



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ  
ΦΟΣΜΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΔΙΑΛΟΓΗ ΚΛΩΝΩΝ ΜΕ  
ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ**

CONSTRUCTION OF A GENOMIC FOSMID LIBRARY AND  
SELECTION OF CLONES EXERTING ANTIBACTERIAL  
ACTIVITY

ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2023

Κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης φοσμιδίου και διαλογή κλώνων με  
αντιβακτηριακή δράση

Construction of a genomic fosmid library and selection of clones exerting antibacterial  
activity

### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

**Επιβλέπων: Μόσιαλος Δημήτριος:** Αναπληρωτής καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Δημητρίου Τηλέμαχος:** Μέλος ΕΔΙΠ(Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό) του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με γνωστικό αντικείμενο τη Μοριακή Μικροβιολογία

**Αμούτζιας Γρηγόριος:** Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοπληροφορικής του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με έμφαση στην Μικροβιολογία

## Ευχαριστίες

Ευχαριστώ πολύ τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Μόσιαλο Δημήτριο για την άριστη συνεργασία, την συνεχή καθοδήγηση και τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε στο πρόσωπο μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δυο πολύ σημαντικά μέλη της επιτροπής κ. Δημητρίου Τηλέμαχο και κ. Αμούτζια Γρηγόριο.

Ακόμη, οφείλω να ευχαριστήσω την ομάδα του εργαστηρίου και ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτωρ Τσαδήλα Χριστίνα για την συνεχή βοήθειά της σε ότι πρόβλημα και δυσκολία αντιμετώπισα κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω την οικογένεια μου για την συμπαράσταση τους και τη συνεχή εμπύχωση και εμπιστοσύνη.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	8
Abstract.....	10
<b>I. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
<b>1.Εισαγωγή</b>	
1.1.Το μέλι: τι είναι.....	11
1.2.Συστατικά του μελιού.....	12
1.3.Ευεργετικές δράσεις του μελιού στον άνθρωπο.....	12
1.4.Αντιβακτηριακή δράση - Αντιβακτηριακοί παράγοντες στο μέλι.....	13
1.4.1.Υπεροξειδίο του υδρογόνου(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	13
1.4.2. Bee-defensin-1.....	14
1.4.3. Άλλες αντιμικροβιακές ουσίες του μελιού.....	14
1.5.Το μικροβίωμα του μελιού.....	15
1.6.Μεταγονιδιωματική.....	16
1.7.Γονιδιωματική-Μελέτη του γονιδιώματος των οργανισμών.....	19
1.8.Υπό μελέτη παθογόνα στελέχη.....	21
1.8.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
1.8.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	21
1.8.3. <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	22
1.8.4. <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	22
1.9.Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	24

## **II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

<b>2.Υλικά και μέθοδοι.....</b>	<b>25</b>
2.1.Υλικά, όργανα και υποστρώματα.....	25
2.2. Απομόνωση βακτηριών από το μέλι.....	26
2.3. Εκχύλιση DNA από βακτηριακά στελέχη.....	27
2.4.Έλεγχος συγκέντρωσης και καθαρότητας του DNA.....	28
2.5.Δημιουργία βιβλιοθήκης: CopyControl Fosmid Library Production Kit....	29
2.5.1.Κατασκευή άκρων του DNA mix.....	29
2.5.2.Κατακρύμνιση DNA.....	29
2.5.3. Αντίδραση λιγάσης .....	30
2.5.4. Αντίδραση πακεταρίσματος.....	30
2.5.5. Τιτλοδότηση.....	31
2.6. Αποθήκευση βιβλιοθήκης φοσμιδίων.....	31
2.7. Επίστρωση βιβλιοθήκης και συλλογή κλώνων.....	31
2.8. Έλεγχος κλώνων για αντιβακτηριακή δράση.....	32
2.9. Πέρασμα κλώνων σε τριβλία.....	32
2.10. Δοκιμή επίστρωσης διπλής καλλιέργειας με soft agar.....	33
2.11. Διαλογή κλώνων με αντιβακτηριακή δράση.....	33

## **III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

<b>3. Αποτελέσματα.....</b>	<b>36</b>
3.1.Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από 7 επιλεγμένα στελέχη.....	36
3.2.Αποτελέσματα-έλεγχος συγκέντρωσης και ποιότητας.....	36
3.3.Ανάμειξη των εκχυλισμένων DNA από κάθε βακτηριακό στέλεχος και έλεγχος συγκέντρωσης και ποιότητας του mix DNA.....	37

3.4. Συλλογή κλώνων και αποτελέσματα ελέγχου αντιμικροβιακής δράσης.....	38
3.5. Αποτελέσματα ελέγχου κλώνων για αντιβακτηριακή δράση έναντι 4 παθογόνων.....	38
3.6. Εκτεταμένη ανάλυση 7 κλώνων που παρατηρήθηκαν έντονες ζώνες αναστολής.....	40
3.7. Εκχύλιση φοσμιδίων και πέψη με περιοριστικό ένζυμο BamHI.....	41
3.8. Πέψη του φοσμιδίου του κλώνου 9F από την πλάκα 7 και με BamHI και με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI .....	42

#### **IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ**

4. Συζήτηση-σχολιασμός.....	44
-----------------------------	----

#### **V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

5. Βιβλιογραφία.....	47
----------------------	----

## Περίληψη

Το μέλι από την αρχαιότητα αποτελούσε ένα πολύτιμο τρόφιμο πολλών λαών και χρησιμοποιούνταν ως φάρμακο για την καταπολέμηση διάφορων ασθενειών. Η αντιβακτηριακή του δράση ήταν γνωστή από εκείνα τα χρόνια με πρόσφατες μελέτες να έχουν επιβεβαιώσει αυτά τα δεδομένα. Το μέλι που παράγεται από τις μέλισσες του είδους *Apis mellifera* έχει υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και χαμηλή σε νερό. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), το πεπτίδιο Bee-defensin-1 και η μεθυλγλυοξάλη (MGO) είναι ενώσεις που εντοπίζονται σε μέλια και συμβάλλουν στην αναστολή της ανάπτυξης αρκετών παθογόνων μικροοργανισμών. Ο συνδυασμός φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του μελιού, καθώς και σημαντικών αντιβακτηριακών ενώσεων είναι που δίνουν στο μέλι την αντιμικροβιακή δράση.

Παρά τους ανασταλτικούς παράγοντες, υπάρχουν βακτήρια, μύκητες και ζύμες που έχουν απομονωθεί από το μέλι και πιθανά συμβάλουν στην αντιβακτηριακή του δράση. Στην Ελλάδα και σε όλο τον κόσμο έχουν γίνει σημαντικές μελέτες πάνω στο μικροβίωμα μελιών με την απομόνωση στελεχών από στοχευμένες ομάδες μικροοργανισμών όπως λακτοβάκιλλους και βακίλλους που μπορούν να παράγουν αντιμικροβιακές ουσίες *in vitro*.

Η μεταγονιδιωματική, ένα σύνολο ερευνητικών τεχνικών που συνδυάζει μοριακή γενετική, μικροβιακή οικολογία και ανάλυση δεδομένων, βοήθησε στη ανάλυση των μικροβιακών γονιδιωμάτων και στην καλύτερη κατανόηση της γενετικής ποικιλομορφίας των βακτηρίων. Για την δημιουργία μιας μεταγονιδιωματικής βιβλιοθήκης απαιτείται καλή απόδοση στην εκχύλιση του DNA που σε αρκετές περιπτώσεις είναι αρκετά δύσκολη διαδικασία. Η λειτουργική γονιδιωματική βασίζεται στην ανάλυση ολόκληρων γονιδιωμάτων και πρωτεομάτων ενός αναπτυσσόμενου αριθμού οργανισμών.

Ως εκ τούτου, στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια κατασκευής μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης φοσμιδίου από DNA προερχόμενο από βακτηριακά στελέχη τα οποία έχουν απομονωθεί από διάφορα είδη μελιών διαφορετικής βοτανικής προέλευσης. Επίσης, έγινε έλεγχος της με στόχο τη διαλογή κλώνων που εμφάνιζαν αντιμικροβιακή δράση έναντι τεσσάρων παθογόνων, των *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* και *Salmonella Typhimurium*.

Από τους 940 κλώνους που ελέγχθηκαν σχετικά με την αντιβακτηριακή τους δράση έναντι των τεσσάρων παθογόνων, 4 κλώνοι εμφάνισαν ζώνη αναστολής έναντι του *Staphylococcus aureus*, 4 κλώνοι έναντι της *Pseudomonas aeruginosa*, 3 έναντι του *Acinetobacter baumannii* και 7 έναντι της *Salmonella Typhimurium*.

Στους 7 κλώνους που εμφάνιζαν ζώνες αναστολής έναντι της *Salmonella Typhimurium* πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του φοσμιδίου και πέψη όλων των φοσμιδίων για να ελεγχθεί η ποιότητα της βιβλιοθήκης. Επιλέχθηκε ο κλώνος 9F της πλάκας 7 και το φοσμίδιο στάλθηκε για αλληλούχηση προκειμένου να αναλυθούν πιθανές γονιδιακές



ομάδες που συμβάλλουν στην αντιβακτηριακή δράση έναντι του παθογόνου της *Salmonella Typhimurium*.

## **Abstract**

Since ancient times, honey has been a valuable food of many peoples and used as medicine to combat various diseases. Its antibacterial activity has been known since those years and recent studies have confirmed this data. Honey produced by *Apis mellifera* bees is high in sugar and low in water. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Bee-defensin-1 peptide and methylglyoxal (MGO) are compounds found in honey and help to inhibit the growth of several pathogenic microorganisms. The combination of physicochemical characteristics of honey, as well as important antibacterial compounds, are what give honey its antimicrobial effect.

Despite the inhibitory factors, there are bacteria, fungi and yeasts that have been isolated from honey and possibly contribute to its antibacterial effect. In Greece and around the world, important studies have been done on the honey microbiome by isolating strains from targeted groups of microorganisms such as lactobacilli and bacilli that can produce antimicrobial substances in vitro.

Metagenomics, a set of research techniques that combines molecular genetics, microbial ecology and data analysis, has helped analyze microbial genomes and better understand the genetic diversity of these bacteria. For the creation of a metagenomic library, a good performance in the extraction of DNA is required, which in many cases is quite a difficult process. Functional genomics is based on the analysis of whole genomes and proteomes of a growing number of organisms.

Therefore, in the present study, an attempt was made to construct a genomic fosmid library from DNA derived from bacterial strains that have been isolated from various types of honey of different botanical origin. It was also tested with the aim of screening clones that showed antimicrobial activity against four pathogens, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* and *Salmonella Typhimurium*.

Of the 940 clones tested for their antibacterial activity against the four pathogens, 4 clones showed a zone of inhibition against *Staphylococcus aureus*, 4 against *Pseudomonas aeruginosa*, 3 against *Acinetobacter baumannii* and 7 against *Salmonella Typhimurium*.

The 7 clones showing zones of inhibition against *Salmonella Typhimurium* were subjected to fosmid extraction and digestion of all fosmids to check library quality. Plate 7 clone 9F was selected and the fosmid was sent for sequencing to analyze potential gene clusters contributing to antibacterial activity against the pathogen *Salmonella Typhimurium*.

## **1.1.Το μέλι: τι είναι**

Με βάση την κοινοτική νομοθεσία, το μέλι είναι μια φυσική γλυκιά ουσία που παράγεται από τις μέλισσες του είδους *Apis mellifera* είτε από το νέκταρ των φυτών, είτε από εκκρίματα εντόμων που ονομάζονται μελιτώματα. Οι μέλισσες συλλέγουν το μέλι και το τροποποιούν με διάφορους τρόπους για την τροφή τους εωσότου γίνει η αποθήκευση του στις κηρήθρες τους (Gulzar & Tajamul, 2014).

Το νέκταρ μετατρέπεται σε μέλι με τον εξής τρόπο: Οι σιελογόνοι και υπέρ-φαρυγγικοί αδένες των μελισσών διαθέτουν δυο πολύ βασικά ένζυμα. Την ιμπερτάση, ένζυμο απαραίτητο για την μετατροπή του νέκταρος σε μέλι και την οξειδάση της γλυκόζης για την μετατροπή της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ. Οι μέλισσες καθώς επεξεργάζονται το μέλι, διασπούν τη σακχαρόζη σε ίσες ποσότητες γλυκόζης και φρουκτόζης. Αυτοί οι τρεις είναι και οι κυριότεροι υδατάνθρακες του μελιού.

Καθώς το μέλι είναι ο υδατάνθρακας που αφομοιώνεται πιο εύκολα και ο μόνος γλυκαντικός παράγοντας που χρησιμοποιείται χωρίς επεξεργασία, στην αρχαιότητα είχε γίνει αντικείμενο εκμετάλλευσης. Συγκεκριμένα Αιγύπτιοι, Έλληνες, Ρωμαίοι και Κινέζοι χρησιμοποιούσαν παραδοσιακά το μέλι για να θεραπεύσουν πληγές και ασθένειες του εντέρου, συμπεριλαμβανομένων των γαστρικών ελκών. Επίσης το μέλι μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως φάρμακο για τον πονόλαιμο, τον βήχα και τον πόνο στα αυτιά, πράγμα που σημαίνει ότι ήταν γνωστή η αντιβακτηριακή του δράση. Πέρα από τη διατροφική του αξία γινόταν και χρήση του για ιατρικούς λόγους με συγγράμματα του Ιπποκράτη να αναφέρουν ότι ο ίδιος χρησιμοποιούσε το μέλι σε συνδυασμό με νερό και ξύδι προκειμένου να θεραπεύσει ασθενείς με οξέα νοσήματα (Mahmood & Altalibi, 2012).

