ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΓΕΩΡΓΗ ΕΙΡΗΝΗ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2022

ΤΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ ΤΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ ΚΑΙ ΝΕΑΡΩΝ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΜΕΛΙΣΣΩΝ ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΝΟΖΕΜΙΑΣΗΣ

THE BEEBREAD AND BEE MICROBIOME AS BIOMARKER FOR NOSEMIASIS

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μόσιαλος Δημήτριος (επιβλέπων): 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

Χατζήνα Φανή: Τακτική Ερευνήτρια (Α’), Τμήμα Μελισσοκομίας - Ινστιτούτο Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής (ΕΛΓΟ «ΔΗΜΗΤΡΑ»)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η *Apis mellifera* είναι ένα έντομο ύψιστης σημασίας για τον άνθρωπο, τόσο για τα μελισσοκομικά προϊόντα που παράγει, όσο και για τη συνεισφορά της στην επικονίαση μονοκαλλιεργειών και στη διατήρηση της βιοποικιλότητας των ειδών του οικοσυστήματος. Παρόλα αυτά τις τελευταίες δεκαετίες, οι πληθυσμοί της έχουν μειωθεί σημαντικά, λόγω της συνεργικής δράσης παραγόντων που επηρεάζουν αρνητικά την υγεία της.

Ένας από αυτούς τους παράγοντες είναι το παρασιτικό μικροσπορίδιο *Nosema (Vairimorpha) ceranae* που οδηγεί σε μια παθολογική κατάσταση, γνωστή ως Νοζεμίαση. Η ασθένεια αυτή έχει αρνητικό αντίκτυπο στην υγεία των μελισσών και μπορεί να οδηγήσει και σε ξαφνική ολική κατάρρευση του μελισσιού. Η απουσία εμφανών κλινικών συμπτωμάτων, συχνά αποτρέπει την έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία.

Τα σπόρια του παρασίτου *Nosema ceranae* αποικίζουν το μέσο έντερο (στομάχι) των μελισσών και διαταράσσουν το φυσιολογικό μικροβίωμα του γαστρεντερικού συστήματος των μελισσών. Μπορούν επίσης να επιβιώνουν στο περιβάλλον της κυψέλης, και να καταλήξουν με διάφορους τρόπους στο μελισσόψωμο που είναι η βασική πηγή πρωτεϊνών, λιπιδίων και θρεπτικών συστατικών για το μελίσσι. Μέσω αυτών των οδών, το παράσιτο μπορεί να διαταράξει το φυσιολογικό μικροβίωμα του μελισσιού ως σύνολο.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης του *Nosema ceranae*, τόσο στο μικροβίωμα (βακτήρια και μύκητες), νεαρών ενήλικων μελισσών και μελισσόψωμου ποικίλης ωρίμανσης, με στόχο την εύρεση πιθανών διαγνωστικών ή/και προγνωστικών βιοδεικτών της ασθένειας.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση του ολικού γενετικού υλικού από δείγματα μελισσόψωμου και μελισσών προερχόμενα από 6 κυψέλες (3 φαινομενικά υγιείς μάρτυρες με αμελητέο αριθμό σπορίων *N. ceranae* και 3 με στατιστικά σημαντικό αριθμό σπορίων *N. ceranae*). Στο πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε, έγιναν διαδοχικές βελτιώσεις, μέχρι την απομόνωση προϊόντος υψηλής καθαρότητας και συγκέντρωσης. Ο έλεγχος του προϊόντος έγινε με PCR και χρήση εκκινητών ενίσχυσης των 16S rDNA περιοχών των βακτηρίων και μυκήτων, ηλεκτροφόρηση και φασματοφωτομέτρηση μικροποσοτήτων. Τα 12 δείγματα στάλθηκαν στην εταιρία Novogene για αλληλούχιση του ολικού μικροβιώματος με χρήση τεχνικών αλληλούχισης επόμενης γενιάς.

Τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης έδειξαν σημαντική μείωση της ποικιλότητας του μικροβιώματος (δείκτες άλφα ποικιλότητας και μοναδικά OTUs βακτηρίων και μυκήτων), στα δείγματα μελισσόψωμου και μελισσών με αυξημένο αριθμό σπορίων *N. ceranae* σε σχέση με τα δείγματα-μάρτυρες. Η μείωση αυτή ενδέχεται να αποτελεί δείκτη αρνητικής πρόγνωσης για το μελίσσι και χρίζει περεταίρω διερεύνηση. Λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων που διερευνήθηκαν, σημειώθηκαν σημαντικές αποκλίσεις στη σύσταση του μικροβιώματος (Γένη) και ως αποτέλεσμα η στατιστική ανάλυση δεν οδήγησε στον εντοπισμό αξιόπιστων βιοδεικτών.

Λέξεις-κλειδιά: μελισσόψωμο, μέλισσα, μικροβίωμα, Νοζεμίαση, *N. ceranae*

ABSTRACT

Apis mellifera is an insect of great importance to humans, due to the apiary products it produces, as well as its contribution to the pollination of crop monocultures and the preservation of the biodiversity of the ecosystem. However, in recent years its populations have declined dramatically, due to the synergistic effect of factors that affect its health in a negative manner.

One of those factors is the parasitic microsporidium *Nosema (Vairimorpha) ceranae* which leads to a pathological condition known as Nosemiasis. This disease has a negative effect in the health of honeybees and can even lead to a sudden and complete colony collapse. The absence of visible clinical symptoms, can often prevent timely diagnosis and treatment.

The spores of the parasite *Nosema ceranae* colonize the ventriculus (midgut/stomach) of the gastrointestinal tract of the honeybees. They can also survive in the hive environment as well as end up through various routes in the beebread, which consists of the colony's main source of protein, lipids and nutrients. Through those routes, the parasite can disturb the healthy microbiome of the hive.

The aim of the current thesis was the investigation of the possible effects of *Nosema ceranae*, in the microbiome (bacteria and fungi) of young adult honeybees and bee bread of mixed stages of fermentation, in order to locate potential diagnostic and/or prognostic biomarkers for the disease.

Firstly, all of the genetic material was extracted from samples of bee bread and bees, originating from a total of 6 hives (3 seemingly healthy controls with insignificant *N. ceranae* spore count and 3 with statistically significant *N. ceranae* spore count*)*. The protocol for the extraction was subsequently tweaked several times, until the product was of high purity and concentration. The contents of the extract were surveyed with PCR using primers for the amplification of the 16S rDNA regions of bacteria and fungi, as well as electrophoresis and spectrophotometry of microvolumes. The final 12 samples were sent to the company Novogene for Next-Generation-Sequencing of the whole microbiome.

The results of the bioinformatic analysis showed a significant decrease in the diversity (unique OTUs) of the microbiome of beebread and bee samples with increased *N. ceranae* spore count, compared to the controls. That decrease could serve as a biomarker of negative prognosis for the hive and may merit further investigation. Due to the small sample pool, there were significant deviations regarding the microbiome composition (Genera), and as a result the statistical analysis did not reveal any reliable biomarkers.

Keywords: bee bread, honeybee, microbiome, Nosemosis, *Nosema ceranae*

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα πινάκων

Περιεχόμενα εικόνων

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η *Apis mellifera* και το μικροβίωμα της

1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά της *Apis mellifera*

Η *Apis mellifera*, γνωστή και ως δυτική κοινωνική μελιτοφόρα μέλισσα, είναι ένα έντομο ύψιστης σημασίας για τον άνθρωπο και το οικοσύστημα. Πέρα από την παραγωγή μελιού και κεριού, είναι υπεύθυνη για την επικονίαση της άγριας χλωρίδας αλλά και πολλών οικονομικά σημαντικών καλλιεργήσιμων τροφών όπως ο καφές, διάφορα φρούτα και ξηροί καρποί. Χωρίς την επικονίαση αυτή, οι σοδειές αυτών των τροφίμων, καθώς και η ποιότητα και το μέγεθος των αγαθών, θα μειώνονταν σημαντικά. Εάν συμπεριληφθούν και τροφές που εξαρτώνται έμμεσα από την επικονίαση, φαίνεται ότι το 35% της διατροφής των ανθρώπων επωφελείται από την ύπαρξη των μελιτοφόρων μελισσών (reviewed by vanEngelsdorf and Meixner 2010).

Αν και αναφέρεται ως Ευρωπαϊκή μέλισσα καθώς είναι ιθαγενής της Ευρώπης-Αφρικής και κεντρικής Ασίας, η *Apis mellifera* εντοπίζεται πλέον παγκοσμίως λόγω συνειδητής ανθρώπινης παρέμβασης (reviewed by vanEngelsdorf and Meixner 2010).

Πίνακας 1: Συστηματική ταξινόμηση της *Apis mellifera*

Βασίλειο	Ζώα (Animalia)
Φύλο	Αρθρόποδα (Arthropoda)
Ομοταξία	Έντομα (Insecta)
Τάξη	Υμενόπτερα (Hymenoptera)
Υπερ-οικογένεια	Apoidea
Οικογένεια	Απίδες (Apidae)
Γένος	*Άπις* (*Apis*)
Είδος	*Mellifera Linnaeus*

Ανήκει στην οικογένεια Apidae (Πίνακας 1) στην οποία συμπεριλαμβάνονται και άλλες μέλισσες που πραγματοποιούν επικονίαση. Η *A. mellifera* δεν είναι η πιο αποτελεσματική όσον αφορά την επικονίαση των περισσότερων τροφών και επιπλέον δεν εξαρτώνται όλα τα φυτά από την επικονίαση των μελιτοφόρων μελισσών. Παρόλα αυτά η επικονίαση που πραγματοποιούν -ιδιαίτερα τα διαχειριζόμενα από μελισσοκόμους μελίσσια- είναι η σημαντικότερη για τις μονοκαλλιέργειες Αυτές οι -εξαρτώμενες από επικονίαση- καλλιεργούμενες εκτάσεις έχουν μάλιστα αυξηθεί τα τελευταία χρόνια (reviewed by vanEngelsdorf and Meixner 2010).

Παρόλο που ο πληθυσμός των διαχειριζόμενων μελισσιών αυξήθηκε -από το 1960 έως τις αρχές του 21ου αιώνα (2007), η αύξηση αυτή δεν φαίνεται να μπορεί να ανταποκριθεί στη ζήτηση και επιπλέον δεν έχουν δει όλες οι χώρες την ίδια αύξηση (reviewed by vanEngelsdorf and Meixner 2010). Ακόμη, από το 2006 και έπειτα, τόσο οι άγριοι πληθυσμοί, όσο και οι διαχειριζόμενοι από μελισσοκόμους έχουν μειωθεί σημαντικά, ιδίως στην Ευρώπη και τη βόρεια Αμερική**.** Σε πολλές περιπτώσεις αυτές οι απώλειες εκδηλώθηκαν ξαφνικά και οδήγησαν σε κατάρρευση του μελισσιού μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα, ένα φαινόμενο που αναφέρεται ως Σύνδρομο Κατάρρευσης Μελισσιού (Colony Collapse Disorder/CCD). Οι σοβαρές αυτές απώλειες έχουν οδηγήσει σε οικονομικές ζημίες των μελισσοκόμων και μείωση των σοδειών των μονοκαλλιεργειών.

Τα κύρια αίτια φαίνεται να είναι ένας συνδυασμός ανθρωπογενών παραγόντων, όπως η κλιματική αλλαγή (πολύ υψηλές θερμοκρασίες το καλοκαίρι και πολύ χαμηλές το χειμώνα), η ρύπανση, η έκθεση σε παρασιτοκτόνα-αγροχημικά και αντιβιοτικά, καθώς και η απώλεια βιοτόπων -απώλεια ποικιλότητας και αφθονίας γυρεοφόρων φυτών και λουλουδιών (reviewed by Goulson et al., 2015; reviewed by vanEngelsdorf and Meixner 2010). Συνεργικά λειτουργούν επίσης και οι διάφορες μολυσματικές ασθένειες και επιδημίες που προκαλούνται από παθογόνα, συμπεριλαμβανομένων των παρασίτων *Βαρρόα* (*Varroa*) και *Νοζέμα* (*Nosema*) (reviewed by Goulson et al., 2015; reviewed by vanEngelsdorf and Meixner 2010).

1.1.2 Γενικά χαρακτηριστικά του μικροβιώματος της *Apis mellifera*

Το εντερικό μικροβίωμα έχει σημαντικό αντίκτυπο στην υγεία των μελισσών καθώς συμμετέχει στο μεταβολισμό, την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών και στην ανοσοποιητική άμυνα. Παράλληλα μπορεί να επηρεάσει τη συμπεριφορά και την ανάπτυξή τους και κατ' επέκταση συνδέεται άμεσα με την ευημερία του μελισσιού ως σύνολο (reviewed by Bonilla-Rosso and Engel 2018; Martinson et al., 2012; Vásquez and Olofsson 2009). Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι κάποιοι από τους παράγοντες που ευθύνονται για τη μείωση των πληθυσμών των μελισσιών παγκοσμίως (π.χ. παράσιτα) αλληλεπιδρούν ή επηρεάζονται σε κάποιο βαθμό από το μικροβίωμα. Πολλοί ερευνητές είναι της άποψης ότι η εξιχνίαση των μηχανισμών αυτής της αλληλεπίδρασης θα μπορούσε να οδηγήσει σε καλύτερες τεχνικές πρόληψης, διάγνωσης και θεραπείας με στόχο την αποτροπή της κατάρρευσης των μελισσιών (Bonilla-Rosso and Engel 2018; Kwong and Moran 2016).

Ο όρος μικροβίωμα (microbiome) αναφέρεται στο σύνολο των μικροοργανισμών (βακτήρια, μύκητες, αρχαία, ιοί και άλλοι ευκαρυώτες), δηλαδή των μικροβιότα (microbiota) που υπάρχουν σε ένα περιβάλλον ή ξενιστή, συμπεριλαμβανομένου των γονιδιωμάτων αυτών. Επίσης περιγράφει τόσο τους βιοτικούς όσο και τους αβιοτικούς παράγοντες που σχετίζονται με αυτούς τους μικροοργανισμούς εντός ενός βιοτόπου, αλλά και των περιβαλλοντικών συνθηκών που επικρατούν σε αυτόν. Στην επιστήμη και στην έρευνα δίνεται έμφαση στην αλληλούχιση και τον χαρακτηρισμό/εξιχνίαση του γονιδιώματος αυτών των μικροοργανισμών.

Η *Apis mellifera* διαθέτει ένα σχετικά απλό αλλά χαρακτηριστικό μικροβίωμα που αποτελείται κυρίως από βακτήρια (Kwong and Moran 2016; Kwong et al., 2017). Οι νεαρές μέλισσες δεν διαθέτουν μικροβίωμα αλλά το αποκτούν σταδιακά τις πρώτες 9 μέρες ζωής, από πηγές εντός της κυψέλης, συμπεριλαμβανομένου του μελισσόψωμου και της κερήθρας, μέσω της επαφής ή ανταλλαγής τροφής με μεγαλύτερης ηλικίας μέλισσες, αλλά και από τα περιττώματα αυτών (reviewed by Kwong and Moran 2016; Martinson et al., 2012).

1.1.3 Το γαστρεντερικό σύστημα της *Apis mellifera*

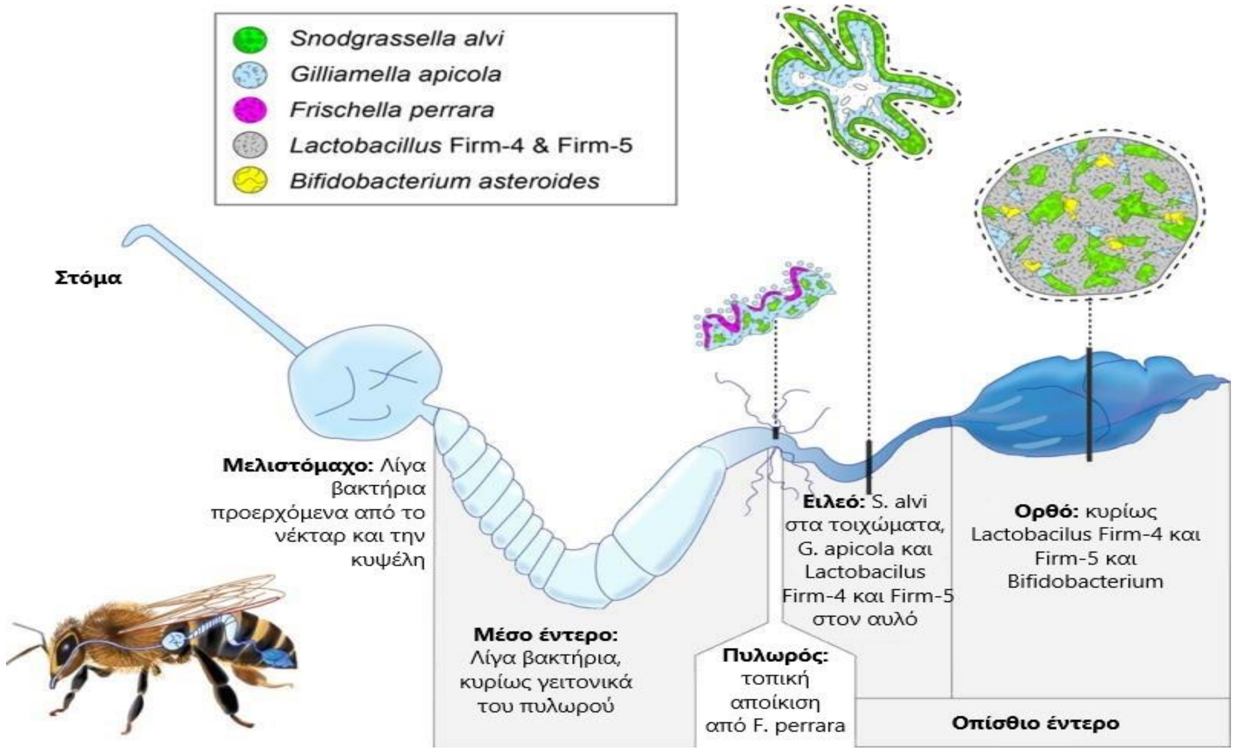
Το γαστρεντερικό-πεπτικό σύστημα (gastrointestinal/G.I tract) της *A. mellifera* μπορεί να διαχωριστεί σε τρία διαμερίσματα. Το πρόσθιο έντερο (foregut), το μέσο έντερο (midgut) και το οπίσθιο έντερο (hindgut) (Εικόνα 1). Το πρόσθιο έντερο περιλαμβάνει το φάρυγγα, τον οισοφάγο (esophagus), τον πρόλοβο ή μελιστόμαχο (crop) και τον προστόμαχο (proventriculus). Το μέσο έντερο αποτελείται αποκλειστικά από το βασικό στομάχι όπου γίνεται η πέψη. Τέλος το οπίσθιο έντερο συνίσταται από τον πυλωρό (pylorus) με τους σωλήνες Malpighi (Malphigian tubules), τον ειλεό (ileum), το λεπτό και το παχύ έντερο και καταλήγει στο ορθό (rectum).

Η τροφή (νέκταρ και γύρη) που συλλέγεται από τις τροφοσυλλέκτριες μεταφέρεται μέσω του οισοφάγου, στο μελιστόμαχο όπου αποθηκεύεται προσωρινά. Το μελιστόμαχο επενδύεται από μυς για να μπορεί να διευρυνθεί και να χωρέσει μεγάλες ποσότητες νέκταρ και θρεπτικών συστατικών. Παρά τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και ενέργειας που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν από τους μικροοργανισμούς, το μελιστόμαχο δεν αποικίζεται από πολλά βακτήρια, με εξαίρεση ορισμένα οξεοανθεκτικά LAB (lactic acid bacteria), προερχόμενα από τη γύρη και το νέκταρ (reviewed by Kwong and Moran 2016; Martinson et al., 2012; Vásquez and Olofsson 2009). Η απουσία εκτενούς αποίκισης από βακτήρια ενδέχεται να συμβαίνει λόγω του συχνού γεμίσματος-αδειάσματος του μελιστόμαχου με νέκταρ κατά τη διαδικασία συλλογής και εναπόθεσης στην κυψέλη, διαδικασία που μπορεί να διαταράσσει την μικροβιακή κοινότητα και να αποτρέπει τον αποικισμό (Martinson et al., 2012). Μια άλλη θεωρία είναι το μελιστόμαχο παράγει διάφορα ένζυμα για τη μετατροπή του νέκταρ σε μέλι, είναι πιθανό αυτά τα ένζυμα να αποτρέπουν τη βακτηριακή ανάπτυξη και να δίνουν τελικά στο μέλι τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες (reviewed by Martinson et al., 2012).

Ένα μέρος της τροφής (π.χ. μέλι) μπορεί να αναμασηθεί για τροφάλλαξη ή για αποθήκευση στην κυψέλη ενώ η υπόλοιπη τροφή και τα θρεπτικά συστατικά μεταφέρονται μέσω του προστομάχου στο στομάχι/μέσο έντερο. Ο προστόμαχος περιέχει βαλβίδες οι οποίες αποτρέπουν την είσοδο ξενοβιοτικών στο μέσο έντερο και αποτρέπουν επίσης την επαναφορά τροφής από το στομάχι στον μελιστόμαχο. Στο μέσο έντερο λοιπόν λαμβάνει χώρα η πλειοψηφία της πέψης και απορρόφησης της τροφής. Το επιθηλιακό στρώμα του μέσου εντέρου περιέχει διάφορα ένζυμα τα οποία μεταβολίζουν τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και τα σάκχαρα. Ο επιθήλιος του μέσου εντέρου παράγει επίσης την περιτροφική (peritrophic) μεμβράνη η οποία προστατεύει τα επιθηλιακά κύτταρα από την τριβή λόγω τραχειών τροφών και αποτρέπει την είσοδο παθογόνων. Η μεμβράνη αυτή παράγεται και αποβάλλεται συνεχώς κατά την διέλευση τροφής, με αποτέλεσμα να μην επιτρέπεται η προσκόλληση μικροβίων στο στομάχι. Η παρουσία της περιτροφικής μεμβράνης και των πεπτικών ενζύμων εξηγούν την σχετική απουσία μικροβιώματος στο μέσο έντερο, παρόλο που επρόκειτο για το μεγαλύτερο όργανο του γαστρεντερικού συστήματος (Martinson et al., 2012).

Τα υπολείμματα της πέψης μεταφέρονται μέσου του πυλωρού στο ειλεό το οποίο παρόλο που είναι ένα σχετικά μικρό όργανο, ωστόσο εμπεριέχει αναδιπλώσεις με μεγάλο εμβαδό επιφάνειας (surface area), έτσι ώστε να συλλέγονται τα θρεπτικά συστατικά που δεν απορροφήθηκαν από το στομάχι. Αυτό δίνει στα μικρόβια έναν χώρο να αποικίσουν, καθώς και πρόσβαση σε θρεπτικά συστατικά, γι’ αυτό αποικίζεται από μεγάλο αριθμό βακτηρίων. Τέλος, τα περιττώματα συσσωρεύονται στο ορθό το οποίο όπως και το μελιστόμαχο έχει την ιδιότητα διεύρυνσης. Αυτό δίνει χρόνο στις μέλισσες να απορρίψουν τα περιττώματα εκτός της κυψέλης. Κάποια από τα συστατικά της γύρης (όπως το εξωτερικό τοίχωμα/exine), δεν διασπώνται από τα πεπτικά ένζυμα των μελισσών, οπότε μπορούν να αποτελέσουν πηγή θρεπτικών συστατικών για τα βακτήρια του ειλεού και του ορθού. Συμπερασματικά, το μεγαλύτερο ποσοστό του μικροβιώματος (συνήθως >95% κατά περίπτωση) εντοπίζεται σε αυτές τις δύο περιοχές, όπως συμβαίνει στα περισσότερα ζώα (reviewed by Bonilla-Rosso and Engel 2018; Martinson et al., 2012;).

