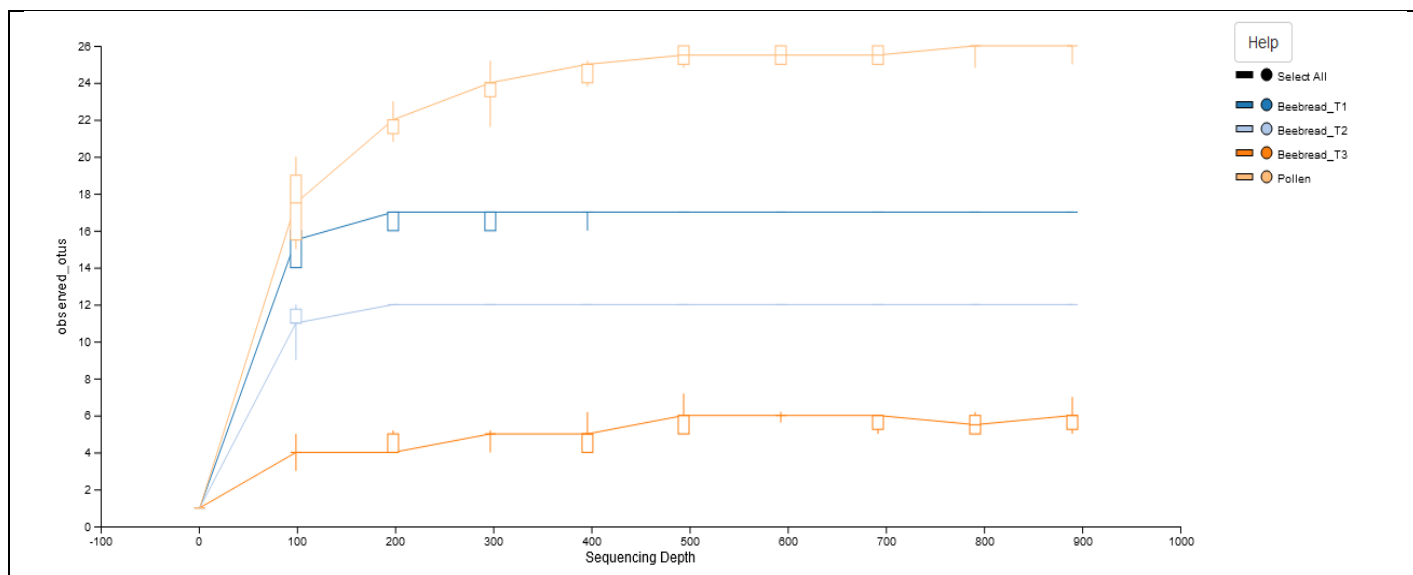
	S6	S7	S8	S9
S6	0,000	0,735	0,813	0,815
S7	0,735	0,000	0,682	0,789
S8	0,813	0,682	0,000	0,714
S9	0,815	0,789	0,714	0,000

Συγκεκριμένα, η μικρότερη απόσταση (0,682) αφορά τα δείγματα S7 και S8, ενώ η μεγαλύτερη τιμή τα δείγματα S6 και S9, γεγονός αναμενόμενο, διότι απέχουν 17 ημέρες και το μικροβίωμα μπορεί να έχει διαφοροποιηθεί σε μεγαλύτερο βαθμό. Επιπλέον, παρατηρείται ότι το δείγμα S6 απέχει σχεδόν το ίδιο από τα δείγματα S8 και S9, με τη διαφορά αυτή να αποτελεί τη μεγαλύτερη απόσταση μεταξύ των δειγμάτων.

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα Rarefaction curves για το σύνολο των δειγμάτων τόσο για τα βακτήρια όσο και για τους μύκητες (Εικόνες Εικόνα 9 και Εικόνα 10). Από τις συγκεκριμένες καμπύλες γίνεται φανερό αν τα δείγματα έχουν αλληλουχηθεί σε επαρκή βαθμό, ώστε να αντιπροσωπεύουν την πραγματική τους ποικιλότητα με βάση τον αριθμό των OTUs που παρατηρούνται (Observed OTUs).