## **1.2.Συστατικά του μελιού**

Το μέλι είναι ένα υπερκορεσμένο σακχαρώδες και αρωματικό προϊόν με μεγάλη θρεπτική αξία. Η σύσταση του εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το είδος της τροφής και την φυτική πηγή από την οποία τρέφεται η μέλισσα όπως επίσης μπορεί να παίζει σπουδαίο ρόλο και η γεωγραφική θέση του. Παρόλα αυτά, κάθε είδος μελιού, χημικά, είναι ένα μίγμα κυρίως σακχάρων (80%) και νερού (17%). Τα επικρατέστερα σάκχαρα στο μέλι είναι η φρουκτόζη (18,2% ) , η γλυκόζη (30,1%) και η σακχαρόζη (1,27%) για αυτό τα φυσικά και διατροφικά χαρακτηριστικά του εξαρτιόνται σε μεγαλύτερο βαθμό από αυτά (Hossain et al., 2022a). Το εναπομείναν 3% περιλαμβάνει άλλα συστατικά όπως, πρωτεΐνες, αμινοξέα, οργανικά οξέα, βιταμίνες, μέταλλα, πολυφαινόλες, φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα (βενζοϊκό οξύ). Το pH του μελιού είναι χαμηλό και κυμαίνεται μεταξύ 3,3 και 4,5. Τέλος θα πρέπει να επισημανθεί ότι η σύσταση του μελιού εξαρτάται και σε μεγάλο βαθμό από τη βοτανική του προέλευση(Almasaudi, 2021).

## **1.3.Ευεργετικές δράσεις του μελιού στον άνθρωπο**

Το μέλι παίζει σημαντικό ρόλο στο «ευ ζην» του ανθρώπου και έχει ευεργετικές επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Έχει αντιοξειδωτική, αντιβακτηριακή, αντιφλεγμονώδη και φαρμακευτική δράση, καταστέλλοντας την ανάπτυξη αρκετών βακτηρίων. Κάποια επιπλέον θετικά χαρακτηριστικά του είναι ο ρόλος στην επούλωση των πληγών, στην καρδιαγγειακή υγεία και στις παθήσεις του ήπατος και του παγκρέατος (Hossain et al., 2022).

Πιο συγκεκριμένα, πρόσφατες μελέτες φανερώνουν ότι το μέλι θα μπορούσε να έχει ανασταλτική επίδραση στη χρόνια φλεγμονή, στο οξειδωτικό στρες και στα γονίδια σχετικά με αυτά. Επιδρά αρνητικά στη ρύθμιση των φλεγμονωδών μεταγραφικών παραγόντων (NF-κΒ και MAPK), καταστέλλει τη σύνθεση προφλεγμονωδών κυτοκινών και διεγείρει την παραγωγή αντιφλεγμονωδών μεσολαβητών(Ranneh et al., 2021). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι είναι ένας χρήσιμος παράγοντας στην αναστολή της ανάπτυξης όγκων, επειδή ενεργοποιεί τη δράση των μακροφάγων και αυξάνει τον αριθμό των λευκοκυττάρων του αίματος. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες του μπορούν να αποτρέψουν την εξάπλωση των μεταστατικών κυττάρων(Visweswara Rao Pasupuleti et al. 2017).Το μέλι στο οποίο η αναλογία φρουκτόζης-γλυκόζης είναι 1:1 μπορεί να συμβάλει στην ύπαρξη καλύτερων επιπέδων σακχάρου στο αίμα, το οποίο είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για όσους πάσχουν από λιπώδη ηπατική νόσο, καθώς παρέχει επαρκή αποθήκευση γλυκογόνου στα ηπατικά κύτταρα. Τέλος, τα φλαβονοειδή του μελιού μειώνουν τους παράγοντες κινδύνου σε καρδιαγγειακές παθήσεις μειώνοντας την ικανότητα των αιμοπεταλίων να σχηματίζουν θρόμβους-συσσωματώματα και βελτιώνοντας τις λειτουργίες του ενδοθηλίου(Yaghoobi et al., 2008).

## **1.4.Αντιβακτηριακή δράση - Αντιβακτηριακοί παράγοντες στο μέλι**

Το μέλι είναι γνωστό ότι δεν επιτρέπει την ανάπτυξη διάφορων μικροοργανισμών. Η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων σε συνδυασμό με την χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό-υγρασία προκαλεί οσμωτικό στρες, εμποδίζοντας την αλλοίωση του μελιού από μικροοργανισμούς και καθιστώντας το χρήσιμο στη συντήρηση τροφίμων και φρούτων. Η αραίωση του μελιού κατά ένα ποσοστό 30-40 % δεν είναι αρκετή ώστε το μέλι να χάσει την αντιβακτηριακή του δράση καθώς η συγκέντρωση των σακχάρων παραμένει επαρκής. Τα φλαβονοειδή και το χαμηλό pH που κυμαίνεται μεταξύ 3,3 και 4,5 μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη αρκετών παθογόνων βακτηρίων (Hossain et al., 2022b).

Ο συνδυασμός φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του μελιού, καθώς και σημαντικών αντιβακτηριακών ενώσεων όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το πεπτίδιο Bee-defensin-1 και η μεθυλγλυοξάλη είναι που δίνουν στο μέλι αυτή την ταυτότητα η οποία κρίνει περαιτέρω μελέτης (Manvic et al., 2008).

### **1.4.1.Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> είναι ένα ισχυρό οξειδωτικό μέσο υπεύθυνο για την αντιβακτηριακή δράση του. Κατά την διαδικασία ωρίμανσης, η μέλισσα προσθέτει στο νέκταρ το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης από τους υπερφάρυγγικούς αδένες της. Το ένζυμο μετατρέπει τη γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ που είναι και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από οποιοδήποτε άλλο οξύ στο μέλι, ενώ το παραπροϊόν της αντίδρασης είναι το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (γλυκόζη + O<sub>2</sub> → γλυκονικό οξύ + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Kwakman & Zaat, 2012). Ρόλος του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> είναι να προλαμβάνει την αλλοίωση του άγουρου μελιού, όταν ακόμα η συγκέντρωση των σακχάρων δεν επαρκεί ώστε να αναστείλει την ανάπτυξη των βακτηρίων. Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που επιταχύνει την αντίδραση διάσπασης του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → H<sub>2</sub>O + ½ O<sub>2</sub>) το οποίο όμως δεν έχει εντοπιστεί ποτέ στο μέλι. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να εξεταστεί εάν το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> είναι τόσο σημαντικό στην καταπολέμηση των βακτηρίων. Έχει διαπιστωθεί ότι παράγοντες που επηρεάζουν τη συσσώρευση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> είναι είτε η προσθήκη καταλάσης είτε η καταστολή του ενζύμου της οξειδάσης της γλυκόζης με έκθεση σε θερμότητα ή φως. Μελέτες έχουν δείξει ότι η εξουδετέρωση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> οδηγεί σε ελάττωση της αντιβακτηριακής δράσης μελιών, υποδεικνύοντας το σπουδαίο ρόλο του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Cornara et al., 2017). Ωστόσο, κάποια μέλια συνεχίζουν να εμφανίζουν αντιβακτηριακή δράση που περιγράφεται ως μη-υπεροξειδιακή. Αυτό υποδηλώνει ότι υπάρχουν και άλλοι παράγοντες όπως πεπτίδια, πολυφαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή που έχουν επίσης αξιοσημείωτο ρόλο έναντι των βακτηρίων (Cianciosi et al., 2018).

### **1.4.2. Bee-defensin-1**

Ένα πρόσφατα αναγνωρισμένο πεπτίδιο είναι η Bee-defensin-1 που ονομάζεται και royalisin. Το συγκεκριμένο πεπτίδιο έχει προ-αναγνωριστεί στις μέλισσες και συγκεκριμένα στην αιμολέμφο, σε κεφάλια, στους θωρακικούς αδένες αλλά και στον βασιλικό πολτό (Kwakman et al., 2010). Η Bee-defensin-1 έχει ισχυρότατη αντιβακτηριακή δράση αλλά μόνο έναντι των Gram θετικών βακτηρίων συμπεριλαμβανομένων των *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* και *Paenibacillus larvae* (Bachanová et al., 2002). Το πεπτίδιο εκκρίνεται από τον υποφαρυγγικό αδέντα των μελισσών, οι οποίες χρησιμοποιούν τις εκκρίσεις του για την παραγωγή βασιλικού πολτού και μελιού. Η ωρίμανση των εργατριών μελισσών σχετίζεται με την μεγαλύτερη παραγωγή μελιού. Η ποσότητα της Bee-defensin-1 ποικίλλει σε βασιλικούς πολτούς και μέλια άρα η έκφραση και η ποσότητα της έκφρασης από τους αδένες διαφέρει (Mandal & Mandal, 2011). Παρόλο αυτά δεν έχει γίνει συστηματική διερεύνηση του συγκεκριμένου πεπτιδίου ούτε έχουν διασαφηνιστεί τα επίπεδα της στο μέλι.

### **1.4.3. Άλλες αντιμικροβιακές ουσίες του μελιού**

Λαμβάνοντας υπόψη όλα αυτά τα χαρακτηριστικά που έχει ένα μέλι και συμβάλλουν στην αντιβακτηριακή του δράση, είναι δύσκολο να αξιολογηθούν σε πλήρη διαφάνεια οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του μελιού. Η δραστηριότητα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> εξαρτάται από τον επαρκή όγκο νερού, ενώ στην οσμωτικότητα και οξύτητα, η αραίωση του μελιού μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την αντιβακτηριακή τους δράση. Επιπλέον, μέλια διαφορετικής βοτανικής προέλευσης μπορεί να ασκούν διαφορετικά επίπεδα αντιβακτηριακής δράσης, με βάση την παρουσία ή όχι διαφορετικών βιοδραστικών μορίων (πχ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Κάποιες ουσίες που έχουν προσδιοριστεί και σχετίζονται με την αντιβακτηριακή δράση είναι το συριγγικό οξύ (3,5-διμεθοξύ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ), και η πινοσεμπρίνη. Τέλος, **το ίδιο το μικροβίωμα του μελιού έχει προταθεί να παίζει ρόλο στην αντιβακτηριακή του δράση**. Μικροοργανισμοί που υπάρχουν στο μέλι μπορούν να παράγουν αντιμικροβιακές ενώσεις και να αποτελούν πηγή αυτής της δράσης ωστόσο είναι κάτι που παραμένει ασαφές (Tramuta et al., 2017).

## 1.5. Το μικροβίωμα του μελιού

Παρά την ύπαρξη πολλών ανασταλτικών παραγόντων ( $H_2O_2$ , MGO, πεπτίδια, pH, οσμωτικότητα), υπάρχουν μικροοργανισμοί που επιβιώνουν στο μέλι. Πρόκειται για βακτήρια, μύκητες και ζύμες και έχουν συστηθεί ως πιθανή πηγή αντιμικροβιακών ενώσεων. Τα βακτήρια που έχουν απομονωθεί από το μέλι μπορούν να παράγουν αντιμικροβιακές ενώσεις *in vitro*, αλλά δεν υπάρχουν άμεσες ενδείξεις για την ύπαρξη τέτοιων ουσιών στο μέλι. Σύμφωνα με μελέτες, το συμβιωτικό μικροβίωμα της μέλισσας αποτελείται από 27% θετικά κατά Gram βακτήρια, 70% αρνητικά κατά Gram βακτήρια και 1% από ζύμες. Είναι ενδιαφέρον ότι ο αριθμός των μικροοργανισμών στο μέλι κυμαίνεται σε ένα ευρύ φάσμα, από 0 έως αρκετές χιλιάδες CFUs, ανά γραμμάριο, ανάλογα με το δείγμα και τη φρεσκάδα του (Iurlina & Fritz, 2005). Ιταλοί ερευνητές ανέφεραν χαμηλό βακτηριακό φορτίο σε 33 από τα 38 δείγματα μελιού που συγκομίστηκαν στη νότια Ιταλία. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν από άλλους ερευνητές στην Αργεντινή, το Μαρόκο, την Πολωνία, Σαουδική Αραβία και Μεξικό. Οι Fernández et al. μελέτησαν τη μικροβιολογική ποιότητα του μελιού από την Αργεντινή και τα αποτελέσματά τους ήταν συγκρίσιμα με αυτά που αναφέρθηκαν σε προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην Αργεντινή καθώς και σε άλλα μέρη του κόσμου (Fernández et al., 2017). Έχουν επίσης απομονωθεί βακτήρια από μέλι που παράγεται από μέλισσες χωρίς κεντρί. Επιπλέον, υπάρχουν μελέτες που έχουν περιγράψει τις μικροβιακές κοινότητες του μελιού χρησιμοποιώντας μεθόδους ανεξάρτητες από την καλλιέργεια, όπως η αλληλούχηση επόμενης γενιάς (NGS).

Σημαντική ήταν η ανακάλυψη ενός βακτηριακού μικροβιώματος σε συμβίωση με μέλισσες, που είναι παρόν σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο μέλι. Το μικροβίωμα αυτό αποτελείται από περίπου 40 βακτηριακά στελέχη, 13 ταυτοποιημένα, 9 *Lactobacillus* spp. και 4 *Bifidobacterium* spp (Syed Yaacob et al., 2018). Γενικά, ορισμένα είδη μπορούν να παράγουν αντιμικροβιακά πεπτίδια και αντιβιοτικά έναντι διαφόρων παθογόνων των μελισσών. Είναι ενδιαφέρον ότι εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση τόσο σε συνδυασμό, όσο και ξεχωριστά. Δεν παρουσιάζουν όλα τα είδη και τα στελέχη τις ίδιες αντιμικροβιακές ιδιότητες ούτε παράγουν τις ίδιες αντιμικροβιακές ουσίες. Τα 13 είδη βακτηρίων γαλακτικού οξέος ποικίλλουν αριθμητικά σε φυσικά συγκομισθέντα μέλια ανάλογα με την πηγή νέκταρ, την υγεία των μελισσών και την παρουσία άλλων μικροοργανισμών στο συλλεγόμενο νέκταρ, τους οποίους έχουν να ανταγωνιστούν.

Τα *Bacillus* spp. είναι τα πιο διαδεδομένα βακτήρια στο μέλι. Ανήκουν στην οικογένεια Bacillaceae. Τα είδη βάκιλλων είναι θετικά κατά Gram βακτήρια, ραβδόμορφα, αερόβια και σχηματίζουν ενδοσπόρια. Παρουσιάζουν υψηλή ανθεκτικότητα που τους επιτρέπει να ζουν σε κάθε φυσικό περιβάλλον. Ένα ενδοσπόριο σχηματίζεται μόνο ανά κύτταρο και είναι ανθεκτικά στη θερμότητα, το κρύο, την ακτινοβολία, την αποξήρανση και τα απολυμαντικά (López & Alipri, 2007).

Σημαντικές μελέτες έχουν γίνει και πάνω στο μικροβίωμα ελληνικών μελιών με την απομόνωση στελεχών από στοχευμένες ομάδες μικροοργανισμών όπως

λακτοβάκιλλους και βακίλλους που συμβάλλουν στην αντιμικροβιακή δράση των μελιών αυτών (Tsadila et al., 2021).