Εικόνα 1: Σύνθεση και χωρική οργάνωση βακτηριακών κοινοτήτων εντός του γαστρεντερικού συστήματος της *Apis mellifera*



Απεικονίζονται τα τρία διαμερίσματα του γαστρεντερικού συστήματος (πρόσθιο, μέσο και οπίσθιο έντερο) καθώς και τα κύρια βακτήρια από τα οποία αποικίζονται τα όργανα τους (τροποποιήθηκε από Kwong and Moran 2016).

1.1.4 Το μικροβίωμα της *A. mellifera* και ο ρόλος του

Η πλειοψηφία των βακτηριακών 16S rRNA αλληλουχιών (95-99.9%) που έχουν εντοπιστεί σε ενήλικες εργάτριες μελιτοφόρες μέλισσες *A. mellifera* ανήκουν σε 9 χαρακτηριστικούς βακτηριακούς Φυλοτύπους (Είδη με >97% ομοιότητα αλληλουχίας) (Πίνακας 2) (reviewed by Bonilla-Rosso and Engel 2018; Engel et al., 2012; Kwong and Moran 2016; Kwong et al., 2017; Martinson et al., 2012)

Πέντε από αυτούς τους Φυλοτύπους, εντοπίζονται σχεδόν σε όλες τις ενήλικες εργάτριες μελιτοφόρες μέλισσες *A. mellifera* ανεξαρτήτου περιβάλλοντος, γεωγραφικής περιοχής ή φυλής και κατανέμονται κυρίως στις περιοχές του ειλεού και του ορθού (Εικόνα 1) (Martinson et al., 2012). Πρόκειται για δύο Gram-θετικούς *Λακτοβάκιλλους* Firm-4 και Firm-5, ένα επίσης Gram-θετικό *Bifidobacterium*, και δύο Gram-αρνητικές *Snodgrassella alvi* και *Gilliamella apicola* (Πίνακας 2) (Kwong and Moran 2016; Kwong et al., 2017). Τα συγκεκριμένα βακτηριακά Είδη εντοπίζονται επίσης σε συγγενικές μέλισσες (άλλες μελιτοφόρες/honey bees, βομβίνους/bumble bees, άκεντρες/stingless bees), αλλά σπάνια εντοπίζονται σε άλλου είδους περιβάλλοντα ή σε μη-κοινωνικές μέλισσες (Kwong and Moran 2016; Kwong et al., 2017; Koch et al., 2013; Martinson et al., 2011). Αυτό αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι τα βακτήρια αυτά έχουν σχηματίσει στη πορεία της εξέλιξης, μακροχρόνιες και εξειδικευμένες συμβιωτικές σχέσεις με αυτά τα έντομα (Kwong et al., 2017; Koch et al., 2013). Επιπλέον, η κοινωνική συμπεριφορά αυτών των εντόμων (οριζόντια μεταφορά), φαίνεται να ευθύνεται για την απόκτηση και συντήρηση αυτών των εξειδικευμένων βακτηρίων, κατά την πορεία της εξέλιξης (Martinson et al., 2011; Koch et al., 2013; Kwong et al., 2017).

Τα υπόλοιπα τέσσερα Gram-αρνητικά Είδη, εντοπίζονται λιγότερο συχνά και σε μικρότερη αφθονία και είναι τα: *Frischella perrara*, *Bartonella apis*, *Parasaccharibacter apium* (Alpha 2.2) και το συγγενικό με το Είδος *Gluconobacter*, Alpha 2.1, αγνώστου Γένους/ Είδους. Τα *Bartonella apis* και *Frischella perrara*, εντοπίζονται αποκλειστικά στις μελιτοφόρες (*Apis*) (Kwong et al., 2017).

Πίνακας 2: Συστηματική ταξινόμηση των βασικών βακτηριακών πληθυσμών της *A. mellifera*

ΦΥΛΟΤΥΠΟΣ	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΦΥΛΟ	ΓΕΝΟΣ	ΕΙΔΟΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ
GAMMA 1	Gamma proteobacteria	*Gilliamella*	*apicola*	Μέσο έντερο ενηλίκων, αυλός ειλεού
GAMMA 2	Gamma proteobacteria	*Frischella*	*perrara*	Ειλεό, πυλωρό
BETA	Beta proteobacteria	*Snodgrassella*	*alvi*	Ειλεό
FIRM 4	Firmicutes	*Lactobacillus*	*mellifer*	Ορθό
FIRM 5	Firmicutes	*Lactobacillus*	*apis*	Ειλεό και ορθό
BIFIDO	Actinobacteria	*Bifidobacterium*	*asteroides*	Ορθό
ALPHA 1	Alpha proteobacteria	*Bartonella*	*apis*	Έντερο ενηλίκων (όχι ξεκάθαρη η ακριβής περιοχή)
ALPHA 2.1	Alpha proteobacteria	*άγνωστο*	*άγνωστο*	Έντερο προνύμφης, μελιστόμαχο ενηλίκων, νέκταρ, μέλι, κυψέλη, οπίσθιο έντερο ενηλίκων
ALPHA 2.2		*Parasaccharibacter*	*apium*	

Σύμφωνα με τον Kwong και συνεργάτες, άτομα *A. mellifera* ενδέχεται να διαθέτουν και άλλα Είδη βακτηρίων εκτός από τα 9 βασικά -τα οποία εντοπίζονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις και συχνότητες- και αποκτώνται μέσω της τροφοσύλλεξης, από το περιβάλλον, τα φυτά και από την κυψέλη (Kwong et al., 2017). Σε αυτή την κατηγορία συμπεριλαμβάνονται τα : *Lactobacillus* Firm-3, *Apibacter*, Leuconostocaceae, *Pseudomonas*, άλλα Acetobacteriaceae, άλλα Enterobacteriaceae και άλλα Είδη *Lactobacillus* (Kwong et al., 2017).

Αξίζει να σημειωθεί ότι παρά την απλότητα του μικροβιώματος της *A. mellifera* σε επίπεδο Είδους, υπάρχει υψηλή γενετική ποικιλομορφία των στελεχών, ιδιαίτερα των Ειδών *G. apicola*, *S. alvi*, και Γενών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Αυτή η γενετική ποικιλότητα οδηγεί και σε διαφορετικές λειτουργικές ιδιότητες, ακόμη και μεταξύ στελεχών του ίδιου Είδους.

Αναφορικά με το ρόλο του βακτηριώματος, φαίνεται ότι ένα σημαντικό μέρος αυτών που εντοπίζονται στις γυρεοσυλλέκτριες μέλισσες, εξειδικεύεται στο μεταβολισμό της τροφής- ιδιαίτερα υδατανθράκων και σακχάρων. Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 1.1.3, η *A. mellifera* δεν έχει την ικανότητα να μεταβολίζει ορισμένα συστατικά της τροφής της, τα οποία συσσωρεύονται στο οπίσθιο έντερο. Κάποια από αυτά τα συστατικά είναι τοξικά για της μέλισσες. Επιπλέον, η αυξημένη χρήση αγροχημικών-παρασιτοκτόνων οδηγεί έκθεση και συσσώρευση επιβλαβών ουσιών στο γαστρεντερικό τους σύστημα. Τα στελέχη *G. apicola*, *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*, έχουν την ικανότητα να διασπούν ενζυματικά και να ζυμώνουν αυτά τα συστατικά της γύρης, του μελιού και του νέκταρος και άλλων επιβλαβών προϊόντων (Kwong et al., 2017; reviewed by Bonilla-Rosso and Engel 2018). Κάποιους από τους μεταβολίτες που απελευθερώνονται από αυτή τη διαδικασία διάσπασης-ζύμωσης, ενδέχεται να επαναπροσλαμβάνονται από τον ξενιστή, ολοκληρώνοντας τη συμβιωτική σχέση. Ορισμένα πειράματα έδειξαν επίσης, ότι το μικροβίωμα συνδέεται με τη ρύθμιση ορμονών που αυξάνουν την όρεξη και προωθούν την υγιή ανάπτυξη (reviewed by Bonilla-Rosso and Engel 2018). Ιδιαίτερα, η πτωχή διατροφή και η έλλειψη τροφής βρέθηκαν ότι διαταράσσουν το μικροβίωμα και οδηγούν σε αυξημένη πιθανότητα ασθένειας και θνησιμότητας και φτωχή απόκριση σε συνθήκες περιβαλλοντικού, βιοτικού ή αβιοτικού στρες. Αν και δεν είναι ξεκάθαρο με ποιο τρόπο, διατάραξη του φυσιολογικού μικροβιώματος (δυσβίωση), φαίνεται να οδηγεί και σε μειωμένη αντίσταση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών (reviewed by Bonilla-Rosso and Engel 2018). Μάλιστα το *F. perrara* έχει συνδεθεί άμεσα με ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού, ενώ το *S. alvi* με προστασία έναντι παθογόνων (reviewed by Bonilla-Rosso and Engel 2018).

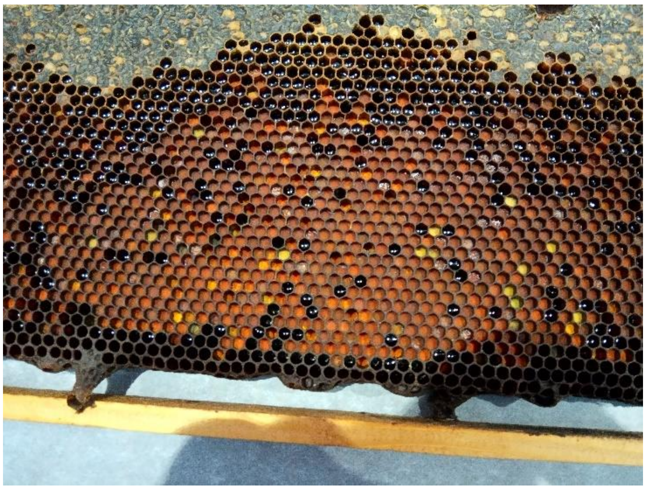
1.2 Το μελισσόψωμο και το μικροβίωμα του

1.2.1 Τι είναι το μελισσόψωμο

Το μελισσόψωμο (Beebread/BB) είναι στην ουσία γύρη (Pollen), που έχει συλλεχθεί (Bee-collected pollen/BCP), έχει υποστεί επεξεργασία από τις μέλισσες και έχει αποθηκευτεί στις κερήθρες της κυψέλης. Εκεί, υπόκειται σταδιακά ζύμωση, κυρίως από το γαλακτικό οξύ που παράγεται από τα διάφορα βακτήρια και ζύμες που το συνιστούν. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, το τελικό προϊόν, δηλαδή το ώριμο μελισσόψωμο, να αποτελείται από ένα ζυμωμένο μείγμα γύρης και σαλιού (πεπτικά ένζυμα) μελισσών, μικροποσοτήτων μελιού, κεριού και νέκταρος. Ανάλογα με τη δημοσίευση, το μελισσόψωμο μπορεί να αναφέρεται και ως ζυμωμένη γύρη (fermented pollen), παλαιωμένη γύρη (aged pollen) ή αποθηκευμένη/πακεταρισμένη γύρη (stored/packed pollen), ενώ παλαιότερα ήταν γνωστό και ως αμβροσία (ambrosia). Έχει αποχρώσεις καραμελένιες-πορτοκαλοκίτρινες (Εικόνα 2), και η γεύση του έχει περιγραφεί κατά κύριο λόγο ως όξινη ή γλυκόξινη. Τόσο το χρώμα όσο και η γεύση είναι χαρακτηριστικά που εξαρτώνται από τη βοτανική του προέλευση.

Όσον αφορά τη διαδικασία παραγωγής του, αρχικά οι ενήλικες τροφοσυλλέκτριες συλλέγουν κόκκους γύρης από διάφορα γυρεοφόρα. Ταυτόχρονα, χρησιμοποιούν μικρή ποσότητα αναμασημένου νέκταρος (το οποίο αποθηκεύεται προσωρινά στο μελιστόμαχο), και σάλιου για να ενώσουν τους κόκκους, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός μικρού σφαιριδίου (pellet) το οποίο αποθηκεύουν προσωρινά στο καλάθι γύρης που διαθέτουν ανατομικά (corbicular/pollen basket) (Εικόνα 3). Κατά την επιστροφή τους στην κυψέλη, το σφαιρίδιο αυτό εναποτίθεται σε μια από τις άδειες κερήθρες και συγκεκριμένα σε άδειες κερήθρες μεταξύ αυτών που στεγάζουν τους απογόνους (brood: αυγά-προνύμφες-πλαγγόνες) και αυτών του μελιού. Αυτό γίνεται, έτσι ώστε οι νεογέννητες και οι λίγων ημερών-παραμάνες ενήλικες μέλισσες (nurse bees), να έχουν άμεση πρόσβαση στο μελισσόψωμο προς κατανάλωση, αλλά και για το τάισμα των γόνων.

Μετά την εναπόθεση, οι μέλισσες εντός της κυψέλης (μέσης ηλικίας ή νεαρές ενήλικες), προσθέτουν μέλι ή/και αδενικές εκκρίσεις (κυρίως σιελογόνων αδένων, σάλιο/ένζυμα, οργανικά οξέα) στα σφαιρίδια και τα ωθούν βαθιά εντός της κερήθρας σπρώχνοντας τα με την κεφαλή τους ώστε να πακεταριστούν καλά (Εικόνα 2). Η ζύμωση διαρκεί περίπου 2 εβδομάδες, μετά το πέρας των οποίων το μελισσόψωμο μπορεί να διατηρηθεί για αρκετούς μήνες, καθώς το υψηλό ποσοστό γαλακτικού οξέος (αυξημένο pH) και άλλων μεταβολιτών/αντιμικροβιακών ουσιών, το προστατεύουν από αλλοίωση από μικροοργανισμούς.



Εικόνα 2: Μελισσόψωμο πακεταρισμένο στις κερήθρες

Για τις μέλισσες, η γύρη και το μελισσόψωμο αποτελούν την πρωταρχική πηγή πρωτεινών, λιπιδίων και λοιπών συστατικών υψηλής διατροφικής αξίας, ενώ το νέκταρ και το μέλι είναι οι πρωταρχικές πηγές υδατανθράκων (reviewed by Brodschneider et al., 2010). Τα αποθέματα μελισσόψωμου εξαντλούνται ταχύτατα, κυρίως τους χειμερινούς μήνες, κατά τους οποίους και οι ενήλικες μέλισσες παραμένουν στην κυψέλη και δεν τροφοσυλλέγουν (reviewed by Brodschneider et al., 2010).

Εικόνα 3: *Apis mellifera* με "καλάθι γύρης" γεμάτο γύρη, επιστρέφοντας στην κυψέλη

(By Muhammad Mahdi Karim - Own work, GFDL 1.2, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=6699147)

1.2.2 Διατροφική αξία φρεσκοσυλλεγμένης γύρης και μελισσόψωμου

Τόσο η φρεσκοσυλλεγμένη γύρη όσο και το μελισσόψωμο έχουν υψηλή διατροφική αξία και περιέχουν βιοδραστικές ενώσεις οι οποίες έχουν θετικό αντίκτυπο στην υγεία του ανθρώπου γι' αυτό και θεωρούνται ''λειτουργικά τρόφιμα''.

Είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, βασικά αμινοξέα, σάκχαρα, ωμέγα-3 και ω-6 λιπαρά οξέα, βιταμίνες, μέταλλα και ιχνοστοιχεία. Παράλληλα περιέχουν πολυφαινολικές ενώσεις οι οποίες έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Συμπληρωματικά, διαθέτουν άλλες ουσίες όπως προβιοτικά και πρεβιοτικά, φυτικές ίνες, οργανικά οξέα, καροτενοειδή, βιοδραστικά πεπτίδια, οργανικά οξέα, ένζυμα, ορμόνες, φυσικά αντιβιοτικά, λιγνάνες και τριτερπένια (Bakour et al., 2019; Mărgăoan et al., 2019; Dranca et al., 2020; reviewed by Khalifa et al., 2020; reviewed by Didaras et al., 2020).

Η ακριβής χημική τους σύσταση εξαρτάται από το είδος των φυτών από τα οποία συλλέγεται η γύρη και κατά συνέπεια και τη γεωγραφική τοποθεσία, την εποχή, τη σύσταση του χώματος και το κλίμα της περιοχής. Γι' αυτό και εντός μιας κυψέλης η σύσταση, άρα και η διατροφική αξία-ποιότητα μεταξύ δύο δειγμάτων μπορεί να διαφέρει σημαντικά (reviewed by Khalifa et al., 2020; reviewed by Didaras et al., 2020).

Τόσο η φρεσκοσυλλεγμένη γύρη όσο και το μελισσόψωμο έχουν αποδεδειγμένα -in vitro- αντιμικροβιακή δράση έναντι ευρέως φάσματος παθογόνων βακτηρίων και μυκήτων**.** Η ιδιότητα αυτή αποδίδεται -κυρίως- στην περιεκτικότητα πολυφαινολικών ενώσεων και ενδεχομένως σε αντιμικροβιακούς μεταβολίτες που παράγονται από το μικροβίωμα κατά τη ζύμωση. Πάραυτα και η αντιμικροβιακή δράση ποικίλει σημαντικά μεταξύ δειγμάτων και συνδέεται άμεσα με τη φυτοχημική και μικροβιακή σύσταση. (Bakour et al., 2019; reviewed by Khalifa et al., 2020; reviewed by Didaras et al., 2020).

Το σύνολο των συστατικών που αποκτά ή παράγει το μελισσόψωμο (ένζυμα, μικροβίωμα, αντιμικροβιακές ουσίες) και η ζύμωση που υπόκειται, όχι μόνο ευθύνονται για την συντήρησή του, αλλά και το καθιστούν πιο εύπεπτο, αυξάνουν τη βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών και προωθούν τη διατροφική του αξία (συγκριτικά με τη φρεσκοσυλλεγμένη γύρη) -σύμφωνα με κάποιες μελέτες (Vásquez and Olofsson 2009; DiCagno et al., 2019; reviewed by Khalifa et al., 2020; reviewed by Didaras et al., 2020).

Παρόλα αυτά δεν φαίνεται συμφωνούν όλοι οι ερευνητές, ότι γύρη κατά τη ζύμωση υπόκειται μετατροπή θρεπτικών συστατικών και ενζυματική πέψη, που οδηγούν σε αύξηση της διατροφικής αξίας του μελισσόψωμου. Προς υπεράσπιση αυτής της θεωρίας υπάρχουν ενδείξεις ότι οι μέλισσες προτιμούν να καταναλώνουν αποθηκευμένη γύρη ολίγων ημερών και ότι η ωρίμανση του μελισσόψωμου δεν το καθιστά απαραίτητα πιο εύπεπτο ή πιο θρεπτικό (Anderson et al., 2014; reviewed by Didaras et al., 2020).

1.2.3 Το μικροβίωμα του μελισσόψωμου

Με δεδομένο ότι το μελισσόψωμο αποτελεί μια από τις βασικές τροφές των μελισσών και των απογόνων τους, τότε και το μικροβίωμα του παίζει σημαντικό ρόλο στην διατροφή και την ανάπτυξη τους, καθώς και την καταπολέμηση παρασιτικών ασθενειών.

Μέχρι και σήμερα οι μελέτες σχετικά με το -μη παθογόνο- μικροβίωμα του μελισσόψωμου είναι περιορισμένες και διαφέρουν ως προς τη χρήση μεθοδολογιών. Με βάση τις διαθέσιμες μελέτες, μπορούν να εξαχθούν τα εξής συμπεράσματα:

Αρχικά, η σύσταση του μικροβιώματος του μελισσόψωμου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το στάδιο ωρίμανσης, την εποχή, τη γεωγραφική περιοχή και το είδος των γυρεοφόρων από όπου συλλέχθηκε η γύρη και σε μικρότερο βαθμό από το μικροβίωμα των μελισσών και των συστατικών που εισάγουν καθώς και του περιβάλλοντος του μελισσιού που το παράγουν. Η γύρη που συλλέγεται, ξεκινά να υπόκειται βιοχημικές και μικροβιολογικές αλλαγές της σύστασης της, από τη στιγμή που η μέλισσα προσγειώνεται στο γυρεοφόρο, αλλαγές που συνεχίζουν να συντελούνται για όσο χρόνο παραμένει αποθηκευμένο το μελισσόψωμο στις κερήθρες. Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι η αφθονία και η ποικιλότητα τόσο των μυκήτων όσο και των βακτηρίων, μειώνεται στο μελισσόψωμο με το πέρασμα του χρόνου. Αυτό πιθανώς συμβαίνει γιατί τα συστατικά της ζύμωσης (όπως γαλακτικό οξύ), μειώνουν το pH σε τιμές που δεν είναι ευνοϊκές για τα περισσότερα βακτήρια. Ένας επιπλέον λόγος είναι οι αντιμικροβιακές ουσίες που είτε προυπάρχουν λόγω των συστατικών του μελισσόψωμου (π.χ ένζυμα σάλιου μελισσών ή μελιού), είτε παράγονται από το οξεοανθεκτικό μικροβίωμα.

Ένα μικρό μέρος του μικροβιώματος της φρεσκοσυλλεγμένης γύρης και του μελισσόψωμου (<10% κατά περίπτωση), φαίνεται να είναι τα ίδια τα βακτήρια του γαστρεντερικού συστήματος των μελισσών (Saraiva et al., 2015; Mattila et al., 2012; Anderson et al., 2014). Δηλαδή, φαίνεται πως οι μέλισσες κατά τη συλλογή της γύρης, εισάγουν αυτά τα βακτήρια με διάφορους τρόπους. Ένας τρόπος ενδέχεται να είναι κατά το στάδιο συγκόλλησης των κόκκων γύρης με αναμασημένο νέκταρ και σάλιο από το μελιστόμαχο. Ένας δεύτερος τρόπος μπορεί να είναι η απευθείας επαφή και από το περιβάλλον της κυψέλης που οδηγεί σε μεταφορά αυτών των πληθυσμών βακτηρίων στο μελισσόψωμο κατά τη μεταφορά και την αποθήκευση του στις κερήθρες.

Ένα σημαντικό μέρος του βακτηριώματος του μελισσόψωμου είναι τα βακτήρια παραγωγής γαλακτικού οξέος (Lactic acid bacteria/LAB), μέλη των οποίων επίσης εντοπίζονται στο μελιστόμαχο και στο οπίσθιο έντερο των μελισσών (Vásquez and Olofsson 2009; DiCagno et al., 2019; Donkersley et al., 2018; Asama et al., 2015; Mattila et al., 2012; reviewed by Didaras et al., 2020). Σε αυτά περιλαμβάνονται -κυρίως- ορισμένα μέλη της Οικογένειας των Lactobacillaceae, Pasteurellaceae και των Γενών *Lactobacillus* (συχνότερα *L. kunkei*), *Bifidobacterium*, *Paralactobacillus*, *Bacillus*, *Fructobacillus*, *Oenococcus*, *Parasaccharibacter*, *Saccharibacter*. Τα LAB λειτουργούν ως αρχική καλλιέργεια (starter culture), για την έναρξη της ζύμωσης και ενδεχομένως συμβάλλουν στην αντιμικροβιακή δράση του μελισσόψωμου (Ενότητα 1.2.2).

Άλλα στελέχη που έχουν εντοπιστεί στο μελισσόψωμο και ενδεχομένως αποτελούν μέρος του κυρίως (core) βακτηρίωμα του, είναι αυτά των Ειδών *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Burkholderia*, *Paracoccus*, *Enterobacter* και άλλων υποχρεωτικά αναερόβιων της Τάξης Enterobacterales (*Enterobacter*, *Escherichia*/*Shigella*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Arsenophonus*, *Erwinia*, *Rosenbergiella*, *Buttiauxella*, *Pantoea*) (DiCagno et al., 2019; Donkersley et al., 2018; Asama et al., 2015; Mattila et al., 2012; reviewed by Didaras et al., 2020; Disayathanoowat et al., 2020).