Στην Εικόνα 9 περιλαμβάνονται οι καμπύλες Rarefaction για τα δείγματα S1-S5 που αφορούν τη βακτηριακή ποικιλότητα. Παρατηρείται ότι όλα τα δείγματα φτάνουν σε κορεσμό αλληλουχιών, ο οποίος εξαρτάται από το βάθος της αλληλούχησης. Συγκεκριμένα, τα δείγματα S1, S2 και S5 (απεικονίζονται με πράσινο, έντονο μπλε και αχνό πορτοκαλί) αρχίζουν να φτάνουν σε κορεσμό περίπου από τις 150-200 ακολουθίες, που σημαίνει ότι αυτός ο αριθμός ακολουθιών είναι αρκετός για να βρεθούν τα OTUs που αντιπροσωπεύουν τα δείγματα. Αντίστοιχα, για τα δείγματα S3 και S4 (με έντονο πορτοκαλί και αχνό μπλε) παρατηρείται πως οι αλληλουχίες φτάνουν σε κορεσμό γύρω στις 500 ακολουθίες.



Εικόνα 10. Rarefaction curves για τους μύκητες

Αντίστοιχα, στην Εικόνα 10 περιλαμβάνονται οι καμπύλες Rarefaction για τα δείγματα S6-S9 που αφορούν τη μυκητιακή ποικιλότητα. Όλα τα δείγματα φτάνουν σε κορεσμό αλληλουχιών σε διαφορετικό βάθος αλληλούχησης. Συγκεκριμένα, τα δείγματα S7 και S8 (τα οποία απεικονίζονται με τις αποχρώσεις του μπλε) φτάνουν σε κορεσμό από τις 200 αλληλουχίες, ενώ το S9 (απεικονίζεται με έντονο πορτοκαλί) δείχνει να φτάνει σε κορεσμό από τις 300 ακολουθίες. Τέλος, για το S6 (τη γύρη) παρατηρείται ο κορεσμός από τις 500 ακολουθίες.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε η μελέτη του βακτηριακού και του μυκητιακού μικροβιώματος του μελισσόψωμου με χρήση των δεδομένων που προέκυψαν από την αλληλούχηση επόμενης γενιάς. Επιπλέον, μελετήθηκε η μικροβιακή διαδοχή που παρατηρήθηκε σε διαφορετικές χρονικές στιγμές κατά την ωρίμανση του μελισσόψωμου. Από το σύνολο της ανάλυσης, συμπεραίνουμε ότι η σύσταση της μικροβιακής κοινότητας μπορεί να ποικίλει σε σημαντικό βαθμό τόσο όσον αφορά στα γένη που συναντώνται όσο και στη σχετική αφθονία του εκάστοτε γένους κατά τη μετάβαση από τη γύρη στο μελισσόψωμο. Η ποικιλότητα αυτή μπορεί να εξαρτάται από τα είδη των φυτών και των ανθέων από τα οποία προέρχεται η γύρη, όπως επίσης από την τοποθεσία της κυψέλης και το περιβάλλον στο οποίο έχουν πρόσβαση οι μέλισσες. Η περαιτέρω διερεύνηση κρίνεται απαραίτητη για την επιβεβαίωση της σχέσης μικροβιώματος και περιβάλλοντος, καθώς επίσης για το ρόλο των υπάρχοντων μικροοργανισμών στο μελισσόψωμο.

5. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η συγκεκριμένη διατριβή πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας. Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Μόσιαλο Δημήτριο για την ευκαιρία που μου προσέφερε με την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας, καθώς και για τις χρήσιμες συμβουλές του σε αυτό το διάστημα. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αμούτζια Γρηγόριο και τον κ. Δημητρίου Τηλέμαχο που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Ασούτη Νίκο για την πολύτιμη βοήθειά του και τις γνώσεις που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς επίσης τον υποψήφιο διδάκτορα Νικολαΐδη Μάριο για την πολύτιμη συνδρομή του στις βιοπληροφορικές αναλύσεις. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την υποστήριξη και τη βοήθειά τους.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Γύπας Φ και Μεντής Α.-Φ.Α. (2014) Τεχνικές μελέτης των φυσιολογικών μικροχλωρίδων του ανθρώπου – μεταγονιδιωματική. Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 59(2).
- Anderson KE, Sheehan TH, Mott BM, Maes P, Snyder L, et al. (2013) Microbial Ecology of the Hive and Pollination Landscape: Bacterial Associates from Floral Nectar, the Alimentary Tract and Stored Food of Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, 8(12), e83125.
- Asama T, Arima TH, Gomi T, Keishi T, Tani H, Kimura Y, Tatefuji T, Hashimoto K (2015) *Lactobacillus kunkeei* YB38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults. *Journal of Applied Microbiology*, 119(3), 818–26.
- Asoutis Didaras N, Karatasou K, Dimitriou TG, Amoutzias GD, Mossialos D (2020) Antimicrobial Activity of Bee-Collected Pollen and Beebread: State of the Art and Future Perspectives. *Antibiotics*, 9(11), 811.
- Anđelković B, Jevtić G, Mladenović M, Marković J, Petrović M, Nedić N (2012) Quality of pollen and honey beebread collected in spring. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 275–277.
- Bakour M, Fernandes Â, Barros L, Sokovic M, Ferreira ICFR, Iyousi B (2019) Bee bread as a functional product: Chemical composition and bioactive properties. *LWT*, 109, 276–282.
- Barene I, Daberte I, Siksnas S (2014) Investigation of bee bread and development of its dosage forms. *Medicinos teorija ir praktika*, 21, 16–22.
- Bashir Y, Singh S, Konwar B (2014) Metagenomics: An Application Based Perspective. *Chinese Journal of Biology*, 1–7.
- Di Cagno R, Filannino P, Cantatore V, Gobbetti M (2019) Novel solid-state fermentation of bee-collected pollen emulating the natural fermentation process of bee bread. *Food Microbiology*, 82, 218–230.
- Disayathanoowat T, Li H, Supapimon N, Suwannarach N, Lumyong S, Chantawannakul P, Guo J (2020) Different Dynamics of Bacterial and Fungal Communities in Hive-Stored Bee Bread and Their Possible Roles: A Case Study from Two Commercial Honey Bees in China. *Microorganisms*, 8, 264.
- Donkersley P, Rhodes G, Pickup RW, Jones KC, Wilson K (2018) Bacterial communities associated with honeybee food stores are correlated with land use. *Ecology and Evolution*, 8(10), 4743–4756.
- Dranca F, Ursachi F, Oroian M (2020) Bee Bread: Physicochemical Characterization and Phenolic Content Extraction Optimization. *Foods*, 9(10), 1358.
- Ghosh A, Mehta A, Khan A (2019) Metagenomic Analysis and its Applications. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, 3, 184–193.
- Isidorov VA, Isidorova AG, Szczepaniak L, Czyżewska U (2009) Gas chromatographic–mass spectrometric investigation of the chemical composition of beebread. *Food Chemistry*, 115, 1056–1063.
- Kaplan M, Karaoglu Ö, Eroglu N, Silici S (2016) Fatty Acid and Proximate Composition of Bee Bread. *Food technology and biotechnology*, 54(4), 497–504.
- Kaškonienė V, Adaškevičiūtė V, Kaškonas P, Mickienė R, Maruška A (2020) Antimicrobial and antioxidant activities of natural and fermented bee pollen. *Food Bioscience*, 34, 100532.

- Khalifa SAM, Elashal M, Kieliszek M, Ghazala NE, Farag MA, Saeed A, et al. (2020) Recent insights into chemical and pharmacological studies of bee bread. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 300–316.
- Kieliszek M, Piwowarek K, Kot AM, Błażej S, Chlebowska-Śmigiel A, Wolska I (2018) Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 170–180.
- Mărgăoan R, Strant M, Varadi A, Topal E, Yücel B, Cornea-Cipcigan M, Campos MG, Vodnar DC (2019) Bee collected pollen and bee bread: Bioactive constituents and health benefits. *Antioxidants*, 8, 568.
- Mărgăoan R, Cornea-Cipcigan M, Topal E, Kösoğlu M (2020) Impact of Fermentation Processes on the Bioactive Profile and Health-Promoting Properties of Bee Bread, Mead and Honey Vinegar. *Processes*, 8(9), 1081.
- Mattila, HR, Rios D, Walker-Sperling VE, Roeselers G, Newton ILG (2012) Characterization of the Active Microbiotas Associated with Honey Bees Reveals Healthier and Broader Communities when Colonies are Genetically Diverse. *PLoS ONE*, 7(3), e32962.
- Lane DJ 16S/23S rRNA sequencing. (1991) In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. (Eds: Stackebrandt E, Goodfellow M) John Wiley and Sons, New York, NY, pp.115–175.
- Sobral F, Calhella RC, Barros L, Dueñas M, Tomás A, Santos-Buelga C, Vilas-Boas M, Ferreira ICFR (2017) Flavonoid Composition and Antitumor Activity of Bee Bread Collected in Northeast Portugal. *Molecules*, 22, 248.
- Turner S, Pryer KM, Miao VP, Palmer JD (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), 327–38.
- Urcan A, Mărgăoiş LA, Dezmirean DS, Bobiş O, Bonta V, Mureşan CI, Mărgăoan R (2017) Chemical Composition and Biological Activities of Beebread – Review. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 74(1), 6–14.
- Zuluaga CM, Serrato J, Quicazan MC (2015) Chemical, nutritional and bioactive characterization of Colombian bee-bread. *Chemical Engineering Transactions*, 43, 175–180.