## **1.6.Μεταγονιδιωματική**

Οι μικροοργανισμοί συμβάλλουν σημαντικά στην βιολογική ποικιλότητα της γης και υπάρχουν σχεδόν παντού στο περιβάλλον. Ο συνολικός αριθμός μικροβιακών κυττάρων στη γη εκτιμάται ότι είναι περίπου  $10^{30}$ . Το μεγαλύτερο ποσοστό του μικροβιακού πληθυσμού αποτελείται από προκαρυώτες που περιλαμβάνουν  $10^6$  με  $10^8$  ξεχωριστά είδη. Είναι ευρέως γνωστό και αποδεκτό ότι οι προκαρυώτες αντιπροσωπεύουν μια σε μεγάλο βαθμό ανεξερεύνητη βιολογική και γενετική δεξαμενή που μπορεί να αξιοποιηθεί για εύρεση νέων ουσιών με μοναδικές μεταβολικές ικανότητες (Ngara & Zhang, 2018). Ωστόσο, οι συμβατικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο για την καλλιέργεια των βακτηριών είναι συχνά αναποτελεσματικές και περιορισμένες, καθώς τα περισσότερα βακτήρια που λαμβάνονται από περιβαλλοντικά δείγματα είναι επί του παρόντος μη καλλιεργήσιμα. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί σε παράγοντες όπως τα επίπεδα ατμοσφαιρικού οξυγόνου, οσμωτικές συνθήκες, συνθήκες pH και θερμοκρασίας καθώς και σε συγκεκριμένα θρεπτικά συστατικά. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητη μια σειρά τεχνικών που να μην απαιτούν καλλιέργεια των μικροοργανισμών. Η κατανόηση και η εκμετάλλευση της γενετικής ποικιλομορφίας των μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων είναι απαραίτητη και μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της μεταγονιδιωματικής (Pushpender Kumar Sharma, 2012).

## **Τι είναι η μεταγονιδιωματική**

Η μεταγονιδιωματική είναι ένα σύνολο ερευνητικών τεχνικών που συνδυάζει μοριακή γενετική, μικροβιακή οικολογία και ανάλυση δεδομένων. Το κεντρικό αντικείμενο μελέτης είναι το μεταγονιδίωμα, το συνολικό γενετικό περιεχόμενο των μικροοργανισμών που υπάρχουν σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα. Η μεταγονιδιωματική βασίζεται σε μεθόδους βακτηριακής ταυτοποίησης, ανεξάρτητες από την καλλιέργεια, πράγμα που σημαίνει ότι επιτρέπει την ανίχνευση του συνόλου των μικροβίων ακόμη και των ειδών που δεν μπορούν να απομονωθούν και να καλλιεργηθούν με τις υπάρχουσες τεχνικές κλασικής μικροβιολογίας (Woolley et al., 2010). Αυτό το πλεονέκτημα σε συνδυασμό με την υψηλή απόδοση των πλατφόρμων αλληλούχησης DNA έδωσε την ευκαιρία στους ερευνητές να αποκαλύψουν τον μέχρι τώρα άγνωστο και απαραίτητο πλούτο των μικροβιακών γονιδιωμάτων που περιέχονται στο έδαφος, στους ωκεανούς μέχρι και στις γεωθερμικές πηγές. Ιδιαίτερα, η ανακάλυψη της ανθρώπινης μικροβιακής κοινότητας παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για τους ιατρικούς ερευνητές (Sudarikov et al., 2017). Η ανάλυση του μικροβιακού γονιδιώματος του ανθρώπινου εντέρου δίνει τη δυνατότητα ανακάλυψης νέων βιοδεικτών ασθενειών και να γίνει κατανοητή με μεγαλύτερη



ακρίβεια η επίδραση της διατροφής, της ιατρικής θεραπείας και άλλων παραγόντων στην ομοίωση του ανθρώπινου οργανισμού. Επίσης μέσω της μεταγονιδιωματικής είναι δυνατή η εύρεση νέων γονιδίων και η απομόνωση νέων ενζύμων. Οι νέες τεχνολογίες αλληλούχησης και η δραστική μείωση του κόστους της αλληλούχησης δίνουν την δυνατότητα να μην εξετάζονται μερικά μεμονωμένα είδη, αλλά δεκάδες χιλιάδες γονιδιώματα ταυτόχρονα που αντιστοιχούν σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα (Handelsman et al., 1998).

Η μεταγονιδιωματική είναι μέσο ταξινόμησης και χειρισμού ολόκληρου του γενετικού υλικού που απομονώνεται από περιβαλλοντικά δείγματα. Αυτή είναι μια διαδικασία που βασίζεται στην αποτελεσματικότητα των εξής βημάτων: α) την επιλογή μιας περιβαλλοντικής θέσης (niche), β) την απομόνωση του DNA από ένα περιβαλλοντικό δείγμα, γ) τον χειρισμό του γενετικού υλικού δηλαδή την κλωνοποίηση σε κατάλληλο φορέα και τον μετασχηματισμό των κλώνων σε βακτηριακούς υποδοχείς, δ) την κατασκευή βιβλιοθήκης και ε) την ανάλυση του γενετικού υλικού στη μεταγονιδιωματική βιβλιοθήκη (Srivastava et al., 2013). Δυστατητικές χρησιμοποιούνται γενικά για την διαλογή και τον εντοπισμό νέων γονιδίων από μεταγονιδιωματικές βιβλιοθήκες: α) η ανάλυση που βασίζεται στην αλληλούχηση του DNA και β) η λειτουργική ανάλυση.

### **α) Μεταγονιδιωματική με βάση την αλληλούχηση**

Η μεταγονιδιωματική ανάλυση αλληλούχησης περιλαμβάνει πλήρη προσδιορισμό της αλληλουχίας των κλωνοποιημένων DNA. Κλώνοι που περιέχουν φυλογενετικούς δείκτες υποδεικνύουν την πιθανή ταξινομική ομάδα και προσδιορίζουν την πηγή του θραύσματος DNA. Εναλλακτικά μπορεί να διεξαχθεί τυχαία αλληλούχηση και μόλις εντοπιστεί ένα γονίδιο ενδιαφέροντος, θα αναζητηθούν φυλογενετικοί δείκτες στο γειτονικό τμήμα DNA ώστε να παρέχουν ένα φυλογενετικό σύνδεσμο με το λειτουργικό γονίδιο (Handelsman, 2004). Η συλλογή και ποικιλομορφία των φυλογενετικών δεικτών αυξάνεται με αποτέλεσμα να καθίσταται δυνατή η αντιστοίχιση ολόεντα και περισσότερων θραυσμάτων ανώνυμου DNA στους οργανισμούς από τους οποίους έχουν απομονωθεί. Η προσέγγιση αυτή έχει και κάποια μειονεκτήματα: α) απαιτεί μια βάση δεδομένων για την ανάλυση της αλληλουχίας DNA και δεν εγγυάται την ανάκτηση της πλήρους μορφής των γονιδίων και β) τα γονίδια που ανακτώνται μπορεί να σχετίζονται με ήδη γνωστά γονίδια (Fuhrman, 2012).

### **β) Λειτουργική μεταγονιδιωματική**

Οι κλώνοι που εκφράζουν επιθυμητά χαρακτηριστικά επιλέγονται από τις μεταγονιδιωματικές βιβλιοθήκες και αναλύονται οι μοριακές και βιοχημικές πτυχές αυτών των ενεργών κλώνων. Η επιτυχία της λειτουργικής μεταγονιδιωματικής καθορίζεται από την μεταγραφή και μετάφραση των γονιδίων ενδιαφέροντος και

έκκριση του γονιδιακού προϊόντος. Έτσι έχουν εντοπιστεί νέα γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και αποικοδομητικά ένζυμα. Σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι ότι τα γονίδια ενδιαφέροντος έχουν αναγνωριστεί από μια ανάλυση αλληλουχίας, καθιστώντας τη μεταγονιδιωματική την μόνη προσέγγιση με δυνατότητα να προσδιορίσει νέες κατηγορίες γονιδίων που σχετίζονται με νέες ή ήδη γνωστές λειτουργίες. Βασικό μειονέκτημα είναι ότι τα περισσότερα γονίδια δεν θα εκφράζονται στο οποιοδήποτε βακτήριο-ξενιστή που επιλέγεται για κλωνοποίηση(Nikolouli & Mossialos, 2012).

Υπάρχουν φορείς που δέχονται μικρά ενθέματα μεγέθους ως 10kb και είναι συνήθως τα πλασμίδια. Λόγω του μικρού ενθέματος υπάρχει υψηλή αποτελεσματικότητα, ωστόσο εάν ο φαινότυπος που ερευνάται ελέγχεται από ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων, η μέθοδος δεν είναι αποτελεσματική, λόγω του ότι δεν μπορούν να περιέχονται σε ένα τόσο μικρό ένθεμα. Οι βιβλιοθήκες φοσμιδίων και βακτηριακών τεχνητών χρωμοσωμάτων (BACs) έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την κατασκευή μεταγονιδιωματικών βιβλιοθηκών, λόγω της ικανότητας τους να μεταφέρουν μεγάλα τμήματα DNA. Η κλωνοποίηση τέτοιων τμημάτων του μεταγονιδιωματικού DNA επιτρέπει την στόχευση ολόκληρων λειτουργικών οπερονίων με τη δυνατότητα ανάκτησης ολόκληρων μεταβολικών μονοπατιών. Αν και η πιστότητα δεν είναι υψηλή, η προσέγγιση αυτή έχει βοηθήσει στην απομόνωση πολλών πολυγονιδιακών μονοπατιών (Streit et al., 2004).

### **Παράγοντες που επηρεάζουν την μεταγονιδιωματική ανάλυση**

Η μοριακή ποιότητα και η απόδοση του εκχυλισμένου DNA είναι σημαντική για την δημιουργία μιας μεταγονιδιωματικής βιβλιοθήκης. Είναι πιθανό η ποιότητα και η απόδοση του εκχυλισμένου DNA να είναι χαμηλή λόγω της συνεκχύλισης του DNA της ενδιαφερόμενης μικροβιακής κοινότητας με ευκαρυωτικό DNA ή DNA ξενιστή. Αυτό δημιουργεί προβλήματα στην επακόλουθη επεξεργασία του δείγματος και μπορεί να οδηγήσει σε μόλυνση των βιβλιοθηκών κλώνων με μιτοχονδριακές και χλωροπλαστικές αλληλουχίες με αποτέλεσμα οι μεταγονιδιωματικές βιβλιοθήκες να είναι σε μεγάλο βαθμό προσανατολισμένες προς το συνολικά προϊόν και όχι προς τις επιθυμητές αλληλουχίες. Επίσης ορισμένοι τύποι δειγμάτων αποδίδουν συχνά πολύ μικρές ποσότητες DNA. Η παραγωγή βιβλιοθηκών απαιτεί υψηλές ποσότητες (νανογραμμαρίων ή μικρογραμμαρίων DNA) και ως εκ τούτου ίσως απαιτείται ενίσχυση του αρχικού υλικού (Kunin et al., 2008).

Ένας τέτοιος τύπος δείγματος μπορεί να θεωρηθεί και το μέλι. Το γονιδιωματικό DNA του μελιού προέρχεται από πλήθος φυτών, εντόμων και βακτηρίων ή μυκήτων. Η απομόνωση DNA χαρακτηρίζεται ως μια δύσκολη διαδικασία καθώς η σύνθεση του μελιού είναι αρκετά πολύπλοκη με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα (75%) και επίσης άλλες ουσίες όπως οργανικά οξέα, πολυφαινόλες, χρωστικές και ένζυμα. Σημαντική προϋπόθεση πριν από την εκχύλιση DNA είναι η προετοιμασία του δείγματος για απομόνωση σωματίων γύρης και την εξάλειψη ανεπιθύμητων ουσιών,

όπως σάκχαρα και φλαβονοειδή καθώς λειτουργούν ως ανασταλτικοί παράγοντες για την PCR. Κατά συνέπεια, το πρωτόκολλο εξαγωγής DNA από μέλι απαιτεί να τροποποιηθεί για να ληφθεί υψηλή ποιότητα DNA και να εξασφαλιστεί επαρκή ποσότητα (Burke et al., 2009).

## **Η συνεισφορά της μεταγονιδιωματικής**

Οι εφαρμογές της μεταγονιδιωματικής περιλαμβάνουν τη μελέτη των μικροοργανισμών σε ποικίλα περιβάλλοντα. Έχει επίσης πολλές εφαρμογές στον ιατρικό τομέα όπως η αναγνώριση παθογόνων μικροοργανισμών στην εντερική οδό, λοιμώξεις της κυκλοφορίας του αίματος, πνευμονικές λοιμώξεις και λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος. Προς το παρόν η μεταγονιδιωματική έρευνα επικεντρώνεται σε ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια, σε ανθεκτικά στα αντιβιοτικά γονίδια, βιοκαταλύτες και φάρμακα (Nnadozie & Odume, 2019). Επιπλέον, η μεταγονιδιωματική χρησιμοποιείται στην έρευνα που σχετίζεται με τη γεωργία, τη βιολογία, τον έλεγχο της ρύπανσης, την ενέργεια, το περιβάλλον και την ατμόσφαιρα. Στο έδαφος υπάρχουν τεράστιοι μικροοργανισμοί και οι μελέτες έχουν αποδείξει ότι είναι μια πιθανή πηγή αντιβιοτικών και αντιμυκητιακών παραγόντων. Οι μεταγονιδιωματικές τεχνικές χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των οδών διάφορων δευτερογενών μεταβολιτών. Ένα καλό παράδειγμα είναι οι μεταβολίτες που σχετίζονται με τους θαλάσσιους ακτινομύκητες που διαθέτουν γονίδια βιοσύνθεσης πολυκετόνης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή νέων φαρμάκων (Arango-Argoty et al., 2018).

Άρα, η μεταγονιδιωματική μπορεί να βοηθήσει στην εξερεύνηση νέων λειτουργικών μικροοργανισμών και γονιδίων. Στο μέλλον η μεταγονιδιωματική θα συνδυαστεί με τη μέτα-μεταγραφομική, τη πρωτεωμική και τη μεταβαλομική. Ο συνδυασμός αυτών των κλάδων θα οδηγήσει στη μελέτη, από τα γονίδια στις πρωτεΐνες και από τη δομή στη λειτουργία (Zhang et al., 2021).