Σχετικά με τους μύκητες, ένας αριθμός ζυμών συνεργούν με τα LAB βακτήρια, προς παραγωγή ουσιών ζύμωσης. Πολλές ζύμες-μέλη του Φύλου Ascomycota έχουν βρεθεί σε αφθονία στο μελισσόψωμο. Ιδιαίτερα, μέλη της Οικογένειας Saccharomycetaceae, και των Γενών *Cladosporium*, *Penicillum*, *Botrytis*, *Aspergillus*, *Alternaria* (Gilliam 1997; Disayathanoowat et al., 2020). Σε λιγότερη αφθονία έχουν επίσης βρεθεί μέλη του Φύλου Basidiomycota, και Γένους *Rhodosporidium*. Οι ζύμες, φαίνεται είναι απαραίτητες για την αποτελεσματική ζύμωση του μελισσόψωμου και ο πληθυσμός τους παραμένει σταθερός στα πρώτα στάδια της ζύμωσης, αν και μειώνεται στη συνέχεια (Disayathanoowat et al., 2020; DiCagno et al., 2019). Εκτός από τη συμβολή τους στη ζύμωση, κάποιοι από τους μήκυτες φαίνεται να παράγουν οργανικά οξέα, πρωτεάσες και άλλες ουσίες με αντιμικροβιακές οι ιδιότητες τα οποία λειτουργούν κατασταλτικά έναντι βακτηρίων στο μελισσόψωμο και αποτρέπουν την ανάπτυξη παθογόνων (Disayathanoowat et al., 2020).

1.3 Μικροσπορίδια *Nosema ceranae* και *Nosema apis*

Τα *Nosema ceranae* και *Nosema apis* είναι παρασιτικά μικροσπορίδια τα οποία ευθύνονται για μια ασθένεια της *Apis mellifera*, γνωστή ως Νοζεμίαση (Νοσεμίαση, Nosemosis/Nosemiasis), η οποία μπορεί να οδηγήσει σε αποδυνάμωση αλλά και ολική εξόντωση του μελισσιού.

1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά Μικροσποριδίων

Ο όρος μικροσπορίδια αναφέρεται σε μια ομάδα μονοκύτταρων -υποχρεωτικά ενδοκυτταρικών- ευκαρυωτικών παρασίτων. Η πλειοψηφία των μικροσποριδίων μολύνουν ευκαρυωτικούς οργανισμούς, σπονδυλωτά και ασπόνδυλα ζώα συμπεριλαμβανομένων του ανθρώπου, εξημερωμένων θηλαστικών, ψαριών και εντόμων εμπορικής σημασίας. Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί 1300-1500 είδη (species) σε πάνω από 220 γένη (genera) (Han and Weiss, 2017).

Τα μικροσπορίδια δεν μπορούν να διαιρεθούν και να μεγαλώσουν έξω από τα κύτταρα του ξενιστή. Τα περισσότερα δεν διαθέτουν μιτοχόνδρια και μεταβολικά μονοπάτια που σχετίζονται με την παραγωγή ενέργειας και την παραγωγή αμινοξέων και νουκλεοτιδίων, επομένως ο μόνος τρόπος παραγωγής ATP είναι η γλυκόλυση. Ορισμένα μάλιστα έχουν χάσει και την ικανότητα να συνθέτουν ATP, με αποτέλεσμα να εξαρτώνται σχεδόν εξ ολοκλήρου από τον ξενιστή, για τις ενεργειακές τους ανάγκες. Αυτό το επιτυγχάνουν με την επιστράτευση των μιτοχονδρίων του ξενιστή, και τη χρήση ειδικών πρωτεϊνών-μεταφορέων με τους οποίους ''κλέβουν'' το ATP (reviewed by Han and Weiss, 2017).

Την τελευταία δεκαετία έχει γίνει γενικώς αποδεκτό από τους ταξινομητές, τα Μικροσπορίδια να κατατάσσονται ως μονοφυλετική ομάδα (Phylum: Microsporidia) εντός του Βασιλείου των Μυκήτων ή ως στενοί συγγενείς των Μυκήτων (Βασίλειο Πρωτίστων) στον Τομέα των Ευκαρύων. Παράλληλα η ταξινόμηση και εντός των κλάδων του Φύλου δεν έχει ξεκαθαριστεί καθώς οι εξελικτικές αποστάσεις και οι φυλογενετικές σχέσεις των συμπεριλαμβανομένων ειδών είναι αντικείμενο διαφωνιών μεταξύ των ερευνών (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Συστηματική ταξινόμηση *Nosema* spp.

Τομέας (Domain)	Eukaryota
Υπερ-ομάδα (Super-groupήDivision)	Opisthokonta (Cavalier-Smith 1987)
Υπερ-βασίλειο (Super-Kingdom)	Nucletmycea (Brown et al. 2009)/ Holomycota (Liu et al. 2009)
Βασίλειο (Kingdom)	Fungi (Whitaker 1959)/ Opisthosporidia ή Protista (Haeckel 1866)
Υπο-βασίλειο (Subkingdom) (μόνο αν ακολουθείται η κατάταξη κατά Tedersoo 2018)	Rozellomyceta (Tedersoo 2018)
Φύλο (Phylum)	Microsporidia (Balbiani 1882) (ως μονοφυλετικό group) ή Rozellomycota (Tedersoo 2018)
Υπο-φύλο (Subphylum) (μόνο αν ακολουθείται η κατάταξη κατά Tedersoo 2018)	Rozellomycotina (Tedersoo 2018)
Ομοταξία (Class)	Microsporidea (Delphy 1963)
Τάξη (Order)	Nosematida (Labbé 1899)
Οικογένεια (Family)	Nosematidae (Labbé 1899)
Γένος (Genus)	*Nosema* (Nägeli 1857) ή *Vairimorpha* (Pilley 1976, Tokarev 2020)

1.3.2 Ιστορική εμφάνιση, τρόποι μετάδοσης, μολυσματικότητα, εποχικότητα και συχνότητα μολύνσεων, μικροσποριδίων *Nosema apis* και *ceranae* στην *A. mellifera*

Το *N. apis* εντοπίστηκε το 1909 από τον Zander Enoch και περιεγράφηκε εκτενώς από τον Ingemar Fries και συνεργάτες, το 1993. Μολύνσεις από *N. apis* στην *A. mellifera* εντοπίζονται πλέον σε παγκόσμιο επίπεδο.

Λίγα χρόνια αργότερα, το 1996, η ομάδα του Fries περιέγραψε ένα νέο είδος μικροσποριδίου, το *N. ceranae* που εντοπίστηκε ως παράσιτο αποκλειστικά στις Ασιατικές/Ανατολικές μελιτοφόρες μέλισσες (Eastern honey bees), *Apis cerana* (Πεκίνο, Κίνα) από όπου πήρε και το όνομα του (Fries et al., 1996). Σταδιακά όμως φαίνεται να πέρασε με φυσικό τρόπο σε αποικίες της *Apis mellifera*, καθώς εντοπίστηκε αρχικά στην Ασία (Ταϊβάν,2005) και στη συνέχεια στην Ευρώπη (Ισπανία, 2005) Έκτοτε η παρουσία του στην *A. mellifera* έχει επιβεβαιωθεί παγκοσμίως από διάφορες ερευνητικές ομάδες και φαίνεται να εξακολουθεί να επεκτείνεται γεωγραφικά (reviewed by Martín-Hernández et al., 2018; reviewed by Paris et al., 2018). Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι παρόλο που πρωταρχικός ξενιστής του *N. ceranae* θεωρείται η *A. cerana*, πλέον υπάρχουν ενδείξεις ότι το παράσιτο προϋπήρχε δεκαετίες του εντοπισμού του, έχοντας εξαπλωθεί γεωγραφικά, αλλά και μεταξύ διαφορετικών ειδών ξενιστών (reviewed by Martín-Hernández et al., 2018; reviewed by Paris et al., 2018).

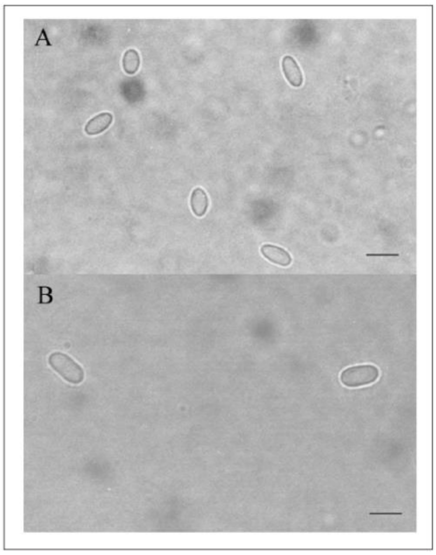
Τα μικροσπορίδια του γένους Nosema έχουν την ιδιότητα να σχηματίζουν σπόρια μέσω των οποίων μεταδίδονται στους ξενιστές -και μεταξύ αυτών- καθώς το σπορίδιο μπορεί να επιβιώνει εκτός των κυττάρων. Κατά συνέπεια, οι κύριοι τρόποι μετάδοσης των μικροσποριδίων *N. apis* και *ceranae* στις μέλισσες, είναι η κατάποση των ώριμων ανθεκτικών σπορίων μέσω μολυσμένης τροφής ή νερού εντός και εκτός της κυψέλης, μεταξύ των μελισσών κατά την ανταλλαγή τροφής (τροφάλλαξη) ή κατά τον καθαρισμό (grooming) (reviewed by Paris et al.,2018). Οι σπόροι του παρασίτου μπορούν επίσης να συσσωρευτούν στα κόπρανα να μεταδοθούν μεταξύ των μελισσών, ιδιαίτερα όταν η μόλυνση προκαλεί διάρροια, όπως συμβαίνει με το *N. apis*. Και τα δύο είδη μπορούν να μολύνουν όλες τις κάστες της κυψέλης, δηλαδή εργάτριες/τροφοσυλλέκτριες, παραμάνες και μεγάλης ηλικίας, βασίλισσες, κηφήνες και γόνους (reviewed by Paris et al.,2018).

Ο βιολογικός κύκλος, η ικανότητα των παρασίτων *Nosema* spp. να αναπαράγονται -άρα και η μολυσματική τους ικανότητα- εξαρτώνται από τη θερμοκρασία. Το *N. ceranae* έχει μεγαλύτερη αντοχή στης υψηλές θερμοκρασίες (ως και 60°C), αλλά όχι στις χαμηλές (Fries 2010, OIE 2018). Το αντίστροφο ισχύει για το *N. apis*. Κάποιες μελέτες έχουν παρατηρήσει μεγαλύτερο αριθμό σπορίων (spore load/parasite load) *N. ceranae* στους ξενιστές σε σχέση με αυτών του *N. apis*, άρα το *N. ceranae* θεωρείται πιο μεταδοτικό/μολυσματικό.

Ως αποτέλεσμα, το εύρος και η συχνότητα των μολύνσεων από *N. ceranae* φαίνεται να έχει αυξηθεί στις νότιο-Ευρωπαϊκές Μεσογειακές χώρες με ήπιο και ζεστό κλίμα όπου η εξάπλωση του ευνοείται -σε σημείο που να έχει εκτοπίσει το *N. apis*. Αντιθέτως, στις βόρειο-Ευρωπαϊκές χώρες, το *N. apis* φαίνεται να επικρατεί και αυτό πιθανώς οφείλεται στην αντοχή του *N. apis* σε χαμηλές θερμοκρασίες, κάτι που δεν ισχύει για το *N. ceranae*

1.3.3 Χαρακτηριστικά, μορφολογία και κύκλος ζωής μικροσποριδίων *Nosema apis* και *ceranae*

Το εύρος μεγέθους των σπορίων του *Nosema apis* είναι περίπου 4-6μm μήκος και 2-4 μm πλάτος και το σχήμα τους οβάλ συμμετρικό με στρογγυλεμένα άκρα (Εικόνα 4). Τα σπόρια του *Nosema ceranae* είναι κατά προσέγγιση 20% μικρότερα από του *Nosema apis*, με εύρος μήκους 3,3-5,5μmκαι πλάτους 2,3-3μm, σχήμα λιγότερο οβάλ και περισσότερο αμυγδαλωτό, δηλαδή λιγότερο συμμετρικό με ελαφρά καμπύλη και πιο ‘’οξεία’’ άκρα (Εικόνα 4). Λόγω των μορφολογικών ομοιοτήτων μεταξύ των *Nosema* spp. (ειδών), η διαφοροποίηση μεταξύ των σπορίων τους με μεθόδους μικροσκοπίου (οπτικό, ηλεκτρονικό, ηλεκτρονικό σάρωσης) αποτελεί πρόκληση. Αυτό δυσχεραίνει όχι μόνο την έρευνα αλλά και στην πράξη την έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία των μελισσιών σε μελισσοκομεία. Ο καλύτερος πλέον τρόπος διάγνωσης είναι η μοριακή τεχνική PCR.



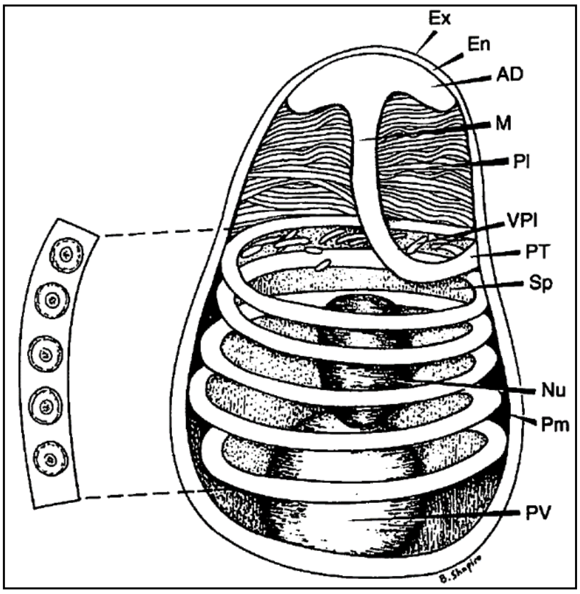
Εικόνα 4: Σπόρια *N. apis* (A) και *N. ceranae* (B) σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

(Bar=5μm) (Fries et al., 2010)

Το κάλυμμα του σπόρου των μικροσποριδίων (γενικότερα), περιλαμβάνει ένα εξωτερικό τοίχωμα (Ex), ηλεκτρονιακά πυκνό, απαρτιζόμενο από συμπαγές πλέγμα γλυκοπρωτεϊνικής δομής, όπως επίσης και ένα ηλεκτρονιακά αραιό/διαυγές εσωτερικό τοίχωμα (En) που συνίσταται από χιτίνη και άλλες πρωτεΐνες και τέλος μια λεπτή εσωτερική πλασματική μεμβράνη (reviewed by Han and Weiss 2017).

Αντιπροσωπευτικό χαρακτηριστικό των μικροσποριδίων, αποτελεί ο πολικός σωλήνας (PT)/πολικό νημάτιο (PF). Το πολικό νημάτιο (polar filament) των σπορίων του *Nosema ceranae* είναι οργανωμένο σε μικρότερο αριθμό σπειρών (18-23) σε σχέση με του *Nosema apis* (23-32, συνήθως >30) (Εικόνα 5)

Ένα άλλο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των μικροσποριδίων αποτελεί ο πυρήνας που εντοπίζεται στο σποροπλασμα και μπορεί να έχει μορφή μονοκάρυου (monokaryote) -δηλαδή ενός ομοιόμορφου πυρήνα- ή διπλοκάρυου (diplokaryote) –δηλαδή δύο όμοια ενωμένα αντίγραφα-όπως συμβαίνει στα *Nosema* spp.



Εικόνα 5: Δομή ενός σπόρου των Μικροσποριδίων

(Ex=exospore): εξωσπόριο-εξωτερικό τοίχωμα σπόρου, (En=endospore): ενδοσπόριο-εσωτερικό τοίχωμα σπόρου,(Pm=plasma membrane): πλασματική μεμβράνη, (Sp=sporoplasm): σποροπλασμα που εμπεριέχει έναν πυρήνα(Nu=nucleus), ριβοσώματα και το οπίσθιο κενοτόπιο (PV=posterior vacuole).Το πολικό νημάτιο (PT=polar tubeή polar filament)είναι προσαρτημένο στο εμπρόσθιο άκρο του σπόρου με τη βοήθεια ενός δίσκου αγκύρωσης (AD=anchoring disk) και διαχωρίζεται σε δύο περιοχές: την ίσια περιοχή (M=manubrium) και την οπίσθια περιοχή όπου σχηματίζει σπείρες γύρω από το σποροπλασμα, ο αριθμός των οποίων εξαρτάται από το είδος του μικροσποριδίου. Ηίσια περιοχή του πολικού νηματίου περιβάλλεται από δύο μεμβρανοειδείς δομές, τους πολαροπλάστες (Pl=lamellar polaroplast, VPl=vesicular polaroplast) (Han and Weiss 2017)

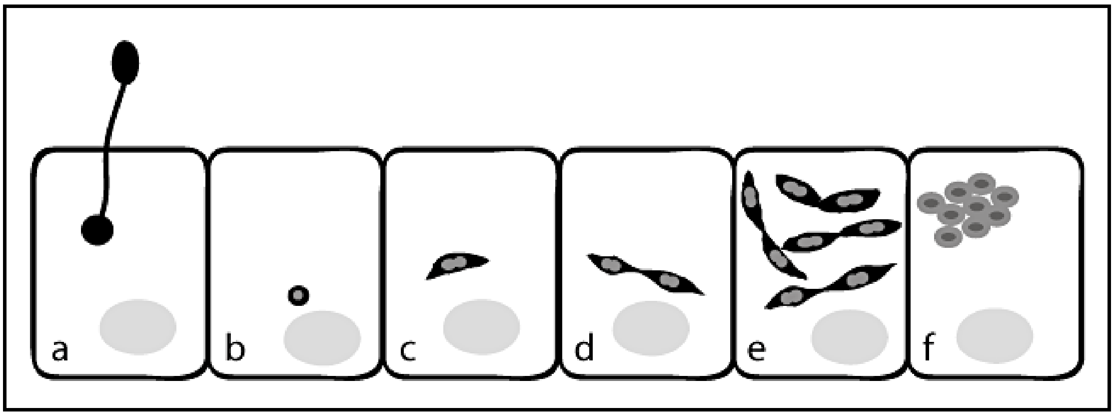
Ο κύκλος ζωής των μικροσποριδίων, ξεκινά με την εξωκυττάρια φάση (μολυσματική), κατά την οποία οι ώριμοι, ανθεκτικοί σπόροι που υπάρχουν στο περιβάλλον, εισέρχονται στον ξενιστή -μέσω εισπνοής ή κατάποσης και εγκαθίστανται -στην περίπτωση των *Nosema* spp. στα επιθηλιακά κύτταρα του μέσου εντέρου (ventriculus ή midgut). Εκεί, εάν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές, τα σπόρια ''βλασταίνουν'' (germinate) και γίνεται εκρηκτική αποβολή του πολικού σωλήνα και διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης του κυττάρου του ξενιστή. Τότε το σποροπλασμα ταξιδεύει δια μέσω του πολικού σωλήνα και εισέρχεται, στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή (Εικόνα6α) (Cali et al., 2017).

Ακολούθως, ξεκινά η ενδοκυττάρια πολλαπλασιαστική φάση (μερογονία), όπου το σποροπλασμα διαιρείται (binary division) σε μερόνια (ή μερόντες/meronts) τα οποία με τη σειρά τους πραγματοποιούν αρκετούς πολλαπλασιαστικούς κύκλους πριν περάσουν στην επόμενη φάση του κύκλου. Στην περίπτωση του *Nosema ceranae* τα μερόνια έχουν σχήμα αδραχτιού (spindle) και σχηματίζουν ζεύγη (Εικόνα 6c,d,e) (Gisder et al., 2011).

Τελική φάση του κύκλου ζωής αποτελεί η παραγωγή ωρίμων σπορίων(σπορογονία), που επίσης συντελείται ενδοκυτταρικά. Η μεμβράνη των μερονίων γίνεται πιο πυκνή και συμπαγής και σχηματίζονται τα σπορόνια (sporonts) (Εικόνα 6e) και στη συνέχεια οι σποροζωίτες (sporoblasts) μετά από διαχωρισμό. Οι σποροζωίτες, αναπτύσσονται σε πρωταρχικούς/βασικούς (primary)οι οποίοι μπορούν να μολύνουν γειτονικά κύτταρα και σε ώριμους σπόρους οι οποίοι μπορούν να απελευθερωθούν στο εξωκυττάριο περιβάλλον (Cali et al., 2017).

Στο *N. ceranae* οι ενδοκυττάριες φάσεις ολοκληρώνονται εντός 96 ωρών (Gisder et al., 2011). Στο *N. apis* το σχήμα τον μερονίων εμφανίζει μεγαλύτεροι ποικιλομορφία και μπορεί να είναι είτε σαν αδράχτι (spindle) είτε στρογγυλό-οβάλ.

Εικόνα 6: Κύκλος ζωής μικροσποριδίου *N. ceranae* εντός του κυττάρου ξενιστή



(a) διείσδυση του σποροπλάσματος εντός του κυττάρου-ξενιστή δια μέσου του πολικού σωλήνα, (b) το σπορόπλασμα εντός του κυττάρου-ξενιστή, (c) μερόνια με σχήμα αμυγδαλωτό-αδρακτιού (spindle), (d) μερόνια μετά από διαίρεση σε ζεύγη, (e) σπορόνια σε ζεύγη, (f) στρογγυλοί-οβάλ σποροζωίτες (Gisder et al., 2011).

1.4 Νοζεμίαση και παθογένεια *Nosema* spp. στην *A. mellifera*

Το *Nosema apis* προκαλεί Νοζεμίαση τύπου A ενώ το *Nosema ceranae*, τύπου C (Higes et al., 2010).

Η Νοζεμίαση τύπου A είναι συνήθως –αλλά όχι πάντα- συμπτωματική, με συμπτώματα που περιλαμβάνουν διάρροια εντός και εκτός της κυψέλης, εξασθενημένες μέλισσες, μειωμένη παραγωγή μελιού και αυξημένη θνησιμότητα ιδιαίτερα το χειμώνα (γιατί το *N. apis* έχει αυξημένη αντοχή σε χαμηλές θερμοκρασίες) και την άνοιξη.

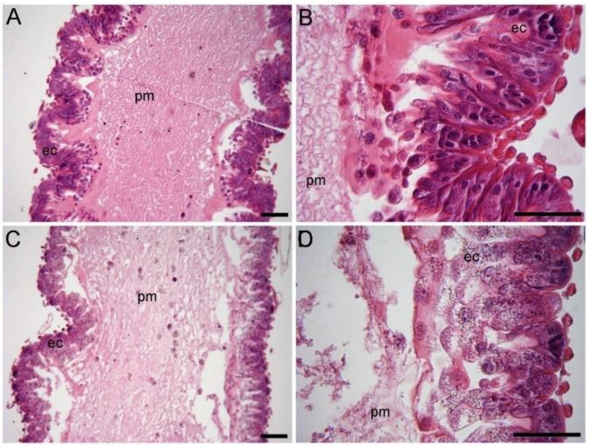
Αντίθετα η Νοζεμίαση τύπου C δεν έχει εξωτερικά ορατά συμπτώματα όπως η διάρροια αλλά συνδέεται επίσης με υποκλινικά συμπτώματα όπως χαμηλή παραγωγικότητα (μελιού, κερηθρών), εξασθένηση των μελισσιών και δραματική αύξηση των θανάτων ιδιαίτερα το φθινόπωρο και χειμώνα (Botías et al., 2013; Higes et al., 2008; Paxton et al., 2010). Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι η μόλυνση από *N. ceranae* επηρεάζει-αρνητικά- την συμπεριφορά και την φυσιολογία, ιδιαίτερα των τροφοσυλλεκτριών μελισσών και κατά συνέπεια και του μελισσιού ως σύνολο. Λόγω των μη εμφανών συμπτωμάτων, η ασθένεια συχνά περνά απαρατήρητη από τους μελισσοκόμους με αποτέλεσμα να μην γίνεται έγκαιρη έναρξη θεραπείας.