## **1.7.Γονιδιωματική-Μελέτη του γονιδιώματος των οργανισμών**

Η βιολογία και η ιατρική υφίστανται μια επανάσταση που βασίζεται στον επιταχυνόμενο προσδιορισμό των αλληλουχιών DNA. Μέσα σε ένα σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα, η έρευνα έχει αλλάξει από τη μελέτη μεμονωμένων γονιδίων και πρωτεϊνών στην ανάλυση ολόκληρων γονιδιωμάτων και πρωτεομάτων ενός αναπτυσσόμενου αριθμού οργανισμών. Η λειτουργική γονιδιωματική και η βιολογία συστημάτων χρησιμοποιούν μια τεράστια κλίμακα δεδομένων γονιδιώματος για να περιγράψουν τις λειτουργίες και αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίων και πρωτεϊνών τόσο εντός ενός γενετικού δικτύου όσο και εντός ενός γονιδιώματος. Εκμεταλλεύονται όλο το εύρος του γονιδιώματος, σε αντίθεση με την γονιδιακή προσέγγιση των τεχνικών της κλασσικής μοριακής βιολογίας (Bunnik & le Roch, 2013).

Η κατασκευή βιβλιοθήκης γονιδιωματικού DNA μπορεί να επιτευχθεί με διάτμηση του DNA σε ένα κατάλληλο μέγεθος, σύνδεση των θραυσμάτων σε φορέα και εισαγωγή αυτών των κυκλοποιημένων θραυσμάτων γονιδιώματος σε κατάλληλο ξενιστή που συνήθως είναι βακτηριακά κύτταρα.

Οι βιβλιοθήκες βακτηριακών τεχνητών χρωμοσωμάτων (BAC) και οι βιβλιοθήκες γονιδιώματος φοσμιδίου είναι ευρέως χρησιμοποιούμενες. Οι BAC βιβλιοθήκες είναι σε θέση να διατηρήσουν ενθέματα DNA έως 300 ζεύγη κιλοβάσεων. Λόγω της σχετικής σταθερότητας και του μεγάλου μεγέθους ενθέματος έχουν γίνει ο κύριος τύπος βιβλιοθήκης για την αλληλουχία ενός γονιδιώματος. Οι βιβλιοθήκες φοσμιδίου έχουν περιορισμένο εύρος μεγέθους του ενθέματος (38-42 kb). Ωστόσο, τα φοσμίδια είναι πιο σταθερά από τα BACs άρα είναι πιο αντιπροσωπευτικά για ένα γονιδίωμα. Εκτός από την αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος, οι βιβλιοθήκες BAC ή φοσμιδίου (fosmid) είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας μιας στοχευμένης περιοχής του γονιδιώματος, αναλύοντας προαγωγείς ή συγκρίνοντας απλότυπους των πολυμορφικών παραλλαγών (Quail et al., 2011). Η χαρτογράφηση σύνδεσης χρησιμοποιείται συχνά για την αναγνώριση μοριακών δεικτών που σχετίζονται με γονιδιωματικές περιοχές που ελέγχουν τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Οι βιβλιοθήκες γονιδιώματος μπορούν να ελεγχθούν χρησιμοποιώντας δείκτες που συνδέονται με έναν φαινότυπο και επομένως διευκολύνουν την ανακάλυψη γονιδίων που αποτελούν τη βάση της φαινοτυπικής αλλαγής

Στόχος της λειτουργικής γονιδιωματικής είναι όλα τα γονίδια ενός συγκεκριμένου δικτύου που εμπλέκονται σε αποκρίσεις ή φαινοτύπους να αναγνωριστούν. Ο χαρακτηρισμός ανεξερεύνητων ή νέων αντιμικροβιακών ενώσεων και η ανακάλυψη νέων αντιβιοτικών είναι επιτακτική ανάγκη. Οι λειτουργικές γονιδιωματικές βιβλιοθήκες μπορούν να συνδέσουν γρήγορα γονότυπους με φαινότυπους. Ωστόσο, σε βακτηριακά γονιδιώματα είναι δύσκολη η συσχέτιση των δεδομένων αλληλουχίας με την λειτουργία καθώς κωδικοποιούν πολλά γονίδια άγνωστης λειτουργίας (Huang et al., 2022).

## **1.8.Υπό μελέτη παθογόνα στελέχη**

### **1.8.1.Staphylococcus aureus**

Ο *S.aureus* ανήκει στους θετικούς κατά Gram κόκκους, είναι προαιρετικά αναερόβιος και μη σπορογόνος. Τα βακτήρια αυτά έχουν μικρό, σφαιρικό σχήμα και σχηματίζουν ακανόνιστες μάζες που μοιάζουν με τσαμπί σταφυλιού εξ' ου και η ονομασία τους. Οι αποικίες του έχουν ένα χαρακτηριστικό χρυσό χρώμα εξαιτίας της σταφυλλοξανθίνης, μια καροτενοειδούς χρωστικής ουσίας που παράγουν (Anthimidou & Mossialos, 2013).

Ο *S.aureus* λόγω της της ικανότητας του να αναπτύσσει ανθεκτικότητα σε πολλά κλινικά αντιβιοτικά ανήκει στους “ESKAPE” παθογόνους μικροοργανισμούς και απαιτεί άμεση μελέτη. Είναι επίσης ένα από τα πιο σημαντικά νοσοκομειακά παθογόνα. Προκαλεί πολλές ασθένειες και λοιμώξεις όπως οστεομυελίτιδα, ενδοκαρδίτιδα αλλά και πιο σοβαρές δερματικές λοιμώξεις όπως φουρουλκίαση. Επίσης είναι υπεύθυνος για τροφικές δηλητηριάσεις, λόγω της απελευθέρωσης εντεροτοξινών στα τρόφιμα. Παράγει πλήθος μολυσματικών παραγόντων όπως υαλουρονιδάση που διασπά το υαλουρονικό οξύ για να βοηθήσει στην εξάπλωση του παθογόνου στους ιστούς, δεοξυριβονουκλεάσες που επιτίθενται στο κυτταρικό DNA και σχηματίζει πηκτώματα στο πλάσμα αναστέλλοντας την φαγοκυττάρωση (Hetem et al., 2017).

Ο *S. aureus*, επειδή παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία στο μέλι, έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετά πειράματα όσο αφορά τις αντιβακτηριακές ιδιότητες του μελιού. Μελέτες έχουν δείξει ότι το μέλι παράγει ζώνες αναστολής εναντίον του συγκεκριμένου παθογόνου. Ο μηχανισμός παραμένει σχετικά άγνωστος ωστόσο επιδρά σε συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου και στον κυτταρικό του κύκλο.

### **1.8.2.Pseudomonas aeruginosa**

Η *P.aeruginosa* είναι ένα φθορίζον αρνητικό κατά Gram βακτήριο με αερόβιο μεταβολισμό και ένα μόνο μαστίγιο που βοηθά στη κίνηση. Είναι ένα μη ζυμωτικό βακτήριο που σε αερόβιες καταστάσεις, χρησιμοποιεί τη γλυκολιτική οδό για την διάσπαση της γλυκόζης με τελικό δέκτη ηλεκτρονίων το οξυγόνο. Ωστόσο, και σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου χρησιμοποιεί το άζωτο ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων. Αυτό το είδος επιβιώνει σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών, αλλά μάλλον σε ένα περιορισμένο εύρος θερμοκρασιών (Subedi et al., 2021).

Η *P. aeruginosa* είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο που προκαλεί ευρύ φάσμα λοιμώξεων όπως πνευμονία, μηνιγγίτιδα, ενδοκαρδίτιδα και λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος. Το βακτήριο εμφανίζει φυσική αντοχή σε πολλές κατηγορίες αντιβιοτικών και η ικανότητα του να αναπτύσσει γρήγορα νέα βακτήρια κατά τη διάρκεια θεραπείας είναι και ο λόγος για τις θεραπευτικές αποτυχίες. Η

ανθεκτικότητά του οφείλεται συνήθως σε ένα πλασμίδιο μεταφοράς ανθεκτικότητας, το οποίο φέρει γονίδια που κωδικοποιούν την αδρανοποίηση της τοξικότητας διαφόρων αντιβιοτικών.

Είναι ένα από τα έξι παθογόνα "ESKAPE" που ανήκουν στον κατάλογο "παθογόνων προτεραιότητας" του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για αντοχή στα αντιβιοτικά. Για αυτό είναι απαραίτητη η αύξηση της παρακολούθησης των λοιμώξεων που σχετίζονται με το συγκεκριμένο παθογόνο (de Sousa et al., 2021).

### **1.8.3.Salmonella Typhimurium**

Είναι αρνητικό κατά Gram βακτήριο, προαιρετικά αναερόβιο, έχει ραβδόμορφο σχήμα και διαθέτει μαστίγια για την κίνησή του. Ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Ο κύριος βιότοπός του είναι η εντερική οδός των ανθρώπων και ζώων. Ορισμένα είδη υπάρχουν στα ζώα χωρίς να προκαλούν συμπτώματα ασθένειας, ενώ άλλα μπορούν να οδηγήσουν σε ένα ευρύ φάσμα ήπιων έως σοβαρών λοιμώξεων που είναι γνωστές ως σαλμονέλωση.

Η σαλμονέλωση περιλαμβάνει διάφορα σύνδρομα όπως γαστρεντερίτιδα, εντερικούς πυρετούς, σηψαιμία και εστιακές λοιμώξεις. Οι περισσότερες ανθρώπινες λοιμώξεις από *Salmonella* προκύπτουν από την κατάποση μολυσμένων τροφίμων ή νερού. Αυτά τα παθογόνα βακτήρια είναι μολυσματικοί παράγοντες καθώς έχουν την ικανότητα εισβολής σε κύτταρα, διαθέτουν ένα πλήρες στρώμα πολυσακχαριτών, έχουν την ικανότητα να αναπαράγονται ενδοκυτταρικά και πιθανώς μπορούν να επεξεργαστούν διάφορες τοξίνες (Galán, 2021).

Ο μηχανισμός με τον οποίο τα βακτήρια εισβάλλουν στο επιθήλιο είναι μερικώς κατανοητός. Αυτό που είναι γνωστό είναι η αρχική σύνδεση με συγκεκριμένους υποδοχείς στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων και έπειτα εισβολή στο εντερικό επιθήλιο και πολλαπλασιασμό μέσα στο επιθήλιο και στα λεμφοειδή θυλάκια (Giannella, 1996).

### **1.8.4.Acinetobacter baumannii**

Το είδος *Acinetobacter* περιλαμβάνει αρνητικά κατά Gram βακτήρια, αερόβια που δεν διαθέτουν μαστίγια. Οι αποικίες του αναπτύσσουν ταχέως αντοχή στα αντιβιοτικά και διαφεύγουν αποτελεσματικά από τις επιδράσεις των αντιβακτηριακών φαρμάκων για αυτό και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας τα κατατάσσει στους σοβαρότερους μικροοργανισμούς ESKAPE (Lin & Lan, 2014).

Είναι ένα από τα πιο σημαντικά νοσοκομειακά παθογόνα. Το 80% των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων προκαλείται από το *Acinetobacter baumannii*. Είναι υπεύθυνο για λοιμώξεις χειρουργικής θέσης και ουροποιητικού συστήματος, γαστρεντερίτιδα, μηνιγγίτιδα και πνευμονία.

Γονιδιωματικές και φαινοτυπικές αναλύσεις του *A. baumannii* έχουν εντοπίσει αρκετούς λοιμογόνους παράγοντες που ευθύνονται για την παθογένεια. Πρωτεΐνες

εξωτερικής μεμβράνης που ονομάζονται πορίνες και σχετίζονται με τη διαμόρφωση της κυτταρικής μεμβράνης, καψιδιακοί πολυσακχαρίτες και λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και φωσφολιπάσες είναι μόνο μερικοί από αυτούς. Η ανάλυση και μελέτη των λοιμογόνων παραγόντων που ευθύνονται για την παθογένεια του *A. baumannii* είναι ζωτικής σημασίας καθώς θα αποτελέσει τον ακρογωνιαίο λίθο για την ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών και θα αποκαλύψει νέες πληροφορίες για την τοξικότητα και την παθογένεια του *A. baumannii* που μέχρι πριν μερικά χρόνια παρέμεναν ασαφείς (Lee et al., 2017).

## **1.9.Σκοπός της παρούσας μελέτης**

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν αρχικά η κατασκευή μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης φοσμιδίου από DNA προερχόμενο από βακτηριακά στελέχη τα οποία έχουν απομονωθεί από διάφορα είδη μελιών διαφορετικής βοτανικής προέλευσης.

Δεύτερος στόχος της διπλωματικής, πέραν της δημιουργίας της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης, ήταν ο έλεγχος αυτής με στόχο τη διαλογή κλώνων οι οποίοι εμφάνιζαν αντιμικροβιακή δράση έναντι συγκεκριμένων παθογόνων. Τα υπό μελέτη παθογόνα ήταν τα εξής: *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*), *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) και *Salmonella Typhimurium* (*S. Typhimurium*).