Η Νοζεμίαση τύπου C δεν είναι απαραίτητα θανατηφόρα και δεν οδηγεί πάντα σε αποδυνάμωση του μελισσιού, ενώ μπορεί να παραμένει ανενεργή για μεγάλα χρονικά διαστήματα (reviewed by Paris et al., 2018). Στην πραγματικότητα, η πρόγνωση της είναι αλληλοσυνδεμένη με παράγοντες όπως οι μελισσοκομικές πρακτικές, οι περιβαλλοντικές συνθήκες, τα γενετικά χαρακτηριστικά μελισσών αλλά και του παρασίτου (π.χ πολυμορφισμός μολυσματικής ικανότητας), τη διατροφή των μελισσών, τα παρασιτοκτόνα/αγροχημικά καθώς και την αλληλεπίδραση με άλλα παράσιτα (reviewed by Paris et al., 2018). Για το λόγο αυτό, συνδυασμός Νοζεμίασης με παράγοντες που επηρεάζουν αρνητικά την υγεία των μελισσών, μπορεί να οδηγήσουν σε απότομη και ολική κατάρρευση του μελισσιού (Colony Collapse Disorder/CCD). Για παράδειγμα, υπάρχουν ισχυρότερες CCD σε χώρες και περιοχές με ήπιο και ζεστό κλίμα που ευνοούν την ανάπτυξη του *N.ceranae* (Botías et al., 2013; Higes et al., 2008; reviewed by Paxton et al., 2010).

1.4.1 Επίδραση Νοζεμίασης στην υγεία της *A. mellifera*

Στις περισσότερες μελέτες σε -ελεγχόμενα και μη- πειράματα σημειώθηκαν μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας των εργατριών μελισσών με *N. ceranae* σε σχέση με τις φυσιολογικές ή ακόμη και με *N. apis*. Μόνο σε λίγες μελέτες δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στην θνησιμότητα (reviewed by Martín-Hernández et al., 2018). Η μείωση του προσδόκιμου ζωής προκύπτει ως αποτέλεσμα της γενικότερης επίδρασης του *N. ceranae* στην φυσική κατάσταση των μελισσών

Συγκεκριμένα, το *N. ceranae* προκαλεί εκφυλισμό του ιστού του μέσου εντέρου και αποτρέπει την κυτταρική ανανέωση (Εικόνα 7). Σύμφωνα με μια έρευνα, αυτό μπορεί να είναι αποτέλεσμα της υπο-έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την ομοιόσταση και μορφογένεση ιστών, καθώς και γονίδια κυτταρικής επικοινωνίας αλλά και γονίδια του εντερικού νευρικού συστήματος, που προκαλείται από το *N. ceranae* (Dussaubat et al., 2012).



Εικόνα 7: Ιστολογική απεικόνιση μέσων εντέρων (midguts) μελισσών *A. mellifera*, 7 ημέρες μετά την μόλυνση

Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου, μαρτύρων (A, B) και μολυσμένων με *N. ceranae* (C, D) μέσων εντέρων (midgets), με χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης. Στους μάρτυρες (controls), η περιτροφική μεμβράνη (pm) και τα επιθηλιακά κύτταρα (ec) είναι ομοιογενή, ενώ στα παρασιτισμένα μέσα έντερα η μεμβράνη εμφανίζει σημάδια εκφυλισμού, ενώ τα κύτταρα, λύσης (Bar = 10μm) (Dussaubat et al., 2012).

Όπως αναφέρθηκε στις ενότητες 1.1.3 και 1.1.4, οι μέλισσες καταναλώνουν τροφές που απαιτούν εκτεταμένη επεξεργασία από τα ένζυμα και το μικροβίωμα του γαστρεντερικού συστήματος, προκειμένου να απελευθερωθεί η ενέργεια που εμπεριέχουν.

Το *N. ceranae* προσβάλλει το στομάχι (μέσο έντερο-midgut) της *A. mellifera*, όπου φαίνεται να προκαλεί αλλαγές στο μεταβολισμό των υδατανθράκων του ξενιστή. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και ATP προς όφελος του παρασίτου. Οι αλλαγές αυτές περιλαμβάνουν υπερέκφραση ποικίλων γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό σακχάρων και αντικατοπτρίζονται κλινικά ως θρεπτικό και ενεργειακό στρες. Οι τροφοσυλλέκτριες/εργάτριες μέλισσες εμφανίζονται πιο πεινασμένες και καταναλώνουν περισσότερη ζάχαρη, ιδιαίτερα τις πρώτες μέρες τις μόλυνσης, παρόλα αυτά δεν φαίνεται να μπορούν να αξιοποιήσουν το πλεόνασμα –αφού υποκλέπτεται από το παράσιτο. Το θρεπτικό και ενεργειακό στρες ενδεχομένως να συνδέεται -άμεσα ή έμμεσα- με την αυξημένη θνησιμότητα κατά τη συλλογή τροφής, τη δυσκολία κατά την πτήση και την η τάση αναζήτησης τροφής νωρίτερα ηλικιακά (reviewed by Martín-Hernández et al., 2018).

Διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν επιβεβαιώσει την μειωμένη (ή μη υπαρκτή) έκφραση γονιδίων και ουσιών σχετικών με το ανοσοποιητικό σε -ενήλικες εργάτριες- μέλισσες με *N. ceranae*. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει ότι το παράσιτο προκαλεί καταστολή του ανοσοποιητικού, ώστε να επιτύχει αναπαραγωγή εντός του ξενιστή (reviewed by Martín-Hernández et al., 2018).

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων-Μοριακής Βακτηριολογίας–Ιολογίας κατά το χρονικό διάστημα Οκτωβρίου-Νοεμβρίου 2021, έγινε απομόνωση του γενετικού υλικού από έξι δείγματα μελισσόψωμου και έξι δείγματα μελισσών. Τα δείγματα αυτά προέρχονταν από 6 διαφορετικά μελίσσι, αριθμημένα ως εξής: 11, 12, 14, 15, 27, 112. Σε τρία από αυτά τα μελίσσια (12, 27, 112) είχε προηγουμένως εντοπιστεί -στατιστικά σημαντική- μόλυνση από *Nosema ceranae*. Συγκεκριμένα, ο αριθμός σπορίων είχε μετρηθεί, από συνεργάτες του εργαστηρίου με επικεφαλή την κ. Φανή Χατζήνα, στο Ινστιτούτο Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής (ΕΛΓΟ «ΔΗΜΗΤΡΑ») (Πίνακας 4). Η προσβολή από *N. ceranae* (έναντι *N. apis*) στα συγκεκριμένα δείγματα είχε επίσης επιβεβαιωθεί στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων το Σεπτέμβριο του 2021, με PCR και χρήση εκκινητών ειδικών για το παράσιτο. Μετά την απομόνωση του γενετικού υλικού, έγινε ενίσχυση του με PCR, με χρήση εκκινητών (primers), ειδικών για τις περιοχές του DNA που αντιστοιχούν στα γονίδια που κωδικοποιούν τα 16S rRNA των περισσότερων βακτηρίων και μυκήτων. Τα προϊόντα της PCR αξιολογήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, για την επιβεβαίωση της ύπαρξης βακτηρίων και μυκήτων στα εκχυλίσματα ολικού γενετικού υλικού από τα 12 δείγματα.

Πίνακας 4: Προσβολή από Νοζεμίαση: Αριθμός σπορίων / μέλισσα

Αριθμός μελισσιού	Δεκ. 2020	Μάρτιος 2021
11	6.000[a]	6.000
14	7.500	24.000
15	12.000	39.000
12	8.000	4.500.000
27	1.200.000	2.800.000
112	3.000	4.200.000

[a] Θεωρούμε πολύ μικρή την προσβολή μέχρι και 500.000 σπόρια *N. ceranae* ανά μέλισσα και μέτρια την προσβολή μέχρι και 2.000.000 σπόρια.

2.1 Απομόνωση γενετικού υλικού από μελισσόψωμο και μέλισσες

Για την απομόνωση του συνόλου του γενετικού υλικού από τα δείγματα μελισσόψωμου και μελισσών, έγινε χρήση ενός τροποποιημένου πρωτοκόλλου με βάση το πρωτόκολλο του Casas και συνεργατών (Casas et al., 1995).

Στο παρών πρωτόκολλο γίνεται αρχικά προεργασία του δείγματος με διάλυμα πρωτεϊνάσης Κ που έχει την ιδιότητα να καταστρέφει τις διάφορες ελεύθερες ουσίες (πρωτεΐνες γλυκοπρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες κ.α) και κυρίως τις νουκλεάσες (RΝάσες, DΝάσες) που θα μπορούσαν να προκαλέσουν κατακερματισμό των νουκλεϊκών οξέων αλλά και να αναστείλουν την PCR που πραγματοποιείται στα επόμενα στάδια. Η πρωτεϊνάση Κ, αναμιγνύεται πρώτα με ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) Tris-EDTA το οποίο έχει ρυθμιστεί σε pH=7, ώστε να εξασφαλίζεται η διάλυση των μεγάλων κομματιών των δειγμάτων (ΒΒ, μέλισσες) σε ένα ουδέτερο pH που δεν προκαλεί αλλοιώσεις στα βιολογικά υλικά.

Στη συνέχεια, γίνεται πέψη με διάλυμα που περιέχει τον χαοτροπικό παράγοντα GuSCN, το οποίο εκτός από τη λύση των κυτταρικών τοιχωμάτων, προστατεύει και το γενετικό υλικό από τη δράση των διαφόρων νουκλεασών. Αναλυτικά το διάλυμα αυτό εμπεριέχει: GuSCN 4M, N-lauroyl sarcosine 0.5%, Dithiothreitol (DTT) 1mM, Κιτρικό Νάτριο 25mM

Για την κατακρήμνιση του γενετικού υλικού, γίνεται προσθήκη γλυκογόνου μετά τη λύση, που είναι αδιάλυτο στα διαλύματα αιθανόλης/ισοπροπανόλης (περιεκτικότητας άνω των 70%). Το γλυκογόνο είναι ένας πολυσακχαρίτης (μονομερές: γλυκόζη) μεγάλου μοριακού βάρους, που είναι θετικά φορτισμένος, και επομένως περιβάλει τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα σχηματίζοντας ένα pellet (ίζημα σφαιριδίου) το οποίο καθιζάνει μετά τη φυγοκέντρηση. Έτσι, μπορεί να γίνει απόρριψη του υπερκειμένου και λήψη του γενετικού υλικού/pellet το οποίο επαναδιαλύεται σε διπλά απεσταγμένο νερό.

2.1.1 Παραλλαγές πρωτοκόλλου για την απομόνωση του γενετικού υλικού από μελισσόψωμο και μέλισσες

1η παραλλαγή για ΒΒ:

- 100mg δείγματος ΒΒ (μελισσόψωμου)/ 250μl Buffer Tris-EDTA
- 30μl πρωτεϊνάση Κ (10mg/ml)/ 1 ml Buffer Tris-EDTA
- 200μl δείγματος-Buffer-πρωτεϊνάσης Κ σε 600μl Lysis Buffer
- Λήφθηκε όλο το υπερκείμενο εκτός από το ίζημα και την άνω στοιβάδα μετά από κάθε φυγοκέντρηση (3 διαδοχικές)
- 10μl γλυκογόνο στα 400μl δείγματος-lysis (μετά από φυγοκεντρήσεις)
- 400μl ισοπροπανόλης
- 500μl αιθανόλη 70%
- 100μl ddH_2O για διάλυση pellet

2η παραλλαγή για ΒΒ:

- 100mg δείγματος ΒΒ (μελισσόψωμου)/500μl Buffer Tris-EDTA
- 30μl πρωτεϊνάση Κ (10mg/ml)/1 ml Buffer Tris-EDTA
- 500μl δείγματος-Buffer-πρωτεϊνάσης Κ σε 1,5ml Lysis Buffer
- 800μl για 1η φυγοκέντρηση, 400 για 2η, 200 για 3η
- 5μl γλυκογόνο στα 200μl μείγματος δείγμα-lysis (μετά από φυγοκεντρήσεις)
- 200μl ισοπροπανόλης
- 250μl αιθανόλη 70%
- 50μl ddH_2O για διάλυση pellet

3η παραλλαγή για ΒΒ:

- 180 mg δείγματος ΒΒ/ 1ml διαλύματος Buffer Tris-EDTA
- 30μl πρωτεϊνάση K (10mg/ml)/1 ml Buffer Tris-EDTA
- 500μl δείγματος-Buffer-πρωτεϊνάσης K σε 1500μl lysis (1 προς 3)
- 1ml για 1η φυγοκέντρηση, 0.5ml για 2η, 250μl για 3η
- 6,3μl γλυκογόνο στα 250μl μείγματος δείγμα-lysis (μετά από φυγοκεντρήσεις)
- 250μl ισοπροπανόλη
- 312μl αιθανόλη 70%
- 62,5μl ddH_2O για διάλυση pellet

1η παραλλαγή για μέλισσες

- 1 μέλισσα/200μl διαλύματος Buffer Tris-EDTA και 5 μέλισσες για κάθε δείγμα δίνουν συνολικά 1ml εκχυλίσματος-Buffer-πρωτεϊνάσης K
- 30μl πρωτεϊνάση K (10mg/ml)/1 ml Buffer Tris-EDTA
- 500μl δείγματος-Buffer-πρωτεϊνάσης K σε 1500μl lysis (1 προς 3)
- 1ml για 1η φυγοκέντρηση, 250μl για 2η
- 6,3μl γλυκογόνο στα 250μl μείγματος δείγμα-lysis (μετά από φυγοκεντρήσεις)
- 250μl ισοπροπανόλη
- 312μl αιθανόλη 70%
- 62,5μl ddH_2O για διάλυση pellet

2η παραλλαγή για μέλισσες

- 1 μέλισσα/250μl διαλύματος Buffer Tris-EDTA και 5 μέλισσες για κάθε δείγμα δίνουν συνολικά 1,5ml εκχυλίσματος μελισσών-Buffer-πρωτεϊνάσης K
- Ίδια διαδικασία με 1η παραλλαγή

2.1.2 Πειραματική διαδικασία για την απομόνωση του γενετικού υλικού από το μελισσόψωμο

Με βάση την (επιτυχής) 3η παραλλαγή πρωτοκόλλου για ΒΒ:

1. Ζυγίζονται 180 mg δείγματος μελισσόψωμου (ΒΒ) (δείγματα 11,12,14,15,27,112) και τοποθετούνται σε eppendorf (των 2ml-στρογγυλός πάτος).

2. Παρασκευάζεται μείγμα (buffer) όγκου 7ml (1 mM Tris, 0,5mM EDTA, pH=7) με 210μl πρωτεϊνάσης K (10mg/ml) και γίνεται ανάδευση με vortex για ομογενοποίηση του διαλύματος. Το ρυθμιστικό διάλυμαTris/EDTAχρησιμοποιείται κυρίως για τη σταθεροποίηση του pHτης πρωτεϊνάσης K. Πάντα φτιάχνεται bufferμε πλεόνασμα του ενός ml για ρεζέρβα.

3. Σε κάθε Eppendorf δείγματος προστίθεται 1mlαπό το παραπάνω buffer και γίνεται vortexσε συνδυασμό με χειροκίνητη ανάδευση μέχρι να διαλυθούν τα μεγάλα κομμάτια του ΒΒ.

4. Γίνεται επώαση σε κλίβανο στους 37°C με ανάδευση (speed=250) για 30 λεπτά. Εάν ή μηχανοκίνητη ανάδευση δεν είναι εφικτή, τότε γίνεται χειροκίνητη κάθε 5-10 λεπτά.

5. Μετά την επώαση, λαμβάνεται 0,5ml από το κάθε δείγμα και τοποθετείται σε νέο Eppendorf (των 2ml-στρογγυλός πάτος). Ημεταφορά αυτή γίνεται με πιπέτα με κομμένο ρύγχος (μπλε tip χωρητικότητας 100 - 1000 μl) για να μην βουλώσει καθώς εισέρχονται και φυτικά υπολείμματα ΒΒ που δεν έχουν διαλυθεί (κερήθρα, άλλες ακαθαρσίες).

6. Ακολούθως προστίθεται σε κάθε eppendorf 1,5ml από το διάλυμα λύσης κυττάρων (lysis buffer) GuSCN (αναλογία 1 προς 3), πραγματοποιείται καλή ανάδευση με vortexκαι αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά.

7. Μετά τη λύση, γίνεται φυγοκέντρηση στα 10.000 rcf για 10 λεπτά.

8. Από το υπερκείμενο, τοποθετώντας το tipπερίπου στη μέση του διαλύματος, λαμβάνεται η μισή ποσότητα (1ml) με προσοχή ώστε να αποφευχθεί η λήψη θραυσμάτων. Η ποσότητα αυτή τοποθετείται σε νέο Eppendorf (των 2ml-στρογγυλός πάτος ή 1,5 ml-κωνικός πάτος).

9. Γίνεται 2^{η} φυγοκέντρηση στα 10.000 rcf αλλά για 5 μόνο λεπτά.

10. Όπως και πριν λαμβάνεται από το υπερκείμενο η μισή ποσότητα (0,5ml) και τοποθετείται σε νέο Eppendorf (κατά προτίμηση με κωνικό πάτο).

11. Πραγματοποιείται μια 3^{η} φυγοκέντρηση στα 10.000 rcf για 5 λεπτά και λαμβάνεται πάλι η μισή ποσότητα υπερκειμένου (250μl) και τοποθετείται σε νέο Eppendorf (κωνικού πάτου).

12. Σε κάθε δείγμα τοποθετούνται 6,3μl γλυκογόνου (5mg/ml) και αφήνονται να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά.

13. Στη συνέχεια, τοποθετούνται 250μlισοπροπανόλης σε κάθε δείγμα, γίνεται ανάδευση με vortexκαι αποθηκεύονται στην κατάψυξη για 20 λεπτά.

14. Ακολούθως γίνεται φυγοκέντρηση στα 14.000 rcf για 10 λεπτά. Μετά την φυγοκέντρηση θα πρέπει να έχει γίνει κατακρήμνιση ιζήματος (pellet) στο κάτω μέρος του eppendorf. Εάν δεν είναι ορατό, τότε επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση. Το υπερκείμενο απορρίπτεται με προσοχή για να μην χαθεί το pellet, και το σωληνάριο αφήνεται ανοικτό σε χαρτί για να στεγνώσει.

15. Στη συνέχεια, τοποθετούνται περίπου 312μl αιθανόλης 70%, γίνεται ανάδευση με τη βοήθεια της πιπέτας μέχρι το ίζημα να διαλυθεί στο διάλυμα, όσο αυτό είναι εφικτό.

16. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 14.000 rcf για 10 λεπτά προς κατακρήμνιση του pellet. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το σωληνάριο αφήνεται πάλι να στεγνώσει.

17. Τέλος, τοποθετούνται 63μl ddH_2O (διπλά απεσταγμένο νερό) και γίνεται ήπια ανάδευση με την πιπέτα ώστε να διαλυθεί το pelletστο νερό.

18. Τα δείγματα αποθηκεύονται στην κατάψυξη (-20°C).

Εικόνα 8: Συλλεγμένο μελισσόψωμο

Δείγμα εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Μικροβίων - Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας

2.1.3 Πειραματική διαδικασία για την απομόνωση του γενετικού υλικού από τις μέλισσες

Με βάση την (επιτυχής) 1η και 2η παραλλαγή πρωτοκόλλου για μέλισσες:

1. Σε αποστειρωμένο τρυβλίο τοποθετούνται με καθαρή λαβίδα 5 μέλισσες από ένα δείγμα (11,12,14,15,27,112) και γίνεται ξέπλυμα του εξωτερικού τους με αιθανόλη (pure ethanol) με χρήση πλαστικής πιπέτας Pasteur (μιας χρήσεως).

2. Παρασκευάζεται buffer όγκου 7ml (1 mM Tris, 0,5mM EDTA, pH=7) με 210μl πρωτεϊνάσης K (10mg/ml) και αναδεύεται με vortex.

3. Με τη βοήθεια της λαβίδας και του εμβόλου (πλυμένα με απιονισμένο νερό και αιθανόλη), κόβεται το κάτω μέρος της μέλισσας (από το στομάχι και κάτω) και τοποθετείται σε eppendorf 1 (κωνικό των 1,5ml)με 200μl από το buffer πρωτεϊνάσης.

4. Γίνεται χειροκίνητη λειοτρίβιση του κομματιού μέλισσας με τη βοήθεια του εμβόλου ώστε να απελευθερωθεί όσο το δυνατόν περισσότερο υλικό.

5. Με πιπέτα λαμβάνεται όλο το υπερκείμενο –χωρίς τα κομμάτια μέλισσας- και τοποθετείται σε νέο eppendorf 2 (κωνικό των 1,5ml).

6. Η διαδικασία λειοτρίβισης επαναλαμβάνεται για τις υπόλοιπες 4 μέλισσες του κάθε δείγματος έτσι ώστε, στο τέλος, το eppendorf 2 να περιέχει συνολικά 1ml υπερκειμένου.

7. Ακολουθούνται τα βήματα 4 έως 9 όπως στην ενότητα 2.1.2.

8. Μετά την 2^{η} φυγοκέντρηση λαμβάνονται 250μl από το υπερκείμενο και τοποθετούνται σε νέο eppendorf(κωνικού πάτου).

9. Ακολουθούνται τα βήματα 12 έως 18 όπως στην ενότητα 2.1.2

Εικόνα 9: Δείγματα νεαρών ενήλικων μελισσών σε διάλυμα συντήρησης

Δείγματα 11, 12, 15, 27 (πίσω), 14, 112 (μπροστά) εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Μικροβίων - Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας

2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), είναι μια ενζυμική, in vitro μέθοδος ενίσχυσης, δηλαδή παραγωγής μεγάλου αριθμού αντιγράφων, συγκεκριμένων τμημάτων ενός αρχικού γενετικού υλικού (συνήθως DNA).

Για την πραγματοποίηση της PCR είναι απαραίτητη η παρουσία μιας θερμοανθεκτικής (Taq) πολυμεράσης αλλά και των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers), ανάλογα με την περιοχή του γενετικού υλικού της οποία είναι επιθυμητή η ενίσχυση. Φυσικά απαιτείται η παρουσία του αρχικού γενετικού υλικού στο οποίο γίνεται η ενίσχυση καθώς και νουκλεοτιδίων (τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια/dNTPs) τα οποία θα τοποθετηθούν από την πολυμεράση για την δημιουργία των νέων κλώνων. Επίσης χρησιμοποιείται ένα ρυθμιστικό διάλυμα (διατήρηση pH και συγκέντρωσης αλάτων), καθώς και διάλυμα Mg^{2+}.

Η αντίδραση εκτελείται σε τρία διαδοχικά επαναλαμβανόμενα στάδια: α) την αποδιάταξη των δίκλωνων κλώνων του γενετικού υλικού, β) τον υβριδισμό των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες του εκμαγείου DNA γ) την επιμήκυνση της αλυσίδας στην οποία έχουν συνδεθεί οι εκκινητές, με τοποθέτηση τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων από την πολυμεράση

Η PCR πραγματοποιείται στον θερμικό κυκλοποιητή (thermal cycler) (Εικόνα 10), ο οποίος διαθέτει θερμαινόμενη πλάκα, η οποία επιτρέπει την εναλλαγή θερμοκρασιών με μεγάλη ταχύτητα και ακρίβεια.

Στην παρούσα μελέτη, μετά την απομόνωση του συνόλου του γενετικού υλικού από τις μέλισσες και το μελισσόψωμο, ήταν απαραίτητη η αξιολόγηση αυτού. Συγκεκριμένα, εάν τα εκχυλίσματα αυτά περιείχαν όντως το γενετικό υλικό των βακτηρίων και μυκήτων -δηλαδή του μικροβιώματος. Για το λόγο αυτό γίνεται χρήση ειδικών εκκινητών (primers) που στοχεύουν στις αντίστοιχες αλληλουχίες του δίκλωνου DNA οι οποίες τελικά μεταγράφονται στο 16S rRNA των περισσότερων βακτηρίων και μυκήτων.