## Πειραματικό Μέρος

### 2.Υλικά και μέθοδοι

#### 2.1.Υλικά, όργανα και υποστρώματα

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Τρυβλία Petri (90mm)
- Τετράγωνα τριβλία Petri
- Αυτόματες πιπέτες
- Replicator
- Eppendorfs
- Tips
- Πλαστικές κυψελίδες
- Γυάλινα φιαλίδια (vials)
- CopyControl Fosmid Library Production Kit with pCC1FOS Vector
- ExtractMe Genomic DNA Kit (Blirt, Gdańsk, Poland)
- Plasmid DNA Purification Kit

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Vortex
- Φασματοφωτόμετρο
- Αναδευόμενος επωαστήρας
- Φυγόκεντρος
- Nanodrop

Τα υποστρώματα που παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών ήταν τα εξής:

- Θρεπτικό υλικό Mueller Hinton Broth: Της εταιρίας Lab M. που περιέχει: Beef infusion solids 2,0 g/lit, Acid hydrolysed casein 17,5 g/lit και Starch 1,5 g/lit. Το τελικό pH είναι 7,4 +/- 0,2 στους 25°C
- Θρεπτικό υλικό Mueller-Hinton agar: Της εταιρίας Conda Pronadisa που περιέχει: Acid casein peptone (H) 17,5 g/lit, Beef extract 2,0 g/lit, Starch 1,5 g/lit και Bacteriological agar 17,0 g/lit

- Θρεπτικό υλικό Luria-Bertani Broth (LB Broth): Της εταιρίας Lab M. που περιέχει: Tryptone 10,0 g/lit, Yeast extract 5,0 g/lit και Sodium chloride 10,0 g/lit
- Θρεπτικό υλικό Luria-Bertani Agar (LB Agar): Περιέχει: Agar 15 g/L, NaCl, 10 g/L, Tryptone, 10 g/L, Yeast Extract, 5 g/L και pH 6,8-7,2
- Soft Agar: Το θρεπτικό μέσο είναι μίγμα Nutrient Broth και Nutrient Agar. Η σύσταση του μέσου σε Nutrient Agar ήταν 0,75%. Για την παρασκευή 100 ml αυτού του διαλύματος, ζυγίστηκαν 1,3 gr Nutrient Broth και 0,75 gr Nutrient Agar. Το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκε και παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για να φτάσει τη θερμοκρασία των 42 °C
- Phage Dilution Buffer: Περιέχει 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100mM NaCl και 10mM MgCl<sub>2</sub>
- TE Buffer: Περιέχει 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) και 1 mM EDTA
- Sodium Acetate: Συγκέντρωση 3 mM και pH 7.0
- Chloramphenicol: Η συγκέντρωση του stock της είναι 25mg/ml. Τοποθετούνται 0,25gr σκόνης σε 10ml καθαρή αιθανόλη και αποστειρώνονται πάντα με φιλτράρισμα (φίλτρο 22μ)
- L-arabinose: Συγκέντρωση 0,01% από stock 10% φιλτραρισμένο από φίλτρο 0,22μ
- Μαλτόζη: Συγκέντρωση 0,2%
- Γλυκερόλη: Προσθήκη γλυκερόλης σε τελική συγκέντρωση 20% για αποθήκευση με τη μορφή glycerol stock στους -80oC.

## **2.2.Απομόνωση βακτηριών από το μέλι**

Για την δημιουργία της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης χρησιμοποιήθηκαν 7 βακτηριακά στελέχη (4 Gram θετικά και 3 Gram αρνητικά), τα οποία έχουν απομονωθεί από μέλι και έχουν ταυτοποιηθεί μοριακά. Επιπλέον για τα συγκεκριμένα στελέχη σε προηγούμενες μελέτες είχε προσδιοριστεί η αντιβακτηριακή τους δράση έναντι 5 παθογόνων, *Staphylococcus aureus* (1), *Pseudomonas aeruginosa* (2),

*Salmonella* Typhimurium(3), *Acinetobacter baumannii* (4) και *Citrobacter freundii* (5). Τα στοιχεία αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

**Πίνακας 1:** Επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη και τα χαρακτηριστικά τους

Gram	Στέλεχος	Βακτήρια	Αριθμός κατάθεσης στην Gene bank	Αντιβακτηριακή δράση	NRPS	PKS
+	CTA1	<i>Bacillus pumilus</i>	MW700012	5 /5 παθογόνα	+*	-
	CTB7	<i>Bacillus safensis</i>	MW700041	5 /5 παθογόνα	-	+
	CTB11	<i>Bacillus sp (halotolerans /mojavensis/nakamura / subtilis)</i>	MW700042	5 /5 παθογόνα	-	+*
	CTB32	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	MW700047	4/5 παθογόνα (1,2,3,5)	-	-
-	CTA107	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	MW700034	2/5 παθογόνα (2,5)	-	-
	CT110	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	MW700055	2/5 παθογόνα (2,4)	-	-
	CTA23	<i>Pseudomonas fulva</i>	MW700022	3/5 παθογόνα (2,4,5)	+*	-

**NRPS:** Παρουσία γονιδίων που κωδικοποιούν μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθετάσες.

**PKS:** Παρουσία γονιδίων που κωδικοποιούν πολυκετιδικές συνθάσες

### **2.3.Εκχύλιση DNA από βακτηριακά στελέχη**

Τα βακτηριακά στελέχη βρίσκονταν αποθηκευμένα σε glycerol stock στους -80 °C. Για κάθε απομονωμένο βακτηριακό στέλεχος πραγματοποιήθηκε επίστρωση σε τριβλία με θρεπτικό υλικό Mueller Hinton agar με τη μέθοδο των αραιώσεων με μικροβιολογικό κρίκο. Τα τρυβλία επώστηκαν υπό αερόβιες συνθήκες στους 30 °C για 24 ώρες. Στην συνέχεια επιλέχθηκε μια μονή αποικία από κάθε στέλεχος, η οποία τοποθετήθηκε σε φιαλίδιο με 5ml Mueller Hinton broth με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας. Τα φιαλίδια επώστηκαν στους 30 °C υπό αερόβιες συνθήκες overnight (16ώρες). Έτσι αποκτήθηκαν καθαρές υγρές καλλιέργειες από κάθε στέλεχος, από τις οποίες απομονώθηκε στη συνέχεια γονιδιωματικό DNA με την βοήθεια του ExtractMe Genomic DNA Kit (Blirt, Gdańsk, Poland), όπως προτείνει ο κατασκευαστής.

## **2.4.Έλεγχος συγκέντρωσης και καθαρότητας του DNA**

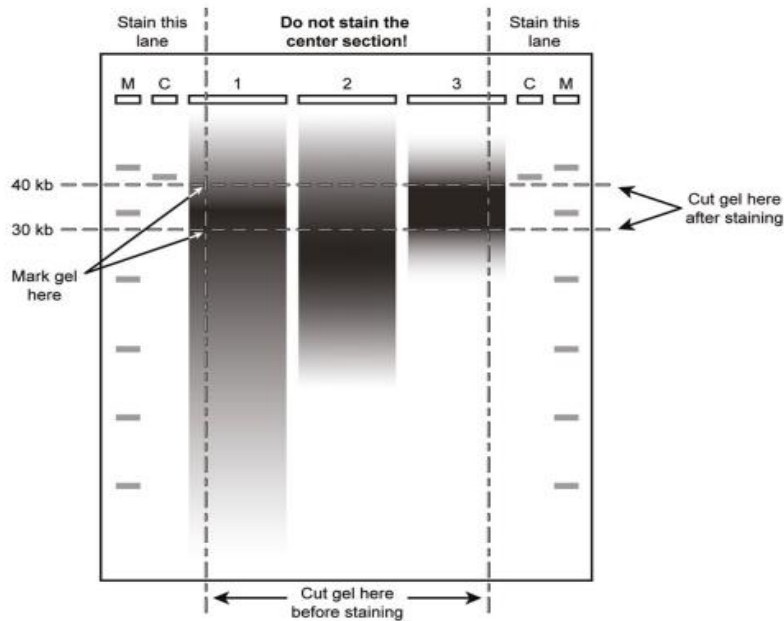
Για να ελεγχθεί η ποιότητα του DNA που απομονώθηκε από τα 7 επιλεγμένα στελέχη, 10 μl DNA από το καθένα φορτώθηκαν σε πηκτική αгарόζης συγκέντρωσης 1% και όγκου 70 ml, μαζί με 2 μl control DNA του kit δημιουργίας της βιβλιοθήκης, fosmid control DNA συγκέντρωσης 100ng/μl και με δείκτη μοριακού μεγέθους 1kb (ladder, Invitrogen). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 40 Volt, για περίπου 12 ώρες.

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του εκάστοτε DNA μετρήθηκε στο Nanodrop, που επιτρέπει τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ενός δείγματος σε πολύ μικρό όγκο (1μl).

Ακολούθησε ανάμειξη των εκχυλισμένων DNA από κάθε βακτηριακό στέλεχος, με στόχο την δημιουργία του ολικού DNA που χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία της φοσμιδιακής βιβλιοθήκης. Τα 7 εκχυλισμένα DNA αναμείχθηκαν βάση της συγκέντρωσής τους, ως εξής:

- 27μl από τα A1, B7, B11, B32 και B110
- 23μl από το A23
- 15μl από το A107

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση του ολικού DNA και επαναδιάλυσή του σε ρυθμιστικό διάλυμα TE buffer. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση 2 μl DNA mix μαζί με 2μl από το control του kit και 10μl ladder 1kb σε gel αгарόζης 1% για να ελεγχθεί η ποιότητά του. Όπως προτείνει ο κατασκευαστής του kit το DNA πρέπει να είναι γύρω στις 40 kb για την δημιουργία της βιβλιοθήκης και να ταξιδεύει στο gel αгарόζης όσο πιο κοντά γίνεται με το control DNA. Όταν είναι σε αυτό το μέγεθος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για την κατασκευή της βιβλιοθήκης(εικόνα 1). Τέλος, υπολογίστηκε η συγκέντρωση και η καθαρότητα του DNA mix στο nanodrop



**Εικόνα 1:** Gel αγαρόζης που απεικονίζει τμήματα DNA των 40 και 30kb

## **2.5.Δημιουργία βιβλιοθήκης: CopyControl Fosmid Library Production Kit.**

### **2.5.1.Κατασκευή άκρων του DNA mix**

Αρχικά τροποποιήθηκαν τα άκρα του DNA mix ώστε να μπορεί να συνδεθεί με το φοσμίδιο. Με ανάμιξη των παρακάτω αντιδραστηρίων:

- 2μl ddH<sub>2</sub>O
- 8μl 10(x) Buffer
- 8μl dNTPs
- 8μl ATP
- 50μl DNA mix
- 4μl ένζυμο

Και επώαση για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου(RT) για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση σχηματισμού άκρων. Συγκεκριμένα, τα άκρα που θα σχηματιστούν θα είναι 5' φωσφορυλιωμένα για να συνδεθούν με τα μη φωσφορυλιωμένα άκρα του φοσμιδίου.

### **2.5.2.Κατακρύμνιση DNA**

Πραγματοποιήθηκε εκ νέου κατακρύμνιση-συμπύκνωση του mix DNA όπως προτείνεται από το kit με τελικά επαναδιαλυτοποίηση σε 50μl TE buffer

### 2.5.3. Αντίδραση λιγάσης

Η αντίδραση λιγάσης πραγματοποιείται για την ένωση των ενθεμάτων DNA που σχηματίστηκαν στα προηγούμενα στάδια με το φοσμίδιο (CopyControl pCC1FOS ή pCC2FOS Vector).

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 1μl insert.

**Πίνακας 2:** Συστατικά για την αντίδραση λιγάσης

<b>Για 1 reaction</b>
5μl ddH <sub>2</sub> O
1μl 10x fast-link ligation buffer
1μl 10mM ATP
1μl CopyControl pCC1POS Vector(0,5μg/μl)
1μl insert DNA
1μl fast-link DNA ligase ένζυμο
<b>V<sub>τελ</sub> =10μl</b>

Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες. Μετά τοποθετήθηκε στους 70°C για 10 λεπτά για να απενεργοποιηθεί το ένζυμο της λιγάσης και να σταματήσει η αντίδραση. Τέλος τα tubes φυλάχθηκαν στους -20°C στη κατάψυξη για περαιτέρω χρήση.

### 2.5.4. Αντίδραση πακεταρίσματος

Στο στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκαν τα εξής:

- α) πακετάρισμα του φοσμιδίου σε βακτηριοφάγους και
- β) κατάλληλη προετοιμασία των κυττάρων *E.coli* που θα δεχτούν τον φάγο.

Τα κύτταρα EPI300-T1<sup>R</sup> *E.coli* παρέχονται από το kit σε glycerol stock. Πραγματοποιήθηκε επίστρωσή τους σε τρυβλίο με LB άγαρ χωρίς αντιβιοτικό. Επώαστηκαν σε θερμοκρασία 37°C overnight ώστε να αναπτυχθούν οι αποικίες και μετά το τρυβλίο αποθηκεύτηκε στους 4 °C. Μια μέρα πριν την αντίδραση του πακεταρίσματος, μια μονή αποικία από το τρυβλίο αυτό τοποθετήθηκε σε φλάσκα με 50ml LB broth, 10mM MgSO<sub>4</sub> και 0,2% μαλτόζη. Η φλάσκα επώαστηκε στους 37°C υπό ανάδευση στις 210 rpm. Μια δεύτερη φλάσκα με το ίδιο θρεπτικό χρησιμοποιήθηκε την ημέρα της αντίδρασης του πακεταρίσματος. Πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με 500μl καλλιέργειας από την πρώτη φλάσκα και επώαστηκε υπό ανάδευση στους 37 °C μέχρι η συγκέντρωση του σε OD<sub>600</sub> να είναι 08,-1.

Πραγματοποιήθηκε ήπια ανάμιξη της μισής ποσότητας (25μl) από το packing extract με όλο τον όγκο από την αντίδραση ένωσης των άκρων φοσμιδίου και DNA mix (10μl) και επώαση στους 30 °C για 2 ώρες. Στη συνέχεια προστέθηκε η υπόλοιπη ποσότητα του packing extract (25μl) και ακολούθησε εκ νέου επώαση στους 30 °C για άλλες 2 ώρες. Τέλος προστέθηκε Phage dilution buffer (PDB) σε τελικό όγκο 1ml για την αραιώση των φάγων και 25μl chloroform που δρα σαν συντηρητικό.

### **2.5.5.Τιτλοδότηση**

Από τους πακεταρισμένους φάγους πραγματοποιήθηκαν οι εξής 3 αραιώσεις 1:10, 1:100 και 1:1000 σε PDB, με στόχο να βρεθεί η βέλτιστη αραιώση για να υπάρχει ο κατάλληλος αριθμός κλώνων κατά την επιστροφή της βιβλιοθήκης. 10μl από τους πακεταρισμένους φάγους αναμίχθηκαν με 100μl κυττάρων EPI300-T1<sup>R</sup> *E.coli* καλλιεργημένα σε φιάσκα 50ml LB broth με 10mM MgSO<sub>4</sub> και 0,2% μαλτόζη την ίδια μέρα όπως περιγράφηκε στο προηγούμενο βήμα. Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37 °C με ήπια ανάδευση κάθε 20 λεπτά και στην συνέχεια επιστροφή σε τρυβλία LB agar με 12,5μg/ml chloramphenicol. Το φοσμίδιο φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην chloramphenicol οπότε αναπτύσσονται μόνο τα κύτταρα που το έχουν λάβει. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C overnight. Βέλτιστη ανάπτυξη παρατηρήθηκε στην αραιώση 1:10.