Για τα βακτήρια χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 341F (forward) με αλληλουχία 5’-CCT AYG GGR BGC ASC AG-3’ και 806R (reverse) με αλληλουχία 5’-GGA CTA CNN GGG TAT CTA AT-3’ (Eurofins Genomics)**.** Οι εκκινητές αυτοί δίνουν κομμάτια DNA μήκους περίπου 465bp.

Για τους μύκητες χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ITS1 (internal transcribed spacer 1) με αλληλουχία 5’-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3’ και ITS4 (internal transcribed spacer 4) με αλληλουχία 5’- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3’. Οι εκκινητές αυτοί δίνουν κομμάτια DNA μήκους περίπου 650-700bp.

Σε κάθε PCR, χρησιμοποιήθηκαν επίσης θετικοί μάρτυρες: εκχύλισμα Pseudomonas aeruginosa για τα βακτήρια και μάρτυρας ITS για τους μύκητες. Συμπληρωματικά, χρησιμοποιήθηκε ddH_2O ως αρνητικός μάρτυρας.

2.2.1 Πειραματική διαδικασία

1. Σε σωληνάριο Eppendorf των 1,5 ή 2 ml (κωνικού ή στρογγυλού πάτου), προστίθεται το μείγμα (mix) της PCR σύμφωνα με τον Πίνακα 5.
2. Ο αρχικός όγκος πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό των δειγμάτων, συν ένα θετικό και έναν αρνητικό μάρτυρα και ένα επιπλέον σωληνάριο για ρεζέρβα και προστίθεται η ανάλογη ποσότητα από κάθε αντιδραστήριο (πλην του DNA). Το σωληνάριο του μείγματος, καθώς και τα αντιδραστήρια που αποτελούν το μείγμα πρέπει να διατηρούνται σε πάγο, καθ’ όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.
3. Μετά την παρασκευή του μείγματος, προστίθενται 47μl από αυτό, σε κάθε μικροσωληνάριο (Eppendorf PCR tubes) 200μl, όσα και τα δείγματα.
4. Επίσης, σε κάθε μικροσωληνάριο, προστίθενται 3μl από το εκάστοτε δείγμα/εκχύλισμα γενετικού υλικού.
5. Τέλος τα μικροσωληνάρια τοποθετούνται στον κυκλοποιητή (Εικόνα 10) και φορτώνεται το ανάλογο πρόγραμμα σύμφωνα με τον Πίνακα 6.

Εικόνα 10: Θερμοκυκλοποιητής PCR, Eppendorf Mastercycler® personal

Θερμοκυκλοποιητής εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Μικροβίων - Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας

Πίνακας 5: Σύσταση και συγκεντρώσεις μείγματος PCR με εκκινητές για τα γονίδια των 16S rRNA περιοχών του DNA, βακτηρίων ή μυκήτων

Αντιδραστήριο	**Αρχική συγκέντρωση**	**Τελική συγκέντρωση**	**Αρχικός όγκος**	**Τελικός Όγκος**
dNTPs (Invitrogen)	10mM	1mM	5μl	50μl (ανά μικροσωληνάριο)
Buffer A (Fastgene)	10X	1X	5μl	
$MgCl_2$ (Fastgene)	25mM	0,5mM	1μl	
341F ή ITS1	10 pmol/ml	25 pmol	2,5μl	
806R ή ITS2	10 pmol/ml	25 pmol	2,5μl	
ddH_2O			30,6μl	
Polymerase Taq (Fastgene)	5U/ml	2U	0,4μl	
DNA			3μl	

Πίνακας 6: Πρόγραμμα κυκλοποιητή

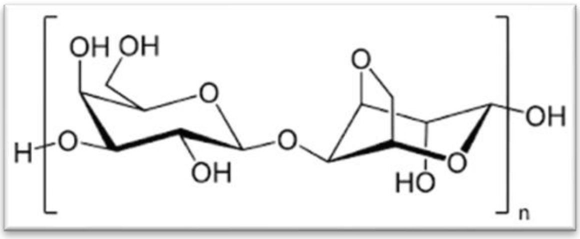
1 κύκλος (1^{ος})	3 λεπτά στους 95ºC για την αποδιάταξη της δίκλωνης έλικας DNA (σπάσιμο δεσμών υδρογόνου)
40 κύκλοι (2^{ος} έως 40^{ος})	30 δευτερόλεπτα στους 95ºC για την αποδιάταξη των cDNA. 30 δευτερόλεπτα στους 50 ºC για τον υβριδισμό των εκκινητών 30 δευτερόλεπτα στους 72ºC για την επιμήκυνση των εκκινητών από την πολυμεράση
1 κύκλος (41^{ος})	5 (βακτηριακοί εκκινητές) ή 2 λεπτά (ITS εκκινητές μυκήτων) στους 72ºC για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων
∞	συντήρηση στους 4ºC

2.3 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης είναι μια ηλεκτροχημική τεχνική, που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό και την ανάλυση, κυρίως νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) -αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για πρωτεΐνες. Βασίζεται στην μετακίνηση αυτών των (αρνητικά) φορτισμένων μορίων κατά μήκος ενός στερεού πορώδες πηκτώματος αγαρόζης, υπό την επήρεια εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου, προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο (θετικό) φορτίο. Ο διαχωρισμός των μορίων γίνεται με βάση το μέγεθός τους. Η πηκτή αγαρόζης είναι κατάλληλη για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων νουκλεϊκών οξέων (όπως DNA), δηλαδή μεγαλύτερων των 100bp, έως και 25kb (1kb = 1kbp = 1000bp)

Η αγαρόζη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης που απομονώνεται από το άγαρ, το οποίο προέρχεται από φύκη (red algae) (Εικόνα 11). Έχει ουδέτερο φορτίο και χαμηλή χημική πολυπλοκότητα γεγονός που την καθιστά ιδανικό υλικό για την ηλεκτροφόρηση, καθώς δεν αλληλεπιδρά με τα υπό ανάλυση μακρομόρια. Επιπλέον, έχει την ιδιότητα να σχηματίζει πόρους όταν ψύχεται και στερεοποιείται, το μέγεθος των οποίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του διαλύματος. Με αυτό τον τρόπο, λειτουργεί ως ‘’μοριακό κόσκινο’’ και επιτρέπει τη διέλευση των μακρομορίων δια μέσου των πόρων της, με ταχύτητα που εξαρτάται από το μέγεθός τους. Τα μικρότερα μόρια, είναι πιο ευκίνητα και μετακινούνται γρηγορότερα προς το θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο. Το αντίθετο ισχύει για τα μεγαλύτερου μεγέθους μόρια, τα οποία μετακινούνται αργά και μετά την πάροδο της ηλεκτροφόρησης εντοπίζονται κοντά στην αφετηρία

Εικόνα 11: Μονομερές αγαρόζης

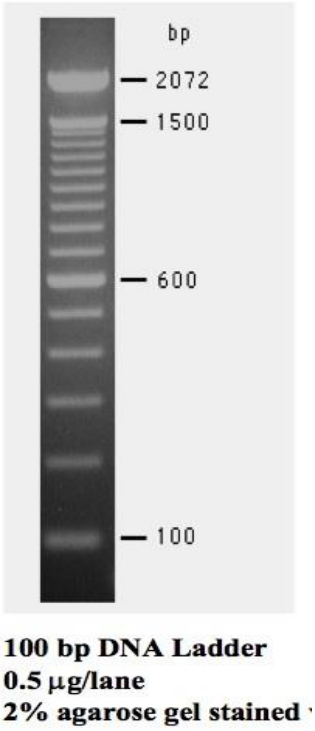


Αριστερά: D-γαλακτόζη, Δεξιά: 3,6-ανυδρο-L-γαλακτόζη

Στην παρούσα μελέτη, γίνεται διαχωρισμός των προϊόντων της PCR, που είναι κυρίως θραύσματα DNA μήκους 465bp (βακτηριακοί primers) ή 600 (μυκητιακοί primers). Για το λόγο αυτό το πήκτωμα αγαρόζης που χρησιμοποιείται, έχει μια μέτρια συγκέντρωση 1,5% (w/v) (μικρού-μεσαίου μεγέθους πόροι) που είναι ιδανική για μικρού-μεσαίου μεγέθους μακρομορίων. Ο διαχωρισμός αυτός γίνεται μόνο για την αξιολόγηση των εκχυλισμάτων (καθαρότητα, ύπαρξη βακτηρίων/μυκήτων), τα οποία στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθούν για NGS αλληλούχιση. Για την πλήρωση της συσκευής ηλεκτροφόρησης, χρησιμοποιείται διάλυμα TBE (Tris-Boric Acid-EDTA) το οποίο παρέχει τους απαραίτητους ηλεκτρολύτες. Επίσης χρησιμοποιείται διάλυμα φόρτωσης x10 (Loading Buffer), το οποίο αναμιγνύεται με το κάθε δείγμα ξεχωριστά. Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει μια ουσία υψηλής πυκνότητας -συνήθως γλυκερόλη- και μια ή δύο χρωστικές -συνήθως μπλε της μπλε της βρωμοφαινόλης και κυανούν του ξυλενίου. Οι χρωστικές, εκτός από το να χρωματίζουν και άρα να διευκολύνουν τη φόρτωση των δειγμάτων στα πηγαδάκια (wells) έχουν την ιδιότητα να μετακινούνται στην πηκτή, με ταχύτητα λίγο μεγαλύτερη ή περίπου ίση με τα πιο μικρά μόρια DNA. Η οπτικοποίηση βοηθάει στην εκτίμηση της θέσης των μορίων και η ηλεκτροφόρηση πρέπει να τερματίζεται όταν οι ορατές αυτές ζώνες φτάνουν στο τελικό άκρο της πηκτής, ώστε να μην χαθούν τα μικρά θραύσματα. Τέλος η παρουσία της γλυκερόλης στο διάλυμα φόρτωσης αυξάνει την πυκνότητα των δειγμάτων ώστε να είναι μεγαλύτερη του TBE και να καθιζάνουν επαρκώς στα πηγαδάκια.

Σε κάθε ηλεκτροφόρηση είναι απαραίτητο να χρησιμοποιείται ένας δείκτης γνωστών μοριακών βαρών DNA (ladder). Στο συγκεκριμένο κύκλο πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε 100bp DNA ladder (Invitrogen, 1μg/μL).

Για την οπτικοποίση των αποτελεσμάτων μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) (10mg/ml). Παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA (ή του RNA) μέσω σχηματισμού δεσμών Van Der Waals και έχει την ιδιότητα να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία 302-366 nm.



Εικόνα 12: Μπάντες του 100 bp DNA Ladder της Invitrogen

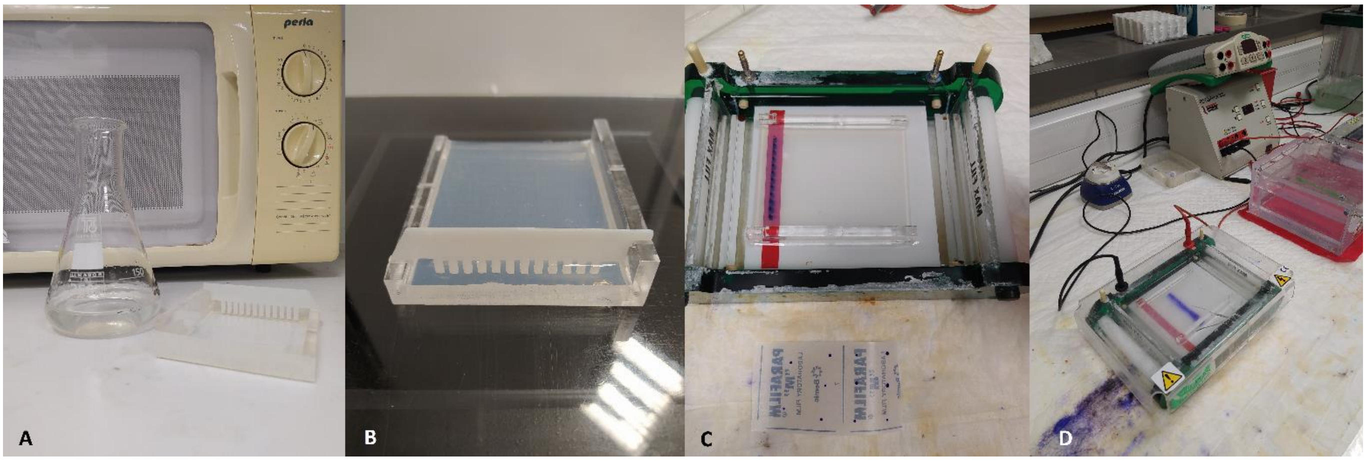
Σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή ο συγκεκριμένος δείκτης αποτελείται από 15 θραύσματα, πολλαπλάσια του 100, μεταξύ 100 και 1500bp και ένα επιπλέον θραύσμα στα 2072bp. Η μπάντα των 600bp είναι 2 με 3 φορές πιο έντονη για να διευκολύνει τον προσανατολισμό. Η μπάντα των 2072 είναι επίσης πιο έντονη από όλες τις άλλες μπάντες συμπεριλαμβανομένου των 600bp.

2.3.1 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης και φόρτωση δειγμάτων

1. Ανάλογα με τη χωρητικότητα του εκμαγείου του πηκτώματος, ζυγίζονται τα απαραίτητα mg αγαρόζης, ώστε η συγκέντρωση του διαλύματος να είναι 1,5% (w/v). Για το εκμαγείο/καλούπι χωρητικότητας 40ml, ζυγίζονται 0.6gr αγαρόζης (Invitrogen Ultra-Pure Gel Agarose) και τοποθετούνται σε γυάλινη κωνική (των 250ml), μαζί με 40ml διαλύματος TBE.
2. Παράλληλα προετοιμάζεται κατάλληλα το εκμαγείο, κλείνοντας με χρήση κολλητικής χαρτοταινίας τις ανοικτές πλευρές και τοποθετώντας το ‘’χτενάκι’’ μ τον αριθμό των θέσεων ανάλογα τον αριθμό των δειγμάτων, συν ένα πηγαδάκι για το Ladder.
3. Η κωνική φιάλη τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων στη μέγιστη ένταση για 2 λεπτά μέχρι να λιώσει η αγαρόζη.
4. Μετά το πέρας του χρόνου, αφαιρείται με προσοχή λόγω υψηλής θερμοκρασίας, από το φούρνο μικροκυμάτων και γίνεται συμπλήρωση του διαλύματος που εξατμίστηκε, με απιονισμένο νερό.

5. Γίνεται χειροκίνητη ανάδευση της κωνικής φιάλης, ώστε να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και αφήνεται να κρυώσει επαρκώς (~ 40-55°C) ώστε να είναι εφικτός ο χειρισμός της φιάλης χωρίς προστασία από τη θερμότητα (Εικόνα 13).
6. Όταν κρυώσει επαρκώς, τοποθετούνται 40μl βρωμιούχου αιθιδίου EtBr (1 μg/ml) και γίνεται χειροκίνητη ανάδευση.
7. Το διάλυμα τοποθετείται στο εκμαγείο, γίνεται απομάκρυνση τυχόν φυσαλίδων με χρήση ρύγχους (tip) πιπέτας και αφήνεται να σταθεροποιηθεί εντελώς (10 με 20 λεπτά).
8. Αφού κρυώσει, αφαιρείται η κολλητική χαρτοταινία, και προσεκτικά το χτενάκι ώστε να μην καταστραφούν τα πηγαδάκια ή γίνει διάτρηση του πηκτώματος.
9. Το εκμαγείο εμβαπτίζεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης η οποία έχει πληρωθεί έως τη μέγιστη ένδειξη, με διάλυμα TBE. Τα πηγαδάκια θα πρέπει επίσης να είναι πλήρως βυθισμένα στο διάλυμα.
10. Στη συνέχεια ξεκινάει η φόρτωση των δειγμάτων. Σταγόνες των 2μl του διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer) εναποτίθενται με την πιπέτα σε ένα μικρό κομμάτι parafilm. Από κάθε δείγμα χρησιμοποιούνται συνήθως 10-15μl, τα οποία αναμειγνύονται με την σταγόνα του διαλύματος φόρτωσης με τη χρήση της πιπέτας. Αφού γίνει η ανάμειξη, το δείγμα τοποθετείται σε ένα από τα πηγαδάκια της πηκτής με προσοχή ώστε να μην διαφύγει στο διάλυμα πλήρωσης ή στα γειτονικά πηγαδάκια (Εικόνα 13C).
11. Μετά την φόρτωση των δειγμάτων, γίνεται επίσης φόρτωση 5μl του Ladder (100bp DNA Ladder, Invitrogen), συνήθως στο πρώτο πηγαδάκι.
12. Η συσκευή ασφαλίζεται και τα ηλεκτρόδια τοποθετούνται κατάλληλα στην παροχή ενέργειας η οποία έχει ρυθμιστεί στα 130V.
13. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αφαιρείται από τη συσκευή και το καλούπι και τοποθετείται σε συσκευή υπεριώδους φωτός UV Foto/Phoresis system (Fotodyne, USA) προς αξιολόγηση και φωτογράφηση.

Εικόνα 13: Παρασκευή πηκτώματος (gel) αγαρόζης και συσκευή ηλεκτροφόρησης υπό φόρτωση και λειτουργία



(A) Κωνική φιάλη με λιωμένη με θέρμανση αγαρόζη σε διάλυμα TBE και καλούπι με κολλητική χαρτοταινία και χτενάκι, **(B)** Πηκτή αγαρόζης μετά την σταθεροποίηση (πήξη), **(C)** Καλούπι με πηκτή, εμβαπτισμένο στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με φορτωμένα δείγματα στα πηγαδάκια, **(D)** Συσκευή ηλεκτροφόρησης οριζόντιας διάταξης, συνδεδεμένη σε πηγή ενέργειας, υπό λειτουργία. Τα μακρομόρια έχουν αρχίσει την μετακίνηση προς το θετικό ηλεκτρόδιο, όπως φαίνεται από τις ζώνες του διαλύματος φόρτωσης.
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων - Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας

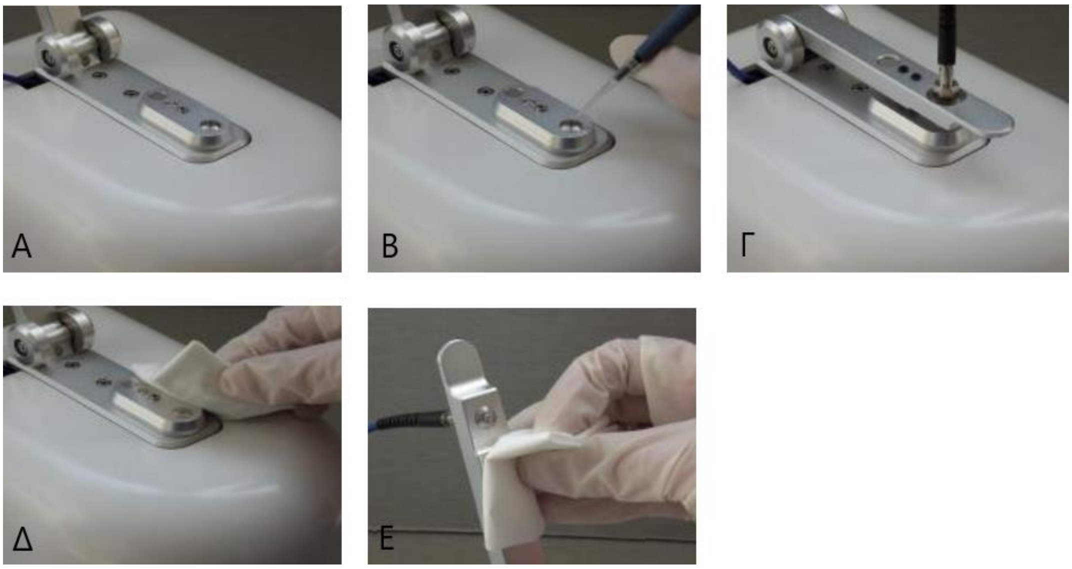
2.4 Φωτομέτρηση UV μικροποσοτήτων (Spectrophotometry nanodrop)

Για τον έλεγχο της καθαρότητας και της συγκέντρωσης DNA στα εκχυλίσματα έγινε φωτομέτρηση με φασματοφωτόμετρο υπεριώδους τύπου ‘’Nanodrop’’. Τα συγκεκριμένα φασματοφωτόμετρα επιτρέπουν τη μέτρηση μικροποσοτήτων 0,5-2μl χωρίς τη χρήση κυψελίδων αλλά δεν είναι τόσο ακριβή όσο τα συμβατικά. Οι συγκεκριμένες συσκευές μετράνε την απορρόφηση, το λόγο απορρόφησης 260/280 και τη συγκέντρωση των δειγμάτων, σε 2 δευτερόλεπτα. Για το δίκλωνο DNA, όταν ο λόγος απορρόφησης 260/280 είναι πάνω από 1,8 η καθαρότητα του δείγματος είναι η μέγιστη και επιθυμητή.

2.4.1 Πειραματική διαδικασία φωτομέτρησης

1. Γίνεται εκκίνηση του υπολογιστή και στη συνέχεια άνοιγμα του μηχανήματος και του αντίστοιχου λογισμικού στον υπολογιστή
2. Στο λογισμικό επιλέγεται ο τύπος των δειγμάτων που μετρούνται (dsDNA)
3. Η ειδική θέση υποδοχής δειγμάτων της συσκευής ξεπλένεται αρκετές φορές, με 2μl ddH_2O κάθε φορά. Μετά από κάθε εισαγωγή δείγματος και λήψη της μέτρησης, γίνεται απαλός καθαρισμός και των δύο θέσεων υποδοχής, με ένα καθαρό χαρτί (Εικόνα 14).
4. Αφού έχει ξεπλυθεί επαρκώς (λήψη μετρήσεων-measurement δίνει τιμές κοντά στο 0), γίνεται μηδενισμός (blank) με χρήση του ddH_2O (τυφλό δείγμα).
5. Στη συνέχεια τοποθετούνται 2μl από ένα δείγμα DNA και λαμβάνεται μέτρηση (measurement).
6. Μετά από κάθε μέτρηση με δείγμα DNA, γίνεται ξανά πλύση και μηδενισμός με το τυφλό δείγμα.

Εικόνα 14: Διαδικασία φόρτωσης δείγματος στη συσκευή Quawell Q3000



Α) άνοιγμα του καπακιού, Β) φόρτωση σταγόνας με ελαφρό ακούμπημα του ρύγχους της πιπέτας στην κάτω υποδοχή, Γ) κλείσιμο του καπακιού, Δ) Ε) σκούπισμα της πάνω και κάτω υποδοχής μετά τη μέτρηση. Quawell Q3000 User manual.

2.5 Αλληλούχιση DNA επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing –NGS) και βιοπληροφορική ανάλυση (Μεταταξινομική)

Η μεταγονιδιωματική (μεταταξινομική) ανάλυση αναφέρεται στην διαδικασία απομόνωσης, ενίσχυσης, μαζικής και παράλληλης αλληλούχισης αλλά και βιοπληροφορικής ανάλυσης, ολόκληρου του γενετικού υλικού ή στοχευμένων γονιδίων από ένα περιβαλλοντικό δείγμα, με τη χρήση μιας πλατφόρμας αλληλούχισης επόμενης γενιάς (π.χ Illumina). Στην μικροβιολογία, η μαζική αλληλούχιση NGS του μικροβιώματος αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για την ταυτοποίηση των Ειδών βακτηρίων και μυκήτων σε ένα εκχύλισμα γενετικού υλικού. Τα βασικά στάδια της διαδικασίας που ακολουθήθηκε, συνοψίζονται στην Εικόνα 15.

Μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό του γενετικού υλικού που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων - Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας, τα δείγματα παραλήφθηκαν από την εταιρία Novogene Europe όπου αρχικά έγινε αξιολόγηση της καθαρότητάς τους (Quality Control) (Ενότητα 3.3).

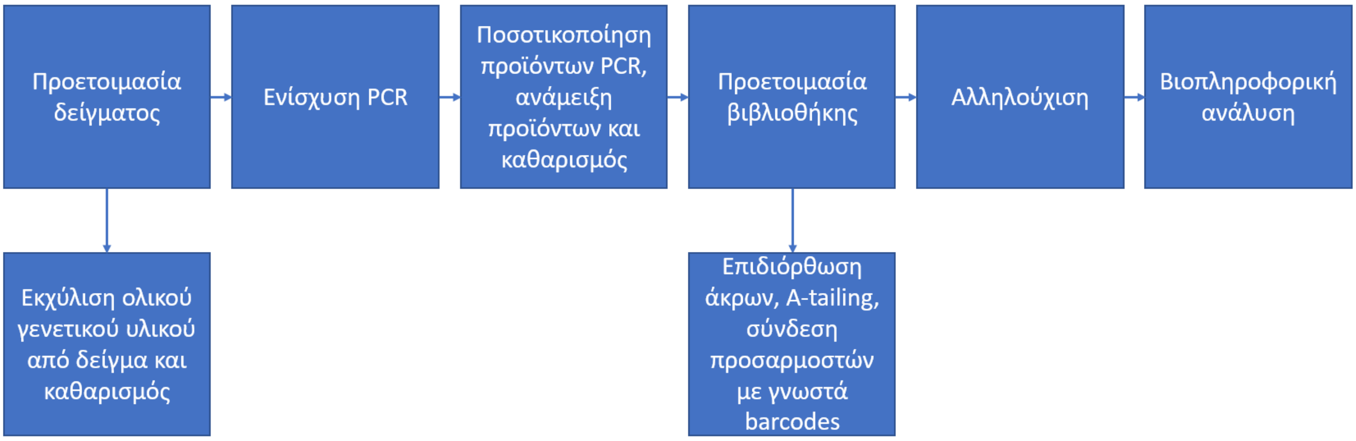
Στη συνέχεια -σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Novogene- πραγματοποιήθηκε PCR ενίσχυση συγκεκριμένων γονιδίων όπως του 16S rRNA των βακτηρίων το οποίο αν και εξαιρετικά συντηρημένο, περιλαμβάνει εννέα μεταβλητές περιοχές (V1-V9) που είναι διακριτές μεταξύ των διαφόρων βακτηρίων. Αντίστοιχα για τους μύκητες, ενισχύεται η ενδομεταγραφόμενη ITS περιοχή (Internal transcribed spacer) του ριβοσωμικού rDNA, μήκους 600-800bp, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή μεταβλητότητα αλληλουχίας. Όλες οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs).

Μετά την ενίσχυση, τα καταλλήλου μήκους προϊόντα PCR (με τουλάχιστον μια έντονη μπάντα στα 400-450bp) επιλέχθηκαν μετά από ηλεκτροφόρηση σε 2% πηκτής αγαρόζης με 1x loading buffer. Κατόπιν, συγκεντρώθηκε ίδια ποσότητα προϊόντος PCR από κάθε δείγμα και έγινε απομάκρυνση των παραπροϊόντων που προκύπτουν από την ενίσχυση με χρήση του Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany).

Ακολούθως, έγινε η προετοιμασία των βιβλιοθηκών αξιοποιώντας το NEBNext Ultra DNA Library Pre ® Kit για Illumina, σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή (περιλαμβάνεται επιδιόρθωση των άκρων του κάθε τμήματος, A-tailing και σύνδεση προσαρμοστών Illumina με γνωστά barcodes). Η ποιότητα της βιβλιοθήκης επιβεβαιώθηκε με χρήση φασματομέτρου Qubit@ 2.0 (Thermo Scientific) και του μηχανήματος Agilent Bioanalyzer 2100.

Τέλος πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση στην πλατφόρμα Illumina και λήφθηκαν 250bp paired-end αναγνώσεις.

Εικόνα 15: Στάδια μεταγονιδιωματικής/μεταταξινομικής ανάλυσης (workflow)



Προκαταρκτική βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων πραγματοποιήθηκε από τη Novogene με το λογισμικό QIIME (Version1.7.0) και αποτυπώθηκε με το R software (Version 2.15.3). Περαιτέρω βιοπληροφορικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν από το Εργαστήριο Βιοπληροφορικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με χρήση Excel και άλλων προγραμμάτων.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

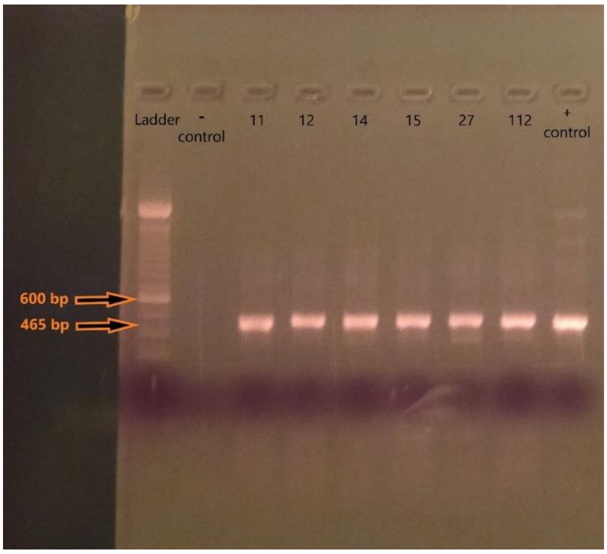
3.1 Αποτελέσματα πρωτοκόλλων για απομόνωση γενετικού υλικού από μέλισσες και μελισσόψωμο

Για το μελισσόψωμο: Η 1η παραλλαγή δεν έδωσε καθόλου προϊόν άρα απορρίπτεται. Η 2η και η 3η παραλλαγή έδωσαν προϊόν αλλά η 3η παραλλαγή έδωσε προϊόν με ισχυρότερο σήμα στην ηλεκτροφόρηση, άρα προτιμάται.

Για τις μέλισσες: Και οι δύο παραλλαγές έδωσαν σήμα ίδιας έντασης στην ηλεκτροφόρηση άρα γίνονται δεκτές και οι δύο.

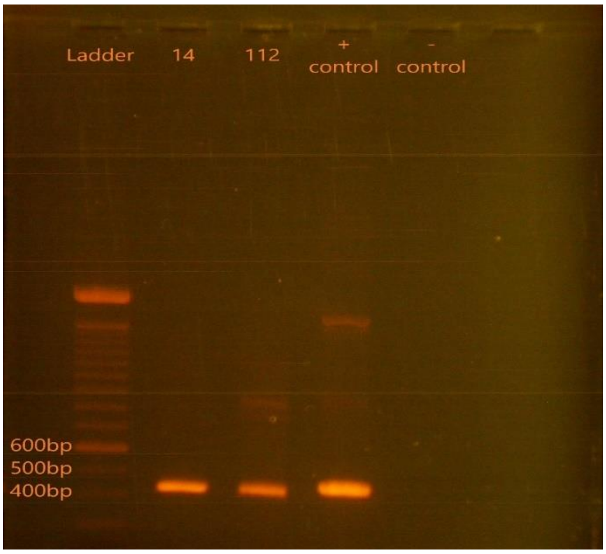
3.2 Αποτελέσματα PCR

3.2.1 Αποτελέσματα PCR βακτηριακού 16S rRNA δειγμάτων μελισσών και μελισσόψωμου



Εικόνα 16: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR με primers έναντι βακτηριακού 16S rRNA δειγμάτων μελισσών (11, 12, 14, 15, 27, 112)

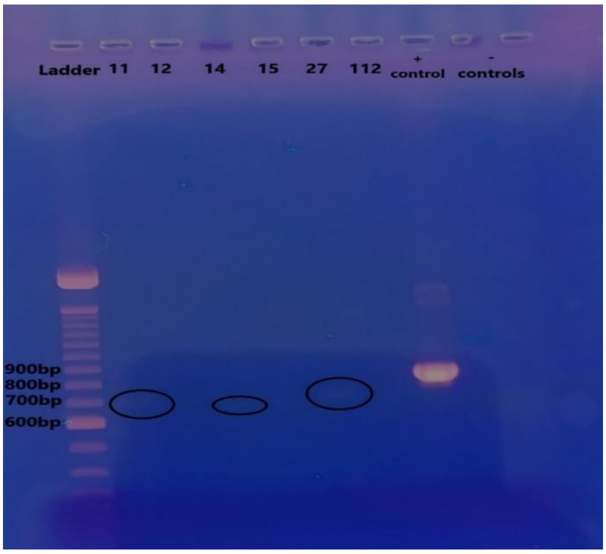
Τα θραύσματα εντοπίζονται στην αναμενόμενη περιοχή των 465bp σύμφωνα με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν



Εικόνα 17: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR με primers έναντι βακτηριακού 16S rRNA δειγμάτων μελισσόψωμου (14,112)

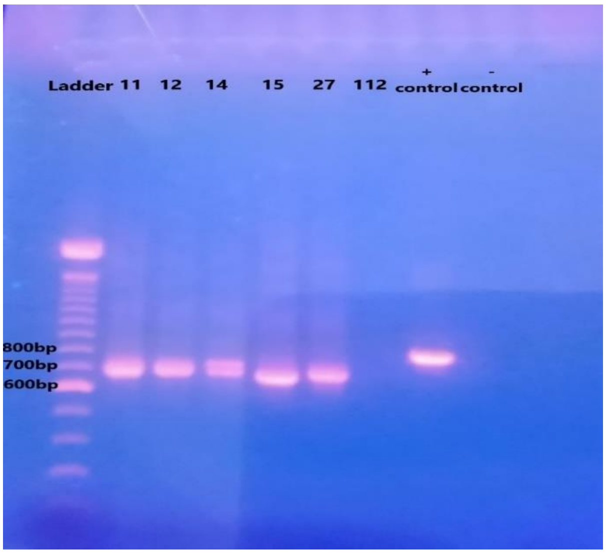
Τα θραύσματα εντοπίζονται στην αναμενόμενη περιοχή των 465bp σύμφωνα με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν

3.2.2 Αποτελέσματα PCR μηκυτιακού 16S rRNA δειγμάτων μελισσών και μελισσόψωμου



Εικόνα 18: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR με primers έναντι μηκυτιακού 16S rRNA δειγμάτων μελισσών (11, 12, 14, 15, 27, 112)

Απεικονίζονται μπάντες πολύ αχνής χρώσης, στα δείγματα 11, 14 και 27 που αντιστοιχούν σε θραύσματα 700, 650 και 750 bp, αλλά σε χαμηλές συγκεντρώσεις καθώς οι μέλισσες δεν διαθέτουν απαραίτητα μύκητες



Εικόνα 19: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR με primers έναντι μηκυτιακού 16S rRNA δειγμάτων μελισσόψωμου (11, 12, 14, 15, 27, 112)

Όλα τα δείγματα εκτός του 112, εμφανίζουν ορατές ζώνες στα 650-750bp, μια περιοχή που είναι σε συμφωνία με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν

3.3 Αποτελέσματα φωτομέτρησης

Διαπιστώθηκε ότι τα περισσότερα δείγματα είχανε αρκετά καλές συγκεντρώσεις DNA και αρκετά υψηλή καθαρότητα (Πίνακας 7, Πίνακας 8). Ορισμένα δείγματα του μελισσόψωμου είχανε προσμίξεις, κάτι που είναι αναμενόμενο λόγω της φύσης του συγκεκριμένου υλικού (φυτικά συστατικά, λιπιδική στοιβάδα).

Όλα τα δείγματα πλην 2 (BB 14, BB 27) πέρασαν επιτυχώς τον ποιοτικό έλεγχο της εταιρίας αλληλούχισης νέας γενιάς (Novogen). Πράγματι τα συγκεκριμένα δύο δείγματα είχανε το μικρότερο κλάσμα απορρόφησης (1,19 και 1,33 αντίστοιχα) σύμφωνα με τη φωτομέτρηση τύπου Nanodrop που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο (Πίνακας 8). Σε αυτά τα δύο δείγματα έγινε ένας επιπλέον καθαρισμός από την εταιρία, μετά του οποίου πληρούσαν και αυτά τις προϋποθέσεις για αλληλούχιση.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα Nanodrop δειγμάτων μελισσών

dsDNA (double stranded) (εκχυλίσματα Bee από 1/11/21)	Κλάσμα οπτικής απορρόφησης 260/280	Συγκέντρωση (ng/ml)
11	1,65	346,8
12	1,59	306,1
14	1,67	160,7
15	1,81	290,6
27	1,87	250,5
112	1,79	282,1

Πίνακας 8: Αποτελέσματα Nanodrop δειγμάτων μελισσόψωμου

dsDNA (double stranded) (μείγμα εκχυλισμάτων BB από 8/10, 13/10, 15/10 πλην 112 και 19/10)	Κλάσμα οπτικής απορρόφησης 260/280	Συγκέντρωση ng/ml
11	1,50	354,2
12	1,43	243
14	1,19	577,2
15	1,33	440,9
27	1,33	620,2
112	1,34	574,9

3.4 Αποτελέσματα αλληλούχισης μικροβιώματος και βιοπληροφορικής ανάλυσης

Τα δείγματα στα οποία ολοκληρώθηκε επιτυχώς η αλληλούχιση, καθώς και η ονομασία τους στην βιοπληροφορική ανάλυση και η περιγραφή τους αναφορικά με την προέλευσή τους, περιλαμβάνονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9: Αντιστοιχία ονομασίας δειγμάτων εργαστηρίου με ονομασία βιοπληροφορικής ανάλυσης και περιγραφή προέλευσης

Ονομασία δείγματος εργαστηρίου (αριθμός κυψέλης)	Ονομασία δείγματος στην βιοπληροφορική ανάλυση	Όνομα group	Περιγραφή
11 Bee	A1	A	Δείγματα μελισσών control (υγιή/χωρίς σπόρια *N. ceranae*)
14 Bee	A2		
15 Bee	A3		
12 Bee	B1	B	Δείγματα μελισσών με αυξημένο αριθμό σπορίων *N. ceranae*
27 Bee	B2		
112 Bee	B3		
11 BB	C1	C	Δείγματα μελισσόψωμου control (από μελίσσια υγιή/χωρίς σπόρια *N. ceranae*)
14 BB	C2		
15 BB	C3		
12 BB	D1	D	Δείγματα μελισσών με αυξημένο αριθμό σπορίων *N. ceranae*
27 BB	D2		
112 BB	D3		

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των βακτηρίων και μυκήτων απεικονίζονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 10, Πίνακας 11). Οι ακατέργαστες αλληλουχίες είναι σε αριθμό πάνω από 100.000 που σημαίνει ότι η κάλυψη της αλληλούχισης ήταν επαρκής. Οι καθαρές μετρήσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν περεταίρω στην ανάλυση κυμαίνονται επίσης στις 100.000. Οι δείκτες Q20 και Q30 (quality scores) είναι >90 και πλησιάζουν το 100, ένδειξη μικρής πιθανότητας λάθους.

Πίνακας 10: Αποτελέσματα αλληλούχισης βακτηριώματος (bacteriome)

Ονομασία δείγματος	Raw PE[a] (#)	Effective tags[b] (#)	Q20	Q30	GC[c] %
A1	131,007	98,811	98.50	94.98	52.03
A2	126,495	95,845	98.37	94.64	51.86
A3	138,765	116,693	98.49	94.95	52.21
B1	126,288	100,092	98.51	94.97	51.84
B2	121,901	95,401	98.41	94.73	51.77
B3	129,335	102,871	98.53	95.06	51.93
C1	136,692	123,343	98.47	95.01	55.43
C2	125,979	109,806	98.33	94.70	54.32
C3	137,819	104,762	98.38	94.75	56.75
D1	136,104	121,381	98.58	95.27	55.07
D2	121,081	106,511	98.29	94.53	55.49
D3	123,617	108,72	98.38	94.82	54.98

[a] Raw PE: αντιπροσωπεύει τον αριθμό των ακατέργαστων paired-ends (διπλής κατεύθυνσης) αναγνώσεων που προέκυψαν [b] Effective tags: οι μετρήσεις μετά το καθάρισμα (φιλτράρισμα, αφαίρεση των χιμαιρικών μορίων) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν περεταίρω για την ταξινόμηση [c] GC%: ποσοστό βάσεων γουανίνης-κυτοσίνης, κυμαίνεται σε τιμές 50-60% και είναι επιθυμητό να μην εμφανίζει σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ δειγμάτων

Πίνακας 11: Αποτελέσματα αλληλούχισης μυκητοβιώματος (mycobiome)

Ονομασία δείγματος	Raw PE(#)	Effective tags(#)	Q20	Q30	GC%
A1	122,95	114,138	98.93	96.66	53.40
A2	133,542	129,507	99.36	97.80	56.38
A3	106,429	100,852	98.83	96.47	57.75
B1	136,579	131,243	99.23	97.28	61.18
B2	128,421	121,687	99.34	97.74	58.64
B3	135,197	125,178	99.30	97.67	56.22
C1	136,002	131,56	99.02	96.57	57.46
C2	130,176	126,67	99.03	96.64	56.56
C3	121,441	115,576	99.21	97.26	56.50
D1	137,909	133,518	99.08	96.71	56.37
D2	132,934	129,701	99.30	97.56	58.06
D3	122,577	118,465	99.12	96.90	55.66

Στην Εικόνα 20 απεικονίζονται τα βακτηριακά Γένη που βρίσκονται σε σχετική αφθονία ≥1% στα δείγματα μελισσών. Όπως είναι αναμενόμενο, επικρατούν Γένη βακτηρίων που συνιστούν το βασικό (core) βακτηρίωμα, συμπεριλαμβανομένων των *Lactobacillus*, *Bartonella*, *Gilliamella*, *Snodgrassella*, *Bifidobacterium*, *Frischella* (reviewed by Bonilla-Rosso and Engel 2018; Engel et al., 2012; Kwong and Moran 2016; Kwong et al., 2017; Martinson et al., 2012).

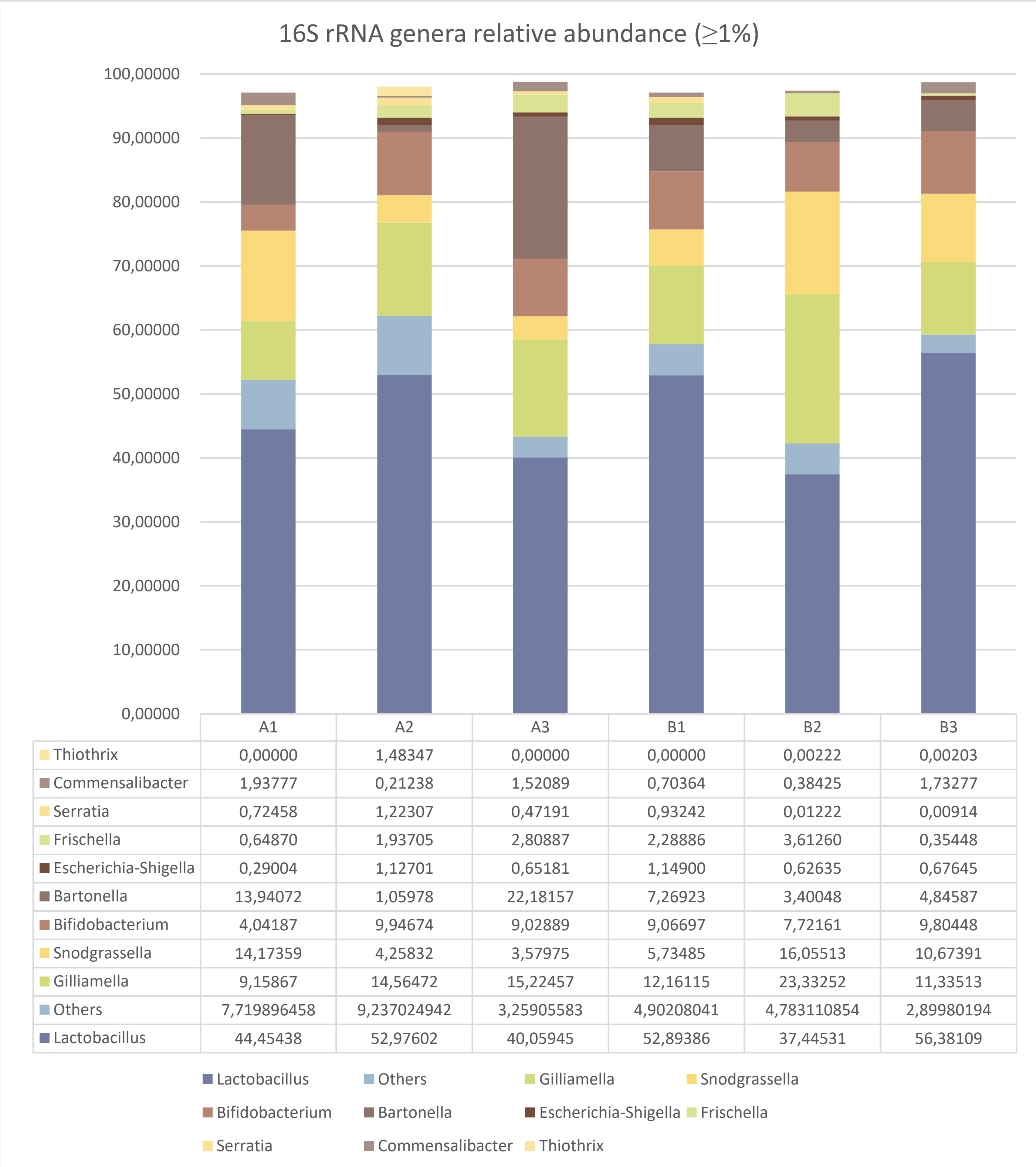
Τα Γένη *Escherichia-Shigella* και *Commensalibacter* ήταν παρόντα σε αφθονία >1%, μόνο σε ορισμένα από τα δείγματα. Η αφθονία των συγκεκριμένων Γενών μπορεί να εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο της *A. mellifera* σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και σε κάθε περίπτωση παρουσιάζει αυξομειώσεις (Dong et al., 2020).

Το Γένος *Thiothrix* εντοπίστηκε μόνο σε ένα δείγμα, το control A2, σε αφθονία 1,48%, αλλά απουσίαζε από τα άλλα δείγματα και δεν έχει συσχετιστεί με τις μέλισσες σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, γι' αυτό ενδέχεται να αποτελεί πρόσμιξη ή τυχαία παρέκκλιση.

Το Γένος *Serratia* εντοπίστηκε επίσης, με μεγαλύτερη αφθονία (1,22%), στο control A2 σε σύγκριση με τα άλλα δείγματα (<1%). Το *Serratia marcescens*το μόνο Είδος του Γένους Serratia που ταυτοποιήθηκε στην παρούσα αλληλούχιση, έχει συσχετιστεί με παθογένεια στην *A. mellifera*. Με δεδομένο ότι το μελίσσι 14 από όπου προέρχεται το δείγμα A2, κατέρρευσε (από άγνωστα αίτια), ενδέχεται η ύπαρξη του Serratia να αποτελεί βιοδείκτη κακής πρόγνωσης για το μελίσσι. Προκειμένου όμως να επιβεβαιωθεί μια τέτοια συσχέτιση βέβαια, είναι απαραίτητες επιπλέον μελέτες.