### **2.6.Αποθήκευση βιβλιοθήκης φοσμιδίων**

Οι πακεταρισμένοι φάγοι αραιώθηκαν 1:10 με PDB και έγινε με αυτούς μόλυνση των κυττάρων *E.coli*. Μετά την επώαση προστέθηκε γλυκερόλη 20% και τα tubes που δημιουργήθηκαν τοποθετήθηκαν στους -80°C για μελλοντική χρήση.

### **2.7.Επίστρωση βιβλιοθήκης και Συλλογή κλώνων**

Από τα στοκ γλυκερόλης πραγματοποιούταν επιστροφή 150 μl σε τρυβλία LB με chloramphenicol και επώασή τους στους 37°C για 16 ώρες. Στην συνέχεια οι κλώνοι συλλέγονταν με την βοήθεια αποστειρωμένων οδοντογλυφίδων σε αποστειρωμένες μικροπλάκες πολυστερίνης 96 θέσεων (96-well plates) σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής. Κάθε πηγαδάκι των 96 well plates περιείχε 200μl θρεπτικό LB broth, 12,5 μg/ml chloramphenicol και 10% γλυκερόλη. Σε κάθε πλάκα 2 πηγαδάκια χρησιμοποιήθηκαν ως control δηλαδή περιείχαν μόνο θρεπτικό υπόστρωμα και δεν προστέθηκε σε αυτά κλώνος. Οι πλάκες επωάζονταν στους 37°C overnight για να αναπτυχθούν οι κλώνοι και μετά αποθηκεύονταν στους -80°C. Μετά την συλλογή ενός αρκετά μεγάλου αριθμού κλώνων, η διαδικασία σταμάτησε και ακολούθησε έλεγχος των κλώνων για αντιβακτηριακή δράση.

## **2.8.Έλεγχος κλώνων για αντιβακτηριακή δράση**

Ελέγχθηκε η αντιβακτηριακή δράση της βιβλιοθήκης έναντι 4 παθογόνων: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) που είναι ανθεκτικό στη μεθικιλίνη, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) και *Salmonella Typhimurium* (*S. Typhimurium*). Όλα τα παθογόνα στελέχη απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα, ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν με τυπικές εργαστηριακές μεθόδους στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αττικών. Τα παθογόνα ήταν αποθηκευμένα σε glycerol stock στους -80°C. Για κάθε απομονωμένο παθογόνο πραγματοποιήθηκε επίστρωση σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό Mueller Hinton agar με τη μέθοδο των αραιώσεων με μικροβιολογικό κρίκο. Τα τρυβλία επωάστηκαν υπό αερόβιες συνθήκες στους 37°C για 16 ώρες. Στην συνέχεια επιλέχθηκε μια μονή αποικία από κάθε στέλεχος, η οποία τοποθετήθηκε σε φιαλίδιο με 5ml Mueller Hinton broth με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας. Τα φιαλίδια επωάστηκαν στους 37°C υπό αερόβιες συνθήκες overnight (16ώρες). Έτσι αποκτήθηκαν καθαρές υγρές καλλιέργειες από κάθε παθογόνο.

## **2.9.Πέρασμα κλώνων σε τρύβλια**

Από τα glycerol stock των 96 well plates αρχικά με την βοήθεια του replicator δημιουργήθηκαν νέες υγρές 96 well plates (αντίγραφα των αρχικών) που περιείχαν 200 μl θρεπτικό υλικό LB broth 2,5gr στα 100ml, 12,5μg/ml chloramphenicol και L-arabinose 10%. Συγκεκριμένα η L-arabinose έχει την δυνατότητα να πολλαπλασιάζει τον αριθμό των φοσμιδίων(high copy number fosmid) μέσα σε κάθε βακτήριο με αποτέλεσμα να είναι πιο εύκολος ο εντοπισμός του φαινοτύπου, δηλαδή η αντιβακτηριακή δράση. Η νέα πλάκα επωαζόταν στους 37°C overnight.

Από τη νέα 96 well plate δημιουργήθηκε replicate με τη βοήθεια του replicator σε τετράγωνο τρυβλίο Petri που περιείχε θρεπτικό υλικό LB agar και L-arabinose 10%. Δεν περιείχε αντιβιοτικό γιατί θα παρεμπόδιζε την ανάπτυξη των υπό μελέτη παθογόνων. Τα τρυβλία επωάζονταν στους 37°C overnight. Κάθε 96 well plate έγινε replicate 4 φορές καθώς έπρεπε να ελεγχθεί η αντιβακτηριακή δράση έναντι 4 παθογόνων.



## **2.10.Δοκιμή επίστρωσης διπλής καλλιέργειας με soft agar**

Εφόσον επιλέχθηκε μια μονή αποικία από κάθε παθογόνο, τοποθετήθηκε σε φιαλίδια με 5ml Mueller Hinton broth με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας και τα φιαλίδια επώαστηκαν στους 37 °C υπό αερόβιες συνθήκες overnight (16ώρες) με στόχο την απόκτηση καθαρών υγρών καλλιεργειών. Οι καλλιέργειες αυτές αραιώθηκαν μέχρι την παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος (inoculum) θολερότητας ίσης με 0,5 McFarland (περίπου  $1,5 \times 10^8$  cfu/ml). Η μέτρηση οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm έγινε με φασματοφωτόμετρο μέχρι την επίτευξη τελικής απορρόφησης τιμής 0,132 που αντιστοιχεί σε 0,5 McFarland (περίπου  $1,5 \times 10^8$  cfu/ml).

Εφόσον είχε επιτευχθεί η τελική απορρόφηση τιμής 0,132 για τα 4 παθογόνα προστέθηκαν συγκεκριμένες ποσότητές τους σε φιαλίδια με 5ml Mueller Hinton(MH) ως εξής:

- a) 300μl *Salmonella* Typhimurium
- b) 350μl *Pseudomonas aeruginosa*
- c) 500μl *Staphylococcus aureus*
- d) 500μl *Acinetobacter baumannii*

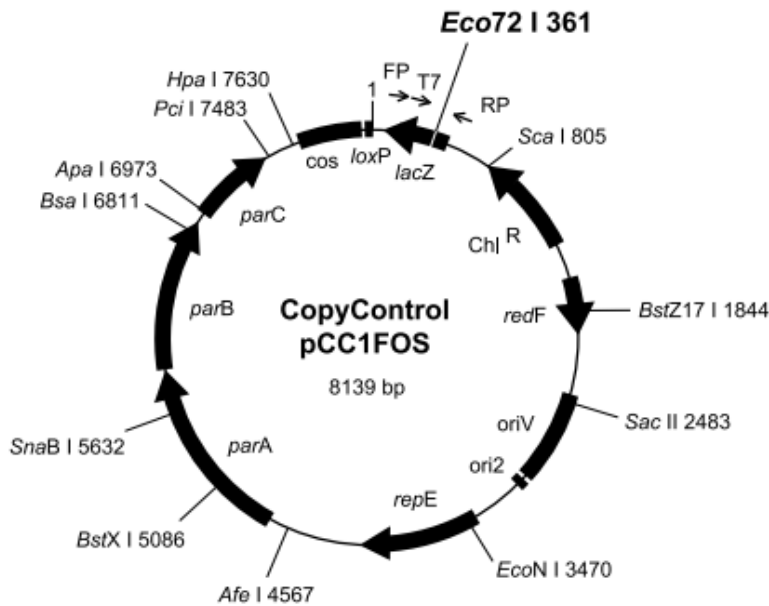
Στη συνέχεια 1ml από τα νέα φιαλίδια που είχαν εμβολιαστεί με τα παθογόνα προστέθηκε σε 100ml soft agar. Το soft agar περιείχε Nutrient broth και Nutrient agar. Αποστειρωνόταν και μόνο όταν ήταν σε θερμοκρασία 42°C γινόταν η προσθήκη του παθογόνου. Στην συνέχεια μια λεπτή στρώση απλωνόταν στα τετράγωνα τρυβλία με τους κλώνους. Μόλις στερεοποιήθηκε το άγαρ, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους 37°C για επώαση overnight.

## **2.11.Διαλογή κλώνων με αντιβακτηριακή δράση**

Η ύπαρξη ζώνης αναστολής της ανάπτυξης των παθογόνων βακτηριακών στελεχών γύρω από ορισμένους κλώνους αποτέλεσε ένδειξη της αντιβακτηριακής δράσης των κλώνων αυτών. Για τους κλώνους που εμφάνιζαν αντιβακτηριακή δράση έγινε επανάληψη της δοκιμής σε triplicates.

Οι κλώνοι που επιλέχθηκαν τελικά, μεταφέρθηκαν από τα 96 well plates σε φιαλίδια των 5ml που περιείχαν LB broth, chloramphenicol και L-arabinose και επώαστηκαν overnight στους 37°C. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση φοσμιδίων με το plasmid extraction kit (Macherey-Nagel) όπως προτείνεται από τον κατασκευαστή.

Στη συνέχεια επιλέχθηκε ένζυμο περιορισμού για πέψη των φοσμιδίων για να γίνει ποιοτικός έλεγχος της βιβλιοθήκης και έλεγχος ποικιλότητας του ενθέματος στα φοσμίδια. Επιλέχθηκε το ένζυμο BamHI το οποίο κόβει 2 φορές πάνω στο φοσμίδιο στις θέσεις 353 και 407 δηλαδή ανοδικά και καθοδικά της θέσης του ενθέματος.



**Εικόνα 2:** Χάρτης που απεικονίζει τα σημεία κοπής περιοριστικών ενζύμων στο φοσμίδιο

Συγκεκριμένα κόβει στις εξής θέσεις νουκλεοτιδίων:

$G\downarrow GATCC$

$CCTAG\uparrow G$

Για την αντίδραση του ενζύμου περιορισμού δημιουργήθηκε το mix:

- |                                   |      |
|-----------------------------------|------|
| • 10x buffer G                    | 2μl  |
| • Restriction enzyme BamHI 10u/μl | 1μl  |
| • ddH <sub>2</sub> O              | 12μl |
| • φοσμίδιο                        | 5μl  |

Τα δείγματα επώαστηκαν για 1 ώρα στους 37°C και μετά προστέθηκαν 5μl Loading Buffer για να σταματήσει η ενζυμική αντίδραση. Επόμενο βήμα ήταν η δημιουργία ενός gel 1% αγαρόζης σε όγκο 40ml για να παρατηρηθούν οι ζωνώσεις που σχηματίζονται εφόσον κόψει το ένζυμο περιορισμού.

Στη συνέχεια έγινε πέψη ενός συγκεκριμένου κλώνου και με το ένζυμο περιορισμού EcoRI. Αυτό κόβει 1 φορά στο φοσμίδιο στη θέση 332 και συγκεκριμένα:

$G\downarrow AATTC$

$CTTAA\uparrow G$

Για την αντίδραση του ενζύμου περιορισμού δημιουργήθηκε ένα μίγμα το οποίο περιείχε:

- 10x buffer EcoRI 2μl
- Restriction enzyme EcoRI 10u/μl 1μl
- ddH<sub>2</sub>O 12μl

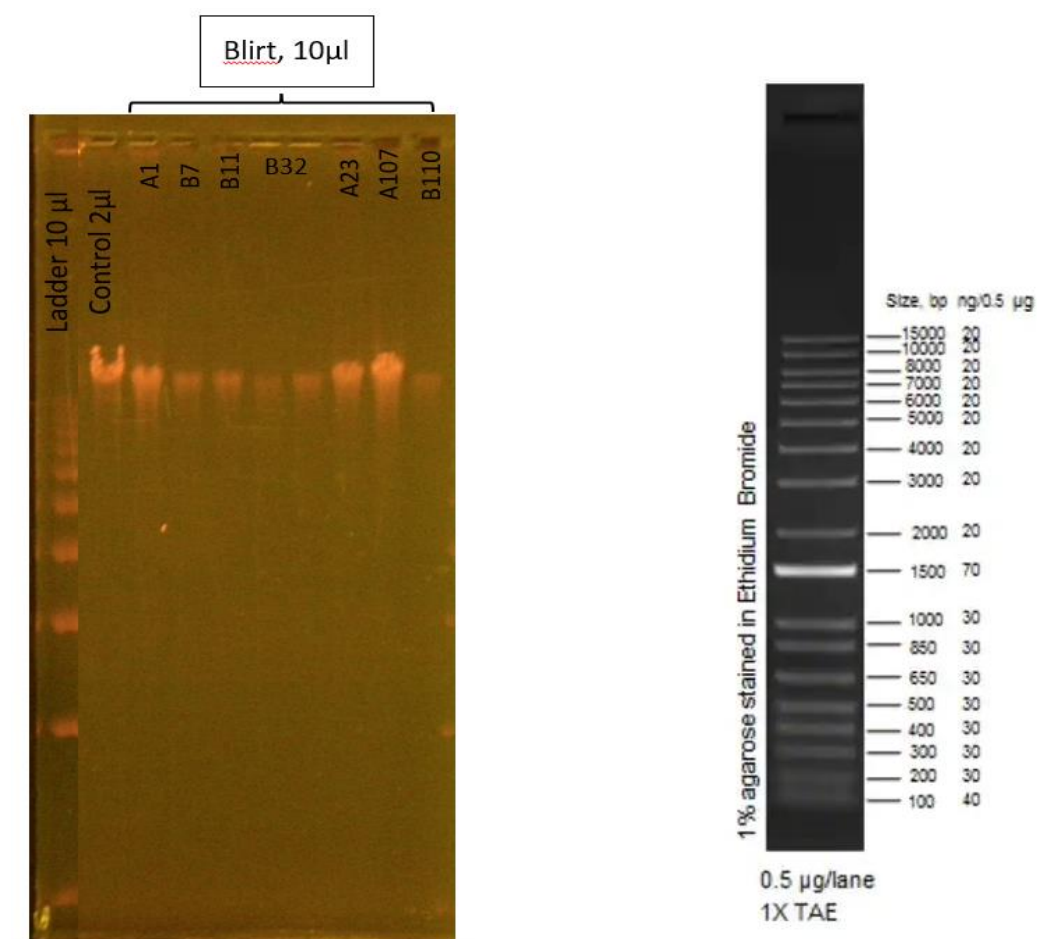
Τα δείγματα επωάστηκαν για 1 ώρα στους 37°C και μετά προστέθηκαν 5μl Loading Buffer για να σταματήσει η ενζυμική αντίδραση. Επόμενο βήμα ήταν η δημιουργία ενός gel 1% αγαρόζης με 100bp DNA Ladder (Invitrogen) σε όγκο 40ml για να παρατηρηθούν οι ζωνώσεις που σχηματίζονται εφόσον κόψει το ένζυμο περιορισμού. Ο κλώνος 9F από την πλάκα 7 στάλθηκε για αλληλούχηση που θα γίνει μέσω της πλατφόρμας Illumina MiSeq προκειμένου να γίνει γνωστό ποια είναι η αλληλουχία του DNA που προσδίδει αντιβακτηριακή δράση έναντι του παθογόνου της *Salmonella Typhimurium*.

### 3.Αποτελέσματα

#### 3.1.Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από 7 επιλεγμένα στελέχη

Το πρώτο βήμα ήταν η απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από βακτήρια ώστε να χρησιμοποιηθεί για την δημιουργία της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης. Για να ελεγχθεί η ποιότητα του DNA που απομονώθηκε από τα 7 επιλεγμένα στελέχη, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση του στα 40 Volt, για περίπου 12 ώρες. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης παρουσιάζονται στην εικόνα 3.

#### 3.2.Αποτελέσματα-έλεγχος συγκέντρωσης και ποιότητας



**Εικόνα 3:** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης DNA των 7 βακτηριακών στελεχών και ladder 1000 bp της Invitrogen

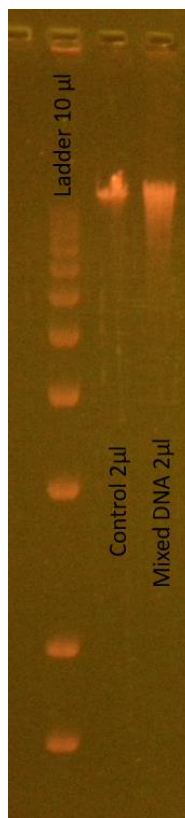
Στη συνέχεια η συγκέντρωση και η καθαρότητα του εκάστοτε DNA μετρήθηκε στο Nanodrop. Το Nanodrop έδειξε τα εξής:

**Πίνακας 3:** Μετρήσεις συγκέντρωσης DNA (Nanodrop)

Δείγμα DNA	Συγκέντρωση ng/μl	Καθαρότητα 260/280
A1	164,7	1,68
A23	242,7	1,73
A107	379,1	1,79
B7	133,3	1,62
B11	86,2	1,56
B32	109,3	1,66
B110	88,2	1,69

### **3.3.Ανάμειξη των εκχυλισμένων DNA από κάθε βακτηριακό στέλεχος και έλεγχος συγκέντρωσης και ποιότητας του mix DNA**

Ακολούθως έγινε ανάμειξη των εκχυλισμένων DNA από κάθε βακτηριακό στέλεχος, με στόχο την δημιουργία του ολικού DNA. Με τον ίδιο τρόπο το DNA mix φορτώθηκε σε πηκτή αγαρόζης πάλι συγκέντρωσης 1% και όγκου 70 ml. Φορτώθηκαν επίσης 2μl control DNA του προτεινόμενου kit και ladder 10μl(ίδιος με προηγούμενως). Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 4.



**Εικόνα 4:** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης του DNA mix

Αυτό που παρατηρήθηκε και είναι πολύ σημαντικό είναι ότι το μεγαλύτερο μέρος του DNA mix κινείται όμοια με το control DNA και είναι 40kb άρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για την κατασκευή της βιβλιοθήκης. Μετρήθηκε με τη βοήθεια του nanodrop η συγκέντρωση και η καθαρότητα του DNA mix.

**Πίνακας 4:** Αποτελέσματα Nanodrop για DNA mix

	ng/μl	260/280
DNA mix	397,5	1,67

### **3.4.Συλλογή κλώνων και έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης**

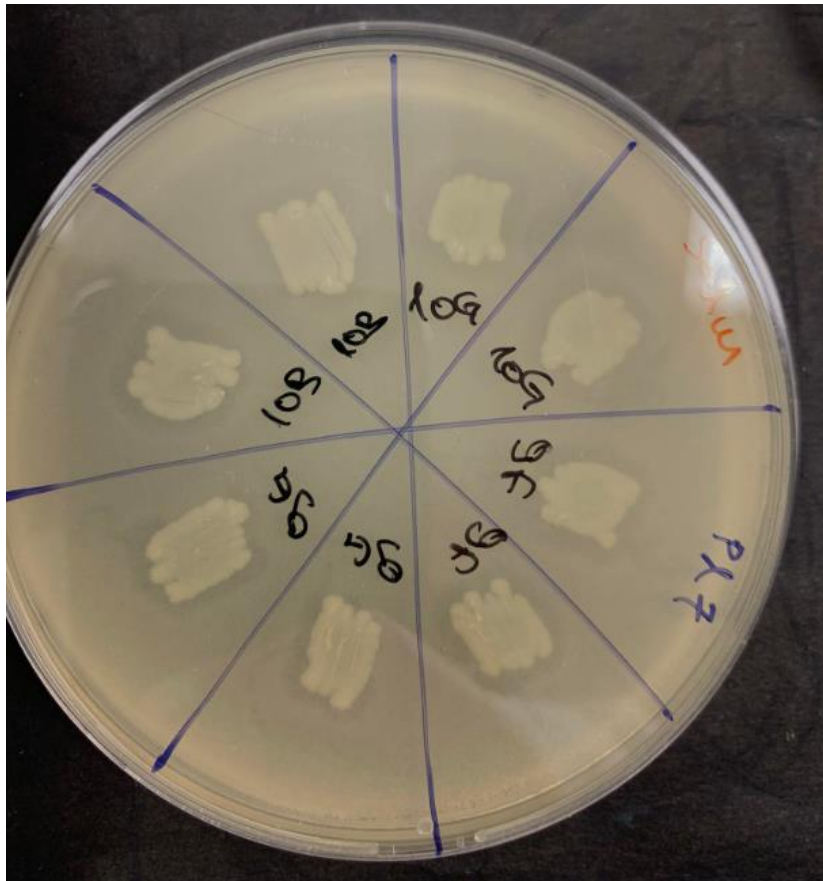
Εφόσον τα αποτελέσματα του gel και του nanodrop ήταν καλά ξεκίνησε η συλλογή κλώνων για την δημιουργία της βιβλιοθήκης. Συνολικά συλλέχθηκαν 76 πλάκες μικροτιτλοδότησης δηλαδή 7144 κλώνοι. Οι κλώνοι των πρώτων 10 πλακών ελέγχθηκαν για την αντιβακτηριακή τους δράση έναντι των τεσσάρων παθογόνων, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* και *Acinetobacter baumannii*.

### **3.5.Αποτελέσματα ελέγχου κλώνων για αντιβακτηριακή δράση έναντι 4 παθογόνων**

Από τους κλώνους που ελέγχθηκαν, 17 κλώνοι παρουσίασαν επαναλήψιμα αποτελέσματα μετά από έλεγχο 4 φορές έναντι των παθογόνων. Από τις πλάκες 1,2 παρατηρήθηκαν 4 κλώνοι (4C, 7C, 9E, 5C) που εμφάνιζαν ζώνες αναστολής έναντι του *Staphylococcus aureus*. Έναντι της *Pseudomonas aeruginosa* σημειώθηκαν επίσης 4 κλώνοι που εμφάνιζαν αντιβακτηριακή δράση από τις πλάκες 5(11D), 6(5B) και 10(7D,7G). Ζώνες αναστολής εμφάνισαν 3 κλώνοι έναντι του *Acinetobacter baumannii* (4E,7G,8C) από τις πλάκες 4 και 5 αντίστοιχα. Οι σημαντικότερες ζώνες αναστολής παρατηρήθηκαν έναντι της *Salmonella Typhimurium*. Σημειώνεται ότι για τον *S. aureus* και *A. baumannii*, τα αποτελέσματα δεν ήταν απόλυτα ξεκάθαρα (δημιουργία κίτρινης ζώνης γύρω από τους κλώνους). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 5:

**Πίνακας 5:** Αποτελέσματα ελέγχου κλώνων για αντιβακτηριακή δράση έναντι 4 παθογόνων

<i>S. aureus</i> (όχι πολύ ξεκάθαρο)	
Plate 1	Φορές που σημειώθηκε ως + (όλα δοκιμάστηκαν 4 φορές)
4C	4x
7C	4x
9E	4x
Plate 2	
5C	3x
<i>P. aeruginosa</i>	
Plate 5	
11D	2x
Plate 6	
5B	3x
Plate 10	
7D	2x
7G	3x
<i>Acinetobacter</i> (όχι ξεκάθαρο)	
Plate 4	
4E	3x
Plate 5	
7G	2x
8C	4x
<i>Salmonella</i>	
Plate 2	
10D	4x
Plate 7	
9E	3x
8D	3x
8F	2x
9F	2x
Plate 9	
8E	3x



**Εικόνα 5:** Στρώση με soft agar που περιέχει το παθογόνο *Salmonella* Typhimurium και παρατήρηση ζώνων αναστολής ειδικά στον κλώνο 9F

### **3.6.Εκτεταμένη ανάλυση 7 κλώνων που παρατηρήθηκαν έντονες ζώνες αναστολής**

Από όλους τους κλώνους που ελέγχθηκαν και εμφάνισαν θετικά αποτελέσματα (17 συνολικά), 7 επιλέχθηκαν για να συνεχιστεί η ανάλυση καθώς παρουσίαζαν τις σημαντικότερες ζώνες αναστολής έναντι συγκεκριμένων παθογόνων.

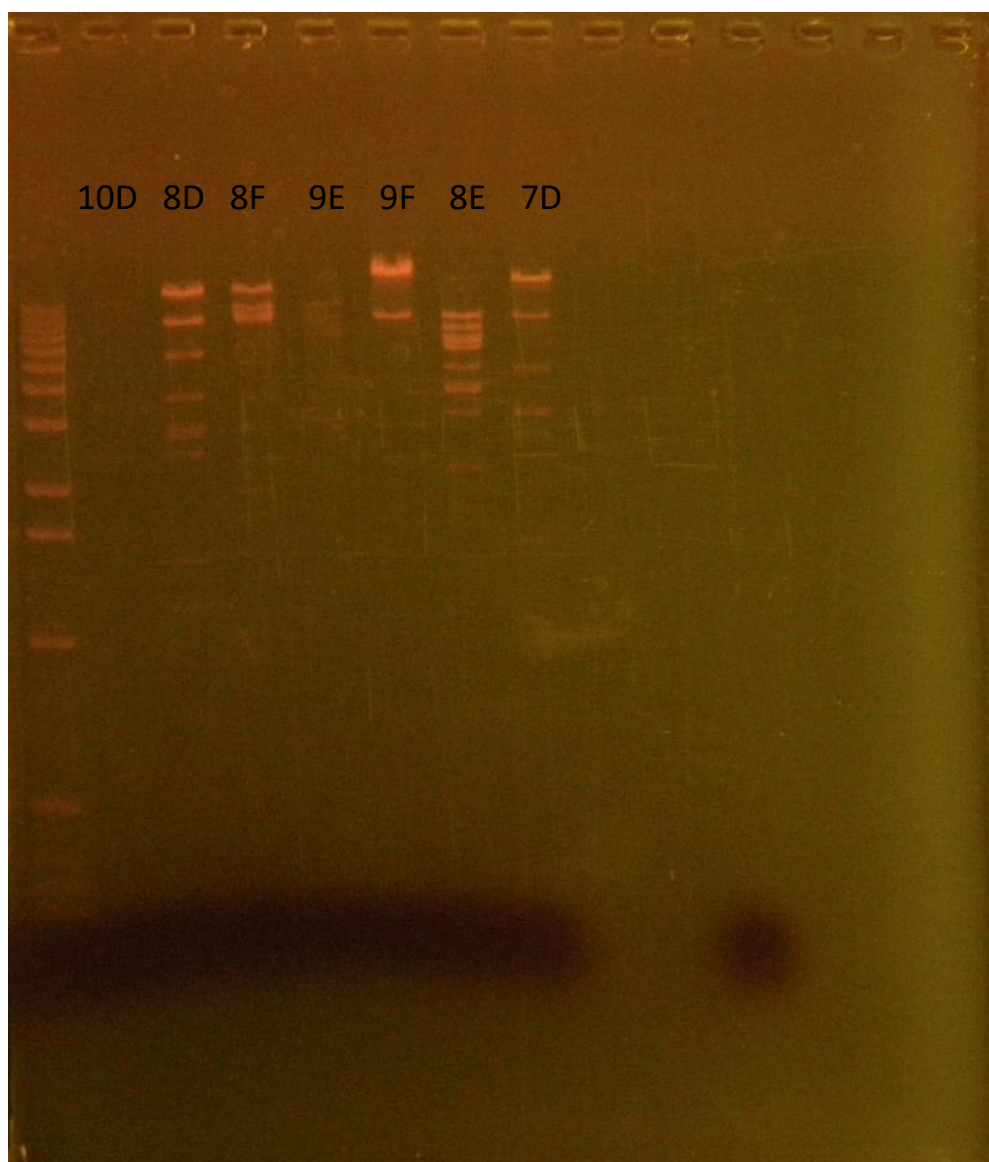
**Πίνακας 6:** Κλώνοι που παρατηρήθηκαν έντονες ζώνες αναστολής

Πλάκα	Αριθμός στη πλάκα	Παθογόνο έναντι του οποίου εμφανιζόταν αντιβακτηριακή δράση
Πλάκα 2	10D	<i>Salmonella</i> Typhimurium
Πλάκα 7	8D	<i>Salmonella</i> Typhimurium
Πλάκα 7	8F	<i>Salmonella</i> Typhimurium
Πλάκα 7	9E	<i>Salmonella</i> Typhimurium
Πλάκα 7	9F	<i>Salmonella</i> Typhimurium
Πλάκα 9	8E	<i>Salmonella</i> Typhimurium
Πλάκα 10	7D	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>