Γενικότερα, όπως φαίνεται από τον πίνακα δεδομένων της Εικόνας 20, από την σχετική αφθονία των Γενών, δεν είναι εφικτό να εξαχθούν συμπεράσματα, καθώς δεν παρατηρούνται στατιστικά συγκρίσιμες (ποσοτικές) διακυμάνσεις μεταξύ των controls και των δειγμάτων με αυξημένο αριθμό σπορίων *N. ceranae*. Επομένως σε επίπεδο Γένους κρίνεται απαραίτητη η διερεύνηση σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων. Σημειώνεται ότι, η αλληλεπίδραση του *N. ceranae* με το μικροβίωμα της μέλισσας δεν οδηγεί απαραίτητα σε διατάραξη του βασικού (core) μικροβιώματος της μέλισσας, καθώς ο στόχος του παρασίτου μακροπρόθεσμα είναι η επιβίωση του ξενιστή. Σύμφωνα με τους Zhang et al., ορισμένες μελέτες έχουν μάλιστα παρατηρήσει θετικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο (Zhang et al., 2021). Οι συγκεκριμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι το *N. ceranae* μπορεί να έχει προσαρμοστεί στην ύπαρξη των βακτηριακών συμβιωτών της *A. mellifera* με τέτοιο τρόπο ώστε να μην διαταράσσει την ομοιόσταση του ξενιστή. Σε αυτή την περίπτωση και σε περιπτώσεις θετικής συσχέτισης N. ceranae-βακτηριώματος, η πρόγνωση, ενδέχεται να είναι θετική για το μελίσσι (χαμηλότερη θνησιμότητα) (Zhang et al., 2021).

Εικόνα 20: Σχετική αφθονία (Γενών) βακτηρίων στα δείγματα μελισσών

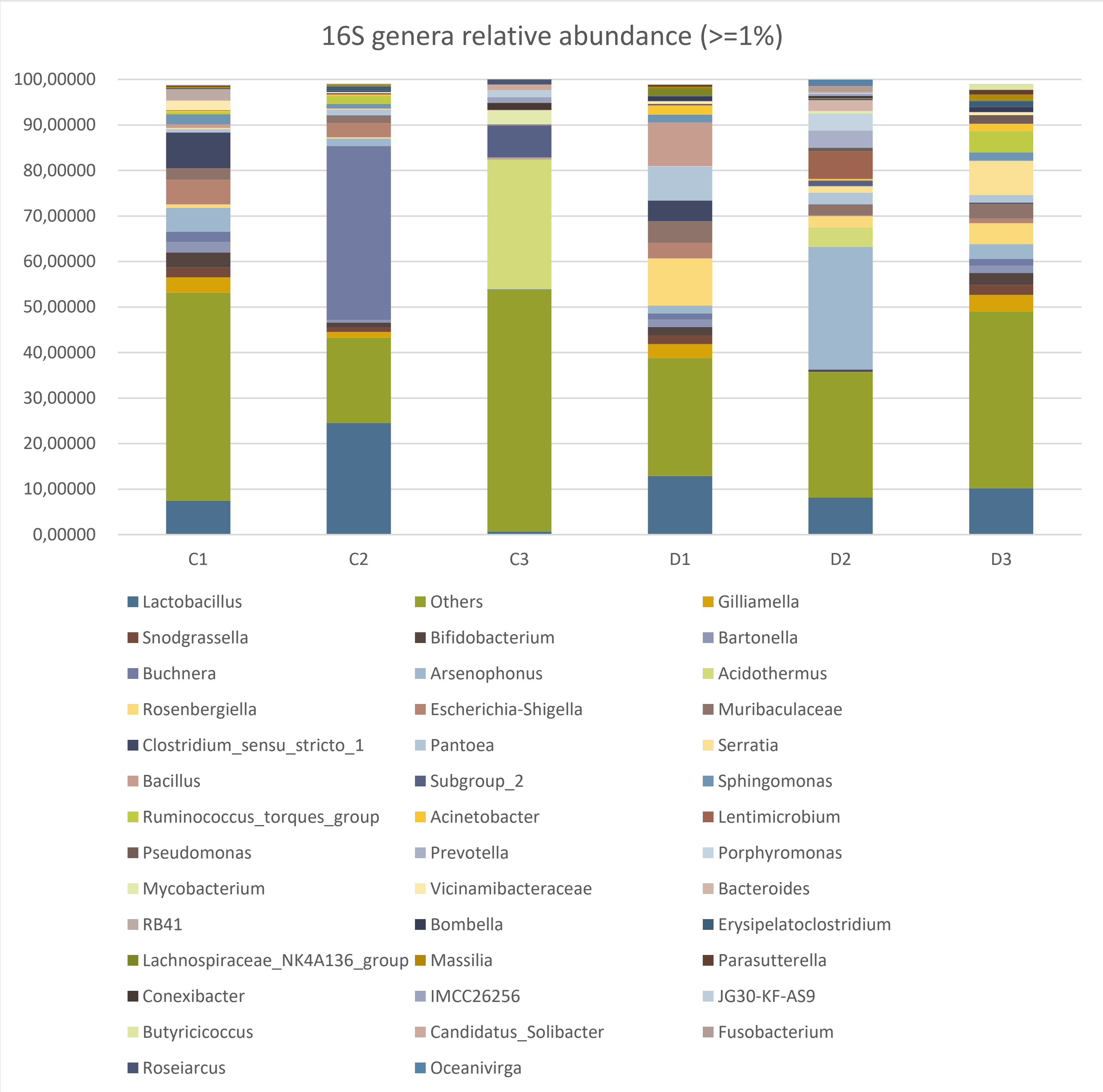


	A1	A2	A3	B1	B2	B3
Thiothrix	0,00000	1,48347	0,00000	0,00000	0,00222	0,00203
Commensalibacter	1,93777	0,21238	1,52089	0,70364	0,38425	1,73277
Serratia	0,72458	1,22307	0,47191	0,93242	0,01222	0,00914
Frischella	0,64870	1,93705	2,80887	2,28886	3,61260	0,35448
Escherichia-Shigella	0,29004	1,12701	0,65181	1,14900	0,62635	0,67645
Bartonella	13,94072	1,05978	22,18157	7,26923	3,40048	4,84587
Bifidobacterium	4,04187	9,94674	9,02889	9,06697	7,72161	9,80448
Snodgrassella	14,17359	4,25832	3,57975	5,73485	16,05513	10,67391
Gilliamella	9,15867	14,56472	15,22457	12,16115	23,33252	11,33513
Others	7,719896458	9,237024942	3,25905583	4,90208041	4,783110854	2,89980194
Lactobacillus	44,45438	52,97602	40,05945	52,89386	37,44531	56,38109

Αναφορικά με τα Γένη βακτηρίων του μελισσόψωμου (Εικόνα 21), παρατηρείται -όπως είναι αναμενόμενο- η ύπαρξη Γενών που συνιστούν το βασικό βακτηρίωμα των μελισσών και άρα μεταφέρονται στο μελισσόψωμο (*Lactobacillus*, *Snodgrassella*, *Bifidobacterium*, *Gilliamella*, *Bartonella*) (Saraiva et al., 2015; Mattila et al., 2012; Anderson et al., 2014).Επίσης εντοπίζονται Γένη που συμπεριλαμβάνονται στο κύριο βακτηρίωμα του μελισσόψωμου, σε συμφωνία με ευρήματα άλλων ερευνητικών ομάδων (*Lactobacillus, Bacillus, Acinetobacter*, *Escherichia-Shigella*, *Pantoea, Pseudomonas, Rosenbergiella, Arsenophonus*, *Serratia*) (DiCagno et al., 2019; Donkersley et al., 2018; Asama et al., 2015; Mattila et al., 2012; reviewed by Didaras et al., 2020; Disayathanoowat et al., 2020). Παρόλα αυτά, όπως και στα δείγματα μελισσών, λόγω σημαντικής απόκλισης ορισμένων δειγμάτων, είναι απαραίτητος ο έλεγχος μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων, για να έχει στατιστική σημασία η σύγκριση.

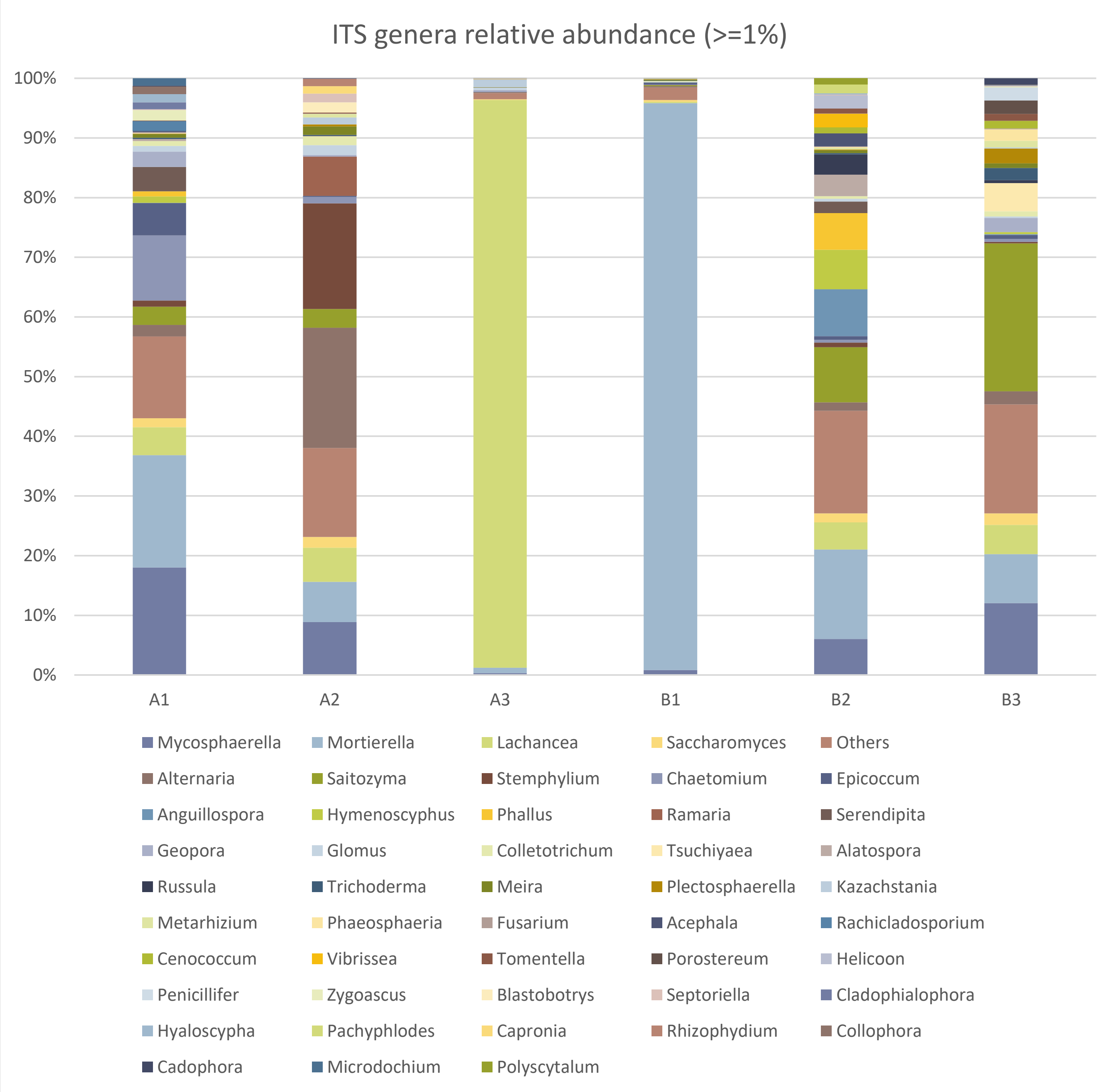
Το μόνο στατιστικά σημαντικό Γένος είναι το *Rosenbergiella* (t-test 0.08295), το οποίο αυξήθηκε (από 2,5 ως 10%) στα δείγματα D1, D2 και D3 (με αυξημένο αριθμό σπορίων *N. ceranae)*, σε σύγκριση με τους μάρτυρες C1, C2, C3. Το *Rosenbergiella* ανήκει στην Οικογένεια *Enterobacteriaceae,* Τάξη *Enterobacterales,* Ομοταξία *Gammaproteobacteria*, Φύλο Proteobacteria. Τα Είδη και στελέχη του Γένους αυτού, έχουν εντοπιστεί αποκλειστικά στο νέκταρ των λουλουδιών και μέσω αυτού μεταφέρονται στη γύρη και στο μελισσόψωμο. Σε προηγούμενες μελέτες διερεύνησης του βακτηριώματος του μελισσόψωμου, έχει αναφερθεί παρουσία του Γένους *Rosenbergiella*, αλλά δεν αναφέρεται η σχετική αφθονία του (Disayathanoowat et al., 2020, Donkersley et al., 2018). Το Γένος αυτό, ενδεχομένως να έχει αναπτύξει συμβιωτική σχέση με τα άνθη των φυτών στα οποία εντοπίζεται, σύμφωνα με μια διερεύνηση του γονιδιώματος του και ίσως κυριαρχεί σε εκείνα που εξαρτώνται από την επικονίαση μέσω εντόμων σύμφωνα με άλλη έρευνα. Και τα δύο χαρακτηριστικά αυτά δεν εξηγούν την αύξηση του, στα μελίσσια με αυξημένο αριθμό σπορίων. Περαιτέρω διερεύνηση σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, κρίνεται απαραίτητη, προκειμένου να αποδειχθεί εάν το συγκεκριμένο Γένος μπορεί να αποτελέσει βιοδείκτη διάγνωσης ή πρόγνωσης Νοζεμίασης.

Εικόνα 21: Σχετική αφθονία (Γενών) βακτηρίων στα δείγματα μελισσόψωμου



Το μυκητοβίωμα των μελισσών φαίνεται να εμφανίζει μεγαλύτερη ποικιλομορφία σε σχέση με το βακτηρίωμα (Paris et al., 2020). Κατά συνέπεια, και στην παρούσα μελέτη, δεν είναι εφικτή η εξαγωγή συμπερασμάτων, καθώς η σχετική αφθονία σε επίπεδο Γένους στα δείγματα των μελισσών (Εικόνα 22), παρουσιάζει πολύ σημαντικές διακυμάνσεις, ακόμη και μεταξύ των controls. Για παράδειγμα οι ζύμες *Lachancea* κυμαίνονται σε ποσοστά 4-5% σε 4 εκ των 6 δειγμάτων, 95% στο A3 και <0,22% στο B1. Επιπλέον κάποιοι από αυτούς τους μύκητες εμφανίζονται σε σχετική αφθονία >1% μόνο σε ένα εκ των έξι δειγμάτων, ενώ στα υπόλοιπα δεν ανιχνεύονται ή ανιχνεύονται σε αμελητέα ποσότητα <0,01%. Επομένως οι μύκητες και ζύμες των μελισσών δεν φαίνεται να είναι κατάλληλοι δείκτες στατιστικής ανάλυσης και σύγκρισης μεταξύ δειγμάτων

Εικόνα 22: Σχετική αφθονία (Γενών) μυκήτων στα δείγματα μελισσών

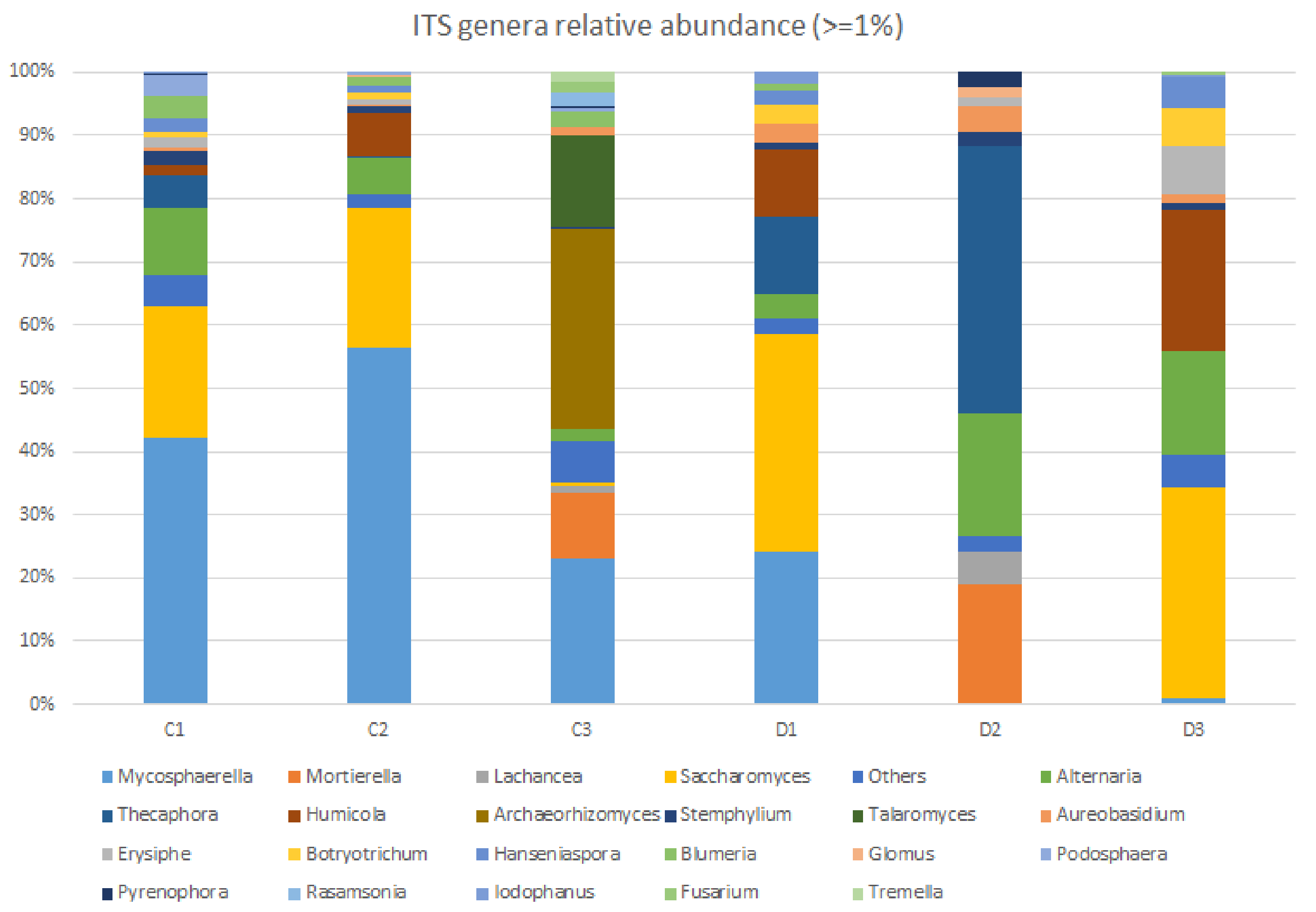


Τέλος, όσον αφορά τη σχετική αφθονία των Γενών μυκήτων στο μελισσόψωμο, (Εικόνα 23) πάλι γίνεται εμφανής η απόκλιση ορισμένων δειγμάτων, γεγονός που δυσχεραίνει την εξαγωγή συμπερασμάτων και οδηγεί σε μη στατιστικά σημαντική σύγκριση.

Μόνο το *Blumeria* (t-test 0,0369) είναι μειωμένο στα δείγματα μελισσόψωμου με αυξημένο αριθμό σπορίων παρασίτου, συγκριτικά με τα control. Από το Γένος αυτό εντοπίστηκε συγκεκριμένα το Είδος *Blumeria graminis* (Φύλο: Ascomycota, Ομοταξία: *Leotiomycetes*, Τάξη: *Erysiphales*, Οικογένεια *Erysiphaceae*). Πρόκειται για έναν υποχρεωτικά παρασιτικό παθογόνο μύκητα που μολύνει κυρίως σιτηρά και δημητριακά και οδηγεί στο σχηματισμό λευκής μούχλας (powdery mildew) στα φύλα τους.

Μέσω αυτών των φυτών και ενδεχομένως της επαφής *A. mellifera* κατά την συλλογή της γύρης, μπορεί αυτός ο μύκητας να μεταδίδεται στο μελισσόψωμο. Η μείωση του στα δείγματα με μεγάλο αριθμό σπορίων *N. ceranae* ίσως να σχετίζεται με ανταγωνισμό αυτών των δύο παρασίτων. Δηλαδή η παρουσία των ανθεκτικών σπορίων *N. ceranae* που βρίσκονται στο περιβάλλον της κυψέλης ή περνάνε στο μελισσόψωμο από τη μέλισσα κατά την παραγωγή του, να μην ευνοεί την ταυτόχρονη παρουσία άλλων παρασιτικών μικροοργανισμών. Σε μελλοντικές μελέτες θα ήταν ίσως χρήσιμη η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης *N. ceranae* με άλλους παθογόνους μύκητες της μέλισσας ή του μελισσόψωμου, καθώς και περαιτέρω διερεύνηση του *Blumeria* ως εν δυνάμει διαγνωστικός βιοδείκτης, σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.

Εικόνα 23: Σχετική αφθονία (Γενών) μυκήτων στα δείγματα μελισσόψωμου



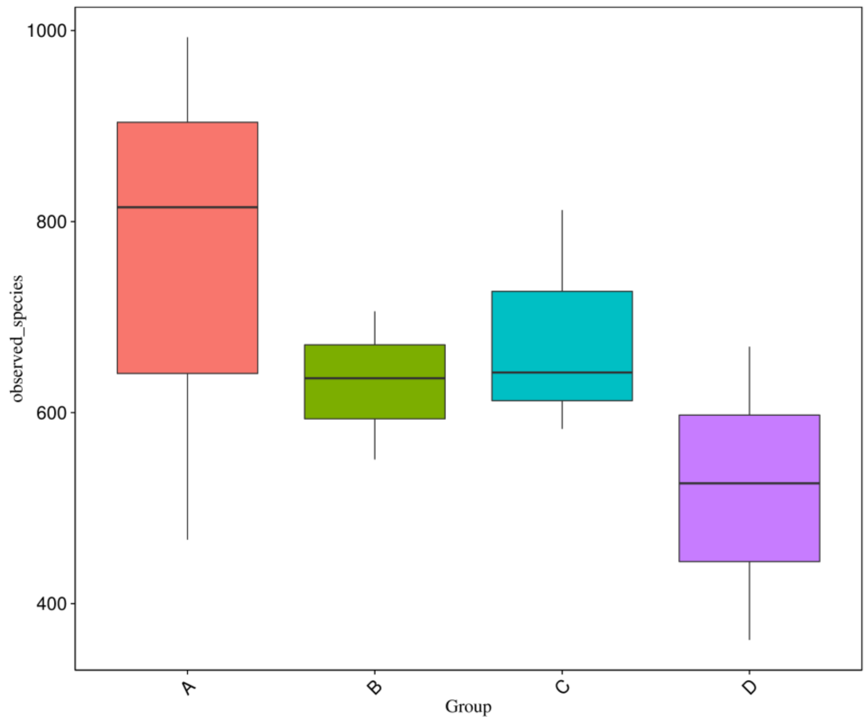
Αναφορικά με τους δείκτες άλφα ποικιλότητας, ο δείκτης Shannon χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ποικιλότητας εντός των δειγμάτων, λαμβάνοντας υπόψιν τον πλούτο και την αφθονία που παρατηρούνται σε αυτό. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του, τόσο μεγαλύτερη είναι και η ποικιλότητα του δείγματος. Ο δείκτης Simpson επίσης αντιπροσωπεύει αυξημένη ποικιλότητα όσο πλησιάζει το 1. Ο δείκτης Chao1 (και ACE) κάνει εκτίμηση του πλούτου των δειγμάτων και υπολογίζει τα αναμενόμενα OTUs με βάση τα παρατηρούμενα (τι μπορεί να χάθηκε κατά την αλληλούχιση). Ο δείκτης Good's coverage αντιπροσωπεύει την κάλυψη (βάθος αλληλούχισης), η οποία αυξάνεται όσο πλησιάζει το 1.

Σύμφωνα με τον Πίνακα 12 στα (control) δείγματα μελισσών A1, A2 έχουμε μεγάλη ποικιλότητα ενώ το A3 εμφανίζει σημαντική απόκλιση. Στα δείγματα μελισσών με σπόρια *Nosema ceranae* B1, B2, B3 τα παρατηρούμενα είδη είναι λιγότερα σε σχέση με τα control A1, A2. Παρόμοια τάση παρατηρείται και στα δείγματα μελισσόψωμου, με το δείγμα D2 (μελισσόψωμο με σπόρια *Nosema ceranae*) να εμφανίζει την πιο χαμηλή ποικιλότητα εκ του συνόλου των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά απεικονίζονται και στην Εικόνα 24. Η μείωση της άλφα ποικιλότητας στις μέλισσες έχει αποδοθεί -σε μελέτη της Paris και συνεργατών, ως αποτέλεσμα των ROS (ενεργών μορφών οξυγόνου), που εκλύονται από το ανοσοποιητικό, στο μέσο έντερο, ως απόκριση στο παράσιτο (Paris et al., 2020; Dussaubaut et al., 2012).

Πίνακας 12: Δείκτες άλφα ποικιλότητας για βακτήρια (Alpha diversity analysis)

Ονομασία δείγματος	Observed_species (unique OTUs)	Shannon	Simpson	Chao1	ACE	goods_coverage
A1	993	4.508	0.908	1079.531	1076.840	0.998
A2	815	4.667	0.918	877.153	886.932	0.999
A3	467	3.898	0.891	536.734	557.975	0.999
B1	636	4.266	0.911	717.643	714.564	0.999
B2	706	4.316	0.909	762.569	775.044	0.999
B3	551	3.989	0.896	593.327	607.701	0.999
C1	642	2.384	0.629	725.889	745.525	0.998
C2	583	4.034	0.875	649.729	657.942	0.999
C3	812	5.395	0.927	863.944	877.503	0.999
D1	526	3.995	0.877	599.333	616.087	0.999
D2	362	2.222	0.590	417.338	427.705	0.999
D3	669	3.854	0.854	746.887	750.221	0.999

Εικόνα 24: Boxplots με βάση τα Observed_species (βακτήρια) μεταξύ groups

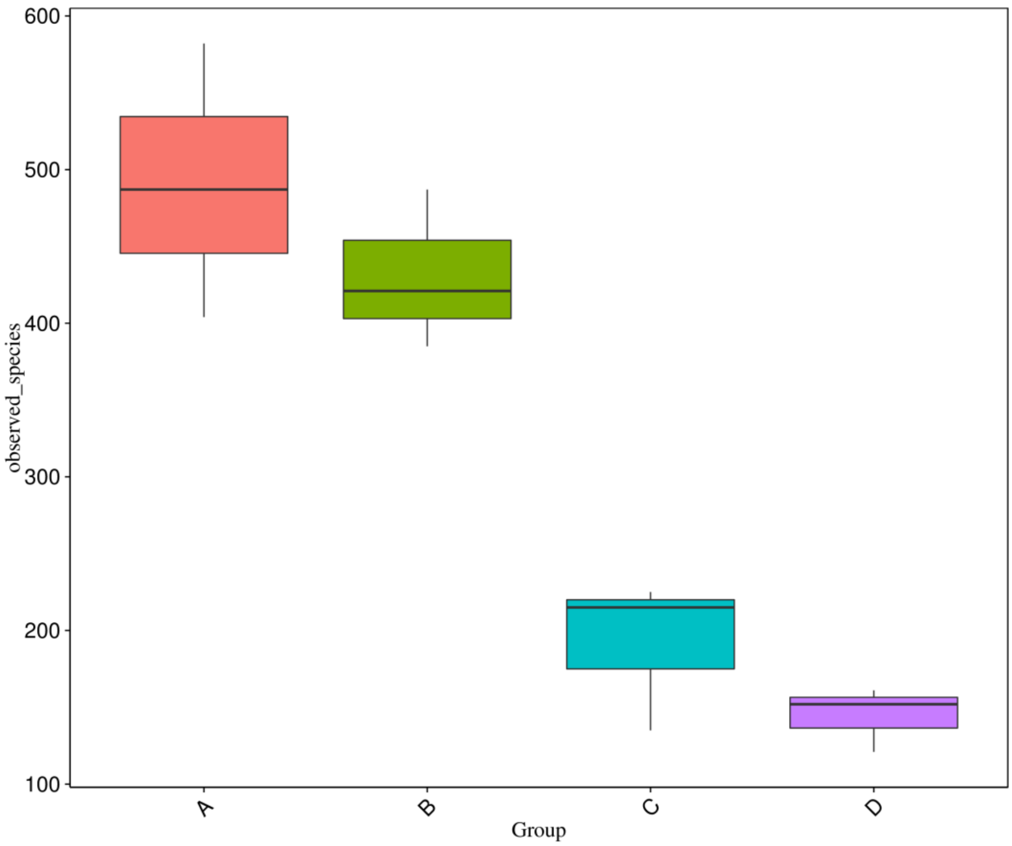


Όπως στα βακτήρια, έτσι και στους μύκητες, παρατηρείται μια γενικότερη τάση μείωσης της ποικιλότητας, στα δείγματα με *Nosema ceranae*, ιδιαίτερα αυτών του μελισσόψωμου (Πίνακας 13, Εικόνα 25).

Πίνακας 13: Δείκτες άλφα ποικιλότητας για μύκητες (Alpha diversity analysis)

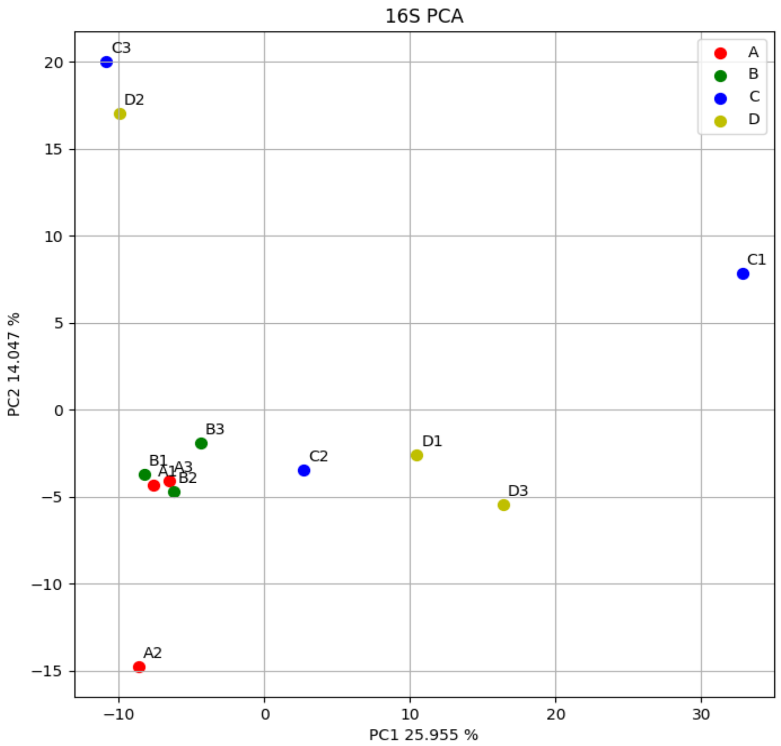
Ονομασία δείγματος	Observed_species (unique OTUs)	Shannon	Simpson	Chao1	ACE	goods_coverage
A1	582	3.960	0.848	626.272	648.482	0.999
A2	404	2.981	0.788	448.036	470.824	0.999
A3	487	3.708	0.844	518.474	559.500	0.999
B1	385	3.489	0.858	413.750	433.094	0.999
B2	421	2.400	0.664	451.800	470.618	0.999
B3	487	2.609	0.726	543.289	560.230	0.999
C1	225	3.465	0.850	245.023	257.445	1.000
C2	135	2.626	0.799	153.000	159.585	1.000
C3	215	3.126	0.826	226.810	234.792	1.000
D1	152	2.742	0.749	166.032	178.550	1.000
D2	161	3.109	0.843	172.111	176.904	1.000
D3	121	2.298	0.709	125.038	130.230	1.000

Εικόνα 25: Boxplots με βάση τα Observed_species (μύκητες) μεταξύ groups, παρατηρείται σημαντική μείωση της ποικιλότητας στα δείγματα μελισσών με Νοζεμίαση (B) σε σχέση με τα control (A), και μελισσόψωμου με Νοζεμίαση (D) σε σχέση με τα control (C)



Τέλος, αναλύεται η βήτα ποικιλότητα, που αφορά τη σύγκριση μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων. Στην ανάλυση PCA όσο πιο κοντινές είναι οι αποστάσεις μεταξύ δειγμάτων, τόσο περισσότερες ομοιότητες εμφανίζουν όσον αφορά την σύσταση του μικροβιώματος.

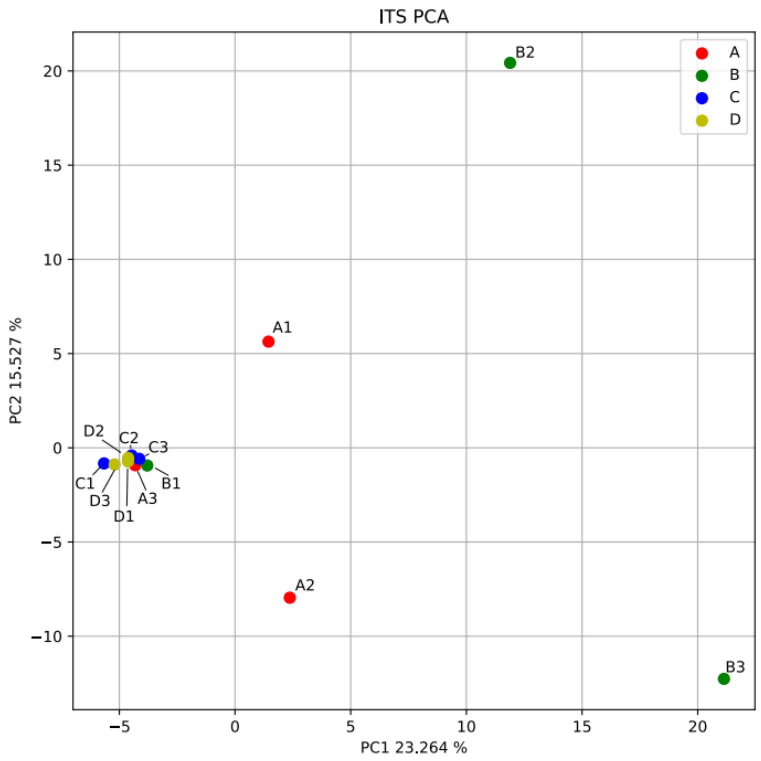
Εικόνα 26: PCA Βακτηρίων



Στα βακτήρια (Εικόνα 26), η ομάδα Α και Β ομοιάζουν, με εξαίρεση το Α2 που αποκλίνει σημαντικά. Το Α2 αναφέρεται στις μέλισσες της κυψέλης 14, οι οποίες θεωρήθηκαν υγιής-δηλαδή με αμελητέο αριθμό σπορίων του παρασίτου *N. ceranae*, όταν έγινε η λήψη των δειγμάτων. Όπως προαναφέρθηκε, η κυψέλη 14 κατέρρευσε, από άγνωστα αίτια, καθώς πέθανε ένα μεγάλο μέρος των μελισσών. Η απόκλιση του δείγματος Α2 στο PCA ενδεχομένως να συνδέεται με την κατάρρευση και θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί μελλοντικά ως προγνωστικός δείκτης. Σχετικά με τα δείγματα του μελισσόψωμου δεν φαίνεται κάποια συσχέτιση.

Στους μύκητες (Εικόνα 27), όλα τα δείγματα της ομάδας Α και Β διαφέρουν σημαντικά, οπότε η ανάλυση των μυκήτων στις μέλισσες, φαίνεται να μην αποτελεί καλή υποψήφια πηγή βιοδεικτών. Οι μύκητες όμως του μελισσόψωμου (ομάδες C και D) φαίνεται να εμφανίζουν μεγάλες ομοιότητες, ανεξάρτητα από των αριθμό παρασιτικών σπορίων.

Εικόνα 27: PCA Μυκήτων



4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από το σύνολο της ανάλυσης, αρχικά είναι ξεκάθαρη η μείωση της ποικιλότητας (μοναδικά OTUs) του μικροβιώματος (βακτηρίων και μυκήτων) στα δείγματα μελισσόψωμου και μελισσών με *N. ceranae* σε σχέση με τα υγιή. Η μείωση αυτή θα μπορούσε να αποτελέσει βιοδείκτη κακής πρόγνωσης για την υγεία του μελισσιού. Θα ήταν χρήσιμη περαιτέρω διερεύνηση, σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων με παράλληλη παρακολούθηση της υγείας των μελισσιών προέλευσης. Λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων, σημειώθηκαν σημαντικές αποκλίσεις όσον αφορά τη σύσταση του μικροβιώματος, με αποτέλεσμα η στατιστική ανάλυση να μην οδηγεί στον εντοπισμό αξιόπιστων βιοδεικτών. Δηλαδή δεν υπήρξε ένα Γένος βακτηρίου ή μύκητα, το οποίο να είχε την ίδια αφθονία (και άνω >1%) σε όλα τα δείγματα μελισσών ή μελισσόψωμου χωρίς *Nosema* και αντίστοιχη αυξομείωση σε όλα τα αντίστοιχα δείγματα με *Nosema*. Μόνο δύο Γένη, ένα Γένος βακτηρίου (*Rosenbergiella*) και ένα Γένος μύκητα (*Bulmeria*), με μικρή στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων μελισσόψωμου, ενδεχομένως να χρίζουν περαιτέρω διερεύνηση. Τέλος, η διερεύνηση των μυκήτων στις μέλισσες στην παρούσα μελέτη δεν έδωσε κάποιο ενδιαφέρον αποτέλεσμα, καθώς εμφανίζονται σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ κυψελών.

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[1] Anderson KE, Carroll MJ, Sheehan T, Mott BM, Maes P, Corby-Harris V, (2014) Hive-Stored Pollen of Honey Bees: Many Lines of Evidence Are Consistent with Pollen Preservation, Not Nutrient Conversion. *Molecular Ecology*, *23*, 5904–5917. https://doi.org/10.1111/mec.12966.

[2] Asama T, Arima T-H, 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*, 818–826. https://doi.org/10.1111/jam.12889.

[3] Bakour M, Fernandes Â, Barros L, Sokovic M, Ferreira ICFR, Badiaa I, (2019) Bee Bread as a Functional Product: Chemical Composition and Bioactive Properties. *LWT*, *109*, 276–282. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.008.

[4] Bonilla-Rosso G, Engel P, (2018) Functional Roles and Metabolic Niches in the Honey Bee Gut Microbiota. *Current Opinion in Microbiology, Environmental Microbiology*The New Microscopy*, *43*, 69–76. https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.12.009.

[5] Botías C, Martín-Hernández R, Barrios L, Meana A, Higes M, (2013) *Nosema* Spp. Infection and Its Negative Effects on Honey Bees (*Apis mellifera iberiensis)* at the Colony Level. *Vet Res*, *44*, 25. https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-25.

[6] Brodschneider R, Crailsheim K, (2010) Nutrition and Health in Honey Bees. *Apidologie*, *41*, 278–294. https://doi.org/10.1051/apido/2010012.

[7] Cali A, Becnel JJ, Takvorian PM (2017) Microsporidia. In *Handbook of the Protists* (Eds: JM. Archibald, AGB. Simpson, CH Slamovits) Springer International Publishing, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28149-0_27.

[8] Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM, (1995) New Method for the Extraction of Viral RNA and DNA from Cerebrospinal Fluid for Use in the Polymerase Chain Reaction Assay. *Journal of Virological Methods*, *53*, 25–36. https://doi.org/10.1016/0166-0934(94)00173-E.

[9] 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. https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.02.007.

[10] Didaras NA, 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*, 811. https://doi.org/10.3390/antibiotics9110811.

[11] 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. https://doi.org/10.3390/microorganisms8020264.

[12] Dong ZX, Li HY, Chen YF, Wang F, Deng XY, Lin LB, Zhang QL, Li JL, Guo J, (2020). Colonization of the gut microbiota of honey bee (*Apis mellifera*) workers at different developmental stages. *Microbiological Research*, *231*, 126370. https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126370

[13] 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*, 4743–4756.
https://doi.org/10.1002/ece3.3999.

[14] Dranca F, Ursachi F, Oroian M, (2020) Bee Bread: Physicochemical Characterization and Phenolic Content Extraction Optimization. *Foods*, *9*, 1358.
https://doi.org/10.3390/foods9101358.

[15] Dussaubat C, Brunet J-L, Higes M, Colbourne JK, Lopez J, Choi J-H, Martín-Hernández R, Botías C, Cousin M, McDonnell C, Bonnet M, Belzunces LP, Moritz RFA, Conte YL, Alaux C, (2012) Gut Pathology and Responses to the Microsporidium *Nosema Ceranae* in the Honey Bee *Apis Mellifera*. *PLOS ONE*, *7*, e37017.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037017.

[16] Fries I, (2010) *Nosema Ceranae* in European Honey Bees (*Apis Mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, *103*, S73–S79.
https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.017.

[17] Fries I, Feng F, da Silva A, Slemenda SB, Pieniazek NJ, (1996) *Nosema Ceranae* n. Sp. (Microspora, Nosematidae), Morphological and Molecular Characterization of a Microsporidian Parasite of the Asian Honey Bee *Apis Cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*, *32*, 356–365.
https://doi.org/10.1016/S0932-4739(96)80059-9.

[18] Gilliam M, (1997) Identification and Roles of Non-Pathogenic Microflora Associated with Honey Bees. *FEMS Microbiology Letters*, *155*, 1–10.
https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12678.x.

[19] Gisder S, Möckel N, Linde A, Genersch E, (2011) A Cell Culture Model for *Nosema Ceranae* and *Nosema Apis* Allows New Insights into the Life Cycle of These Important Honey Bee-Pathogenic Microsporidia. *Environmental Microbiology*, *13*, 404–413.
https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02346.x.

[20] Goblirsch M, (2018) *Nosema Ceranae* Disease of the Honey Bee (*Apis Mellifera*). *Apidologie*, *49*, 131–150.
https://doi.org/10.1007/s13592-017-0535-1.

[21] Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL, (2015). Bee Declines Driven by Combined Stress from Parasites, Pesticides, and Lack of Flowers. *Science*, *347*, 10. https://doi.org/10.1126/science.1255957.

[22] Han B, Weiss LM, (2017) Microsporidia: Obligate Intracellular Pathogens Within the Fungal Kingdom. *Microbiology Spectrum*, *5*, 10.
https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0018-2016.

[23] Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, Bailón EG, González-Porto AV, Barrios L, del Nozal MJ, Bernal JL, Jiménez JJ, Palencia PG, Meana A, (2008) How Natural Infection by *Nosema Ceranae* Causes Honeybee Colony Collapse. *Environmental Microbiology*, *10*, 2659–2669. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x.

[24] Higes M, Martín-Hernández R, Meana A, (2010) *Nosema Ceranae* in Europe: An Emergent Type C Nosemosis. *Apidologie*, *41*, 375–392.
https://doi.org/10.1051/apido/2010019.

[25] Khalifa SAM, Elashal M, Kieliszek M, Ghazala NE, Farag MA, Saeed A, Xiao J, Zou X, Khatib A, Göransson U, El-Seedi HR, (2020). Recent Insights into Chemical and Pharmacological Studies of Bee Bread. *Trends in Food Science & Technology*, *97*, 300–316. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.021.

[26] Koch H, Abrol DP, Li J, Schmid-Hempel P, (2013) Diversity and Evolutionary Patterns of Bacterial Gut Associates of Corbiculate Bees. *Molecular Ecology*, *22*, 2028–2044. https://doi.org/10.1111/mec.12209.

[27] Kwong WK, Medina LA, Koch H, Sing K-W, Soh EJY, Ascher JS, Jaffé R, Moran NA, (2017) Dynamic Microbiome Evolution in Social Bees. *Science Advances*, 3, e1600513. https://doi.org/10.1126/sciadv.1600513.

[28] Kwong WK, Moran NA, (2016) Gut Microbial Communities of Social Bees. *Nature Reviews Microbiology*, *14*, 374–384. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.43.

[29] Mărgăoan R, Stranț 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. https://doi.org/10.3390/antiox8120568.

[30] Martinson VG, Moy J, Moran NA, (2012) Establishment of Characteristic Gut Bacteria during Development of the Honeybee Worker. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*, 2830–2840. https://doi.org/10.1128/AEM.07810-11.

[31] Martín-Hernández R, Bartolomé C, Chejanovsky N, Le Conte Y, Dalmon A, Dussaubat C, García-Palencia P, Meana A, Pinto MA, Soroker V, Higes M, (2018) *Nosema Ceranae* in *Apis Mellifera*: A 12 Years Postdetection Perspective. *Environmental Microbiology*, *20*, 1302–1329. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14103.

[32] 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*, e32962. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032962.

[33] Terrestrial Manual Online Access. OIE - World Organisation for Animal Health. OIE, 2018, Terrestial Manual, Chapter 3.2.4, pp 744-749 Nosemosis of Honey Bees

[34] Paris L, El Alaoui H, Delbac F, Diogon M, (2018) Effects of the Gut Parasite *Nosema Ceranae* on Honey Bee Physiology and Behavior. *Current Opinion in Insect Science*, *26*, 149–154. https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.017.

[35] Paris L, Peghaire E, Moné A, Diogon M, Debroas D, Delbac F, El Alaoui H, (2020) Honeybee gut microbiota dysbiosis in pesticide/parasite co-exposures is mainly induced by *Nosema ceranae*. Journal of Invertebrate Pathology 172, 107348. https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107348

[36] Paxton RJ, (2010) Does Infection by *Nosema Ceranae* Cause "Colony Collapse Disorder" in Honey Bees (*Apis Mellifera*)? *Journal of Apicultural Research*, *49*, 80–84. https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.11.

[37] Saraiva MA, Zemolin APP, Franco JL, Boldo JT, Stefenon VM, Triplett EW, de Oliveira Camargo FA, Roesch LFW, (2015) Relationship between Honeybee Nutrition and Their Microbial Communities. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *107*, 921–933. https://doi.org/10.1007/s10482-015-0384-8.

[38] vanEngelsdorp D, Meixner MD, (2010) A Historical Review of Managed Honey Bee Populations in Europe and the United States and the Factors That May Affect Them. *Journal of Invertebrate Pathology*, *103*, S80–S95. https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.011.

[39] Vásquez A, Olofsson TC, (2009) The Lactic Acid Bacteria Involved in the Production of Bee Pollen and Bee Bread. *Journal of Apicultural Research*, *48*, 189–195. https://doi.org/10.3896/IBRA.1.48.3.07

[40] Zhang Y, Su M, Wang L, Huang S, Su S, Huang WF, (2021) *Vairimorpha* (*Nosema*) *ceranae* Infection Alters Honey Bee Microbiota Composition and Sustains the Survival of Adult Honey Bees. *Biology 10*, 905. https://doi.org/10.3390/biology10090905

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτριο Μόσιαλο που μου επέτρεψε να εκπονήσω την παρούσα διπλωματική και για την καθοδήγηση του καθ’ όλη τη διάρκειά της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Ασούτη Νίκο για τη συνεργασία μας στο εργαστήριο και την βοήθεια του. Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για την συνεργασία μας, ιδιαίτερα τον κ. Τηλέμαχο Δημητρίου και την κ. Χριστίνα Τσαδήλα για τις γνώσεις και την υποστήριξή τους.

Για την πολύτιμη συνδρομή του στις βιοπληροφορικές αναλύσεις θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Νικολαΐδη Μάριο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Φανή Χατζήνα και τον κ. Γρηγόριο Αμούτζια για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή, την ανάγνωση της διατριβής και τη γενικότερη συνεργασία τους.