### 3.7.Εκχύλιση φοσμιδίων και πέψη με περιοριστικό ένζυμο BamHI

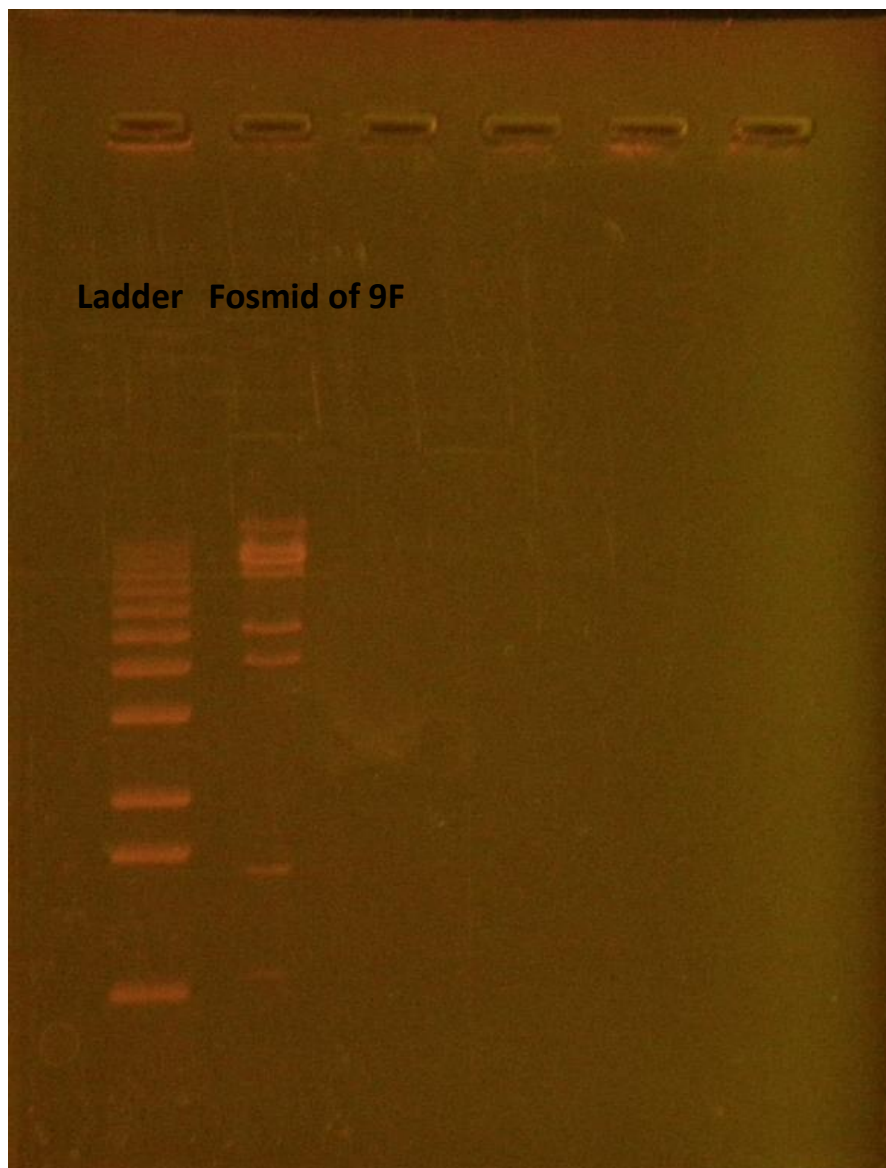
Για αυτούς τους 7 κλώνους πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του φοσμιδίου και πέψη όλων των φοσμιδίων με το περιοριστικό ένζυμο BamHI. Τέρμα αριστερά φορτώνεται το ladder(δείκτης μοριακού μεγέθους 100bp της Invitrogen) στο οποίο προστίθενται 5 μl προϊόν ενώ στα άλλα από 20μl δηλαδή όλο το προϊόν της πέψης. Παρατηρήθηκε ότι όλα εμφάνιζαν ζώνες ηλεκτροφόρησης μεγέθους 8.000bp που είναι και το μέγεθος του φοσμιδίου και ακόμα όλα είχαν διαφορετικό πρότυπο ζωνώσεων. Τα δείγματα 1 και 4 ήταν αχνά ενώ το δείγμα 5 εμφάνιζε και μία ζώνη άνω των 12.000bp άρα μάλλον το ένζυμο δεν κόβει στο ένθεμα. Τα αποτελέσματα της πέψης με BamHI παρουσιάζονται στην εικόνα 6.



**Εικόνα 6:** Αποτελέσματα πέψης με το περιοριστικό ένζυμο BamHI

### 3.8. Πέψη του φοσμίδιου του κλώνου 9F από την πλάκα 7 και με BamHI και με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI

Τέλος, το φοσμίδιο που προήλθε από τον κλώνο που βρίσκεται στη **πλάκα 7** και στη θέση **9F** κόπηκε πέρα από την BamHI και με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI. Αριστερά φορτώνεται πάλι ο μάρτυρας(ladder) και δεξιά το φοσμίδιο και τα αποτελέσματα εμφανίζονται στην εικόνα 7:



**Εικόνα 7:** Αποτελέσματα πέψης με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI

Αυτή η διαδικασία έγινε προκειμένου να διαπιστωθεί εάν το ένζυμο κόβει εντός ενθέματος. Το gel 1% αγαρόζης που έγινε απέδειξε ότι κόβει εντός ενθέματος καθώς παρατηρήθηκαν πολλές ζώνες.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα επιλέχθηκε ο συγκεκριμένος κλώνος (**πλάκα7, 9F**) για να σταλεί για αλληλούχηση προκειμένου να γίνει γνωστό ποια είναι η αλληλουχία του DNA που προσδίδει αντιβακτηριακή δράση έναντι του παθογόνου της *Salmonella Typhimurium* και τα αποτελέσματα της αλληλούχησης αναμένονται.

#### **4. Συζήτηση-σχολιασμός**

Το μέλι είναι μοναδικό σε σχέση με άλλα φυσικά προϊόντα, λόγω των φυσικοχημικών του ιδιοτήτων και των οφελών που έχει υγεία του ανθρώπινου οργανισμού. Η αντιβακτηριακή δράση είναι μια από τις κύριες δραστηριότητες του μελιού που έχει μελετηθεί εκτενώς. Το επίπεδο της αντιμικροβιακής δράσης ποικίλλει από μέλι σε μέλι και σχετίζεται στενά με τη βοτανική προέλευση και γεωγραφική τοποθεσία καθώς και τις τεχνικές επεξεργασίας. Μια αλληλεπίδραση διαφορετικών παραμέτρων, όπως χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό, υψηλή σε σάκχαρα, υπεροξειδίου του υδρογόνου και ενώσεις μη-υπεροξειδίου επηρεάζουν την παρατηρούμενη αντιμικροβιακή δράση του μελιού. Με το αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις πιθανές φαρμακευτικές επιδράσεις του, που συνδέεται ιδιαίτερα με τις αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές βιοδραστηριότητές του, το μέλι έχει αρχίσει να ενσωματώνεται σε διάφορες φαρμακευτικές συνθέσεις και να μελετώνται εκτενέστερα οι ενώσεις που περιέχει (Hossain et al., 2022a).

Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, η μεθυλγλυοξάλη και το Bee-defensin-1 είναι ενώσεις που έχουν μελετηθεί καλά και προσδίδουν στο μέλι ισχυρή καταστολή έναντι παθογόνων. Ωστόσο, αυτό που χρίζει περαιτέρω μελέτης είναι το μικροβίωμα του. Υπάρχουν βακτήρια, μύκητες και ζύμες που υπάρχουν στο μέλι και έχουν συστηθεί ως πιθανή πηγή αντιμικροβιακών ενώσεων. Έχουν απομονωθεί βακτήρια που παράγουν αντιμικροβιακές ενώσεις *in vitro*, αλλά δεν υπάρχουν άμεσες ενδείξεις για την ύπαρξη τέτοιων ουσιών στο μέλι. Σημαντικές μελέτες έχουν γίνει και πάνω στο μικροβίωμα ελληνικών μελιών με την απομόνωση στελεχών από στοχευμένες ομάδες μικροοργανισμών όπως λακτοβάκιλλους και βακίλλους που συμβάλλουν στην αντιμικροβιακή δράση των μελιών αυτών.(Tsadila et al., 2021)

Στην παρούσα μελέτη έγινε διαλογή κλώνων από μια βιβλιοθήκη φοσμιδίου και προσδιορισμός της αντιβακτηριακής δράσης τους. Επιλέχθηκαν 7 βακτηριακά στελέχη(4 Gram+ και 3 Gram-) που προηγουμένως είχαν απομονωθεί από μέλια διαφορετικής γεωγραφικής τοποθεσίας και έδειξαν αντιβακτηριακή δράση έναντι παθογόνων βακτηρίων. Έγινε εκχύλιση των DNA τους και ανάμειξη προκειμένου να προκύψει μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη που να περιέχει το DNA και των 7 βακτηρίων. Χρησιμοποιήθηκε το CopyControl Fosmid Library Production Kit with pCC1FOS Vector για την ένωση του DNA mix με φοσμίδια του kit αφού πρώτα είχαν τροποποιηθεί τα άκρα τους και μεταφορά του φοσμιδίου που περιέχει το ένθεμα μέσω βακτηριοφάγων σε βακτήρια *E.coli*.

Η χρήση πολλών θρεπτικών υποστρωμάτων, υλικών και πολύωρης αναμονής για την ανάπτυξη τόσο των αποικιών όσο και των παθογόνων ήταν απαραίτητη. Η συλλογή των κλώνων απαιτούσε χρόνο και υπομονή και σταμάτησε μετά την τοποθέτηση 9144 κλώνων σε 76 πλάκες μικροτιτλοδότησης (96 well plates). Ένα σημαντικό όργανο ήταν το replicator καθώς απαιτούνταν η μεταφορά ενός πιστού αντιγράφου από τις πλάκες σε τετράγωνα τριβλία petri. Μελετήθηκε η αντιβακτηριακή δράση των αποικιών των πρώτων 10 πλακών μόνο έναντι 4 παθογόνων, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* και *Salmonella Typhimurium* από

τους οποίους οι πρώτοι 3 ανήκουν στους μικροοργανισμούς ESKAPE σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας για αυτό και είναι άκρως σημαντική η εύρεση νέων αντιμικροβιακών ενώσεων έναντι αυτών των παθογόνων (Tsadila et al., 2021).

Στα συγκεκριμένα πειράματα, έγινε έλεγχος των αποικιών για αντιβακτηριακή δράση με στρώσιμο soft agar που περιείχε κάθε φορά διαφορετικό παθογόνο. Από όλους τους κλώνους που έγιναν overlay, μόνο 17 παρουσίασαν ζώνες αναστολής έναντι των παθογόνων. Οι συγκεκριμένες δοκιμές έγιναν 3-4 φορές για κάθε παθογόνο καθώς τα αποτελέσματα παρουσίαζαν σε κάποιες περιπτώσεις αποκλείσεις ή όχι και τόσο καθαρά αποτελέσματα. Από τους 17 κλώνους, μόνο 7 επιλέχθηκαν για να συνεχιστεί η ανάλυση καθώς παρουσίαζαν τις σημαντικότερες ζώνες αναστολής έναντι συγκεκριμένων παθογόνων τα οποία ήταν 6 για την *Salmonella* Typhimurium και 1 για την *Pseudomonas aeruginosa* πράγμα που υποδηλώνει ότι το πρώτο ήταν σημαντικά πιο ευαίσθητο σε σχέση με τα άλλα.

Για αυτούς τους 7 κλώνους πραγματοποιήθηκε απομόνωση του φοσμιδίου και πέψη αρχικά με το περιοριστικό ένζυμο BamHI και στη συνέχεια και με το EcoRI ώστε να παρατηρηθούν τα τμήματα DNA στα οποία πιθανώς να οφείλονται οι ζώνες αναστολής που σχηματίζονται έναντι των αντίστοιχων παθογόνων. Ο κλώνος **9F της πλάκας 7** στάλθηκε για αλληλούχιση προκειμένου να αναλυθούν τα πιθανά γονίδια που σχετίζονται με την αντιβακτηριακή δράση έναντι της *Salmonella* Typhimurium.

Στα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία της βιβλιοθήκης και έχουν απομονωθεί από ελληνικά μέλια, έχουν εντοπιστεί μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθετάσες (NRPs) και πολυκετιδικές συνθάσες (PKSs) που συνθέτουν πολλούς δευτερογενείς μεταβολίτες υψηλού φαρμακευτικού ενδιαφέροντος όπως αντιβιοτικά, αντικαρκινικούς παράγοντες και ανοσοκατασταλτικά. Αυτά τα ένζυμα είναι μεγάλα πολυλειτουργικά σύμπλοκα που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση μη ριβοσωμικών πεπτιδίων (NRPs) και πολυκετιδίων (PKs). Μελέτες σχετικά με την απομόνωση βακτηρίων από μέλια έχουν δείξει ότι τα γένη *Bacillus* και *Paenibacillus* παράγουν μη ριβοσωμικά συντιθέμενα λιποπεπτιδία με σημαντική αντιμικροβιακή δράση όπως η ιτουρίνη, η φενγκυκίνη, η σουρφακτίνη και η βακιλλομυκίνη. Αυτές οι ενώσεις συντίθενται σε αφθονία, ιδιαίτερα από τους *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* και *B. Pumilus* ωστόσο NRPS έχουν ταυτοποιηθεί και στο *Pseudomonas* spp (Tsadila et al., 2021).

Συγκεκριμένα, σε μια μελέτη που έγινε για τον χαρακτηρισμό της αντιβακτηριακής δράσης από το γένος *Bacillus* spp., απομονώθηκαν τέσσερα βακτηριακά στελέχη από το μέλι και παρατηρήθηκαν αντιμικροβιακές και ενζυμικές δράσεις τους. Τα στελέχη *Bacillus velezensis* Y12, *Bacillus amyloliquefaciens* Y21, *Bacillus amyloliquefaciens* Y23 και *Bacillus velezensis* Y33 μελετήθηκαν ως προς την αντιβακτηριακή τους δράση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών μεταξύ των οποίων και έναντι της *Salmonella* Typhimurium. Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του χρωμοσωμικού DNA των 4 βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την αντίδραση PCR. Επτά εκκινητές γονιδίων βιοσύνθεσης αντιβακτηριακών πεπτιδίων ενισχύθηκαν από το γονιδιωματικό DNA των απομονωμένων βακτηρίων με ανάλυση PCR. Αυτά τα γονίδια

ήταν fenD, srfAA, bacA, bmyB, ituC, ituD και bmyD που κωδικοποιούνται για την παραγωγή των αντίστοιχων πρωτεϊνών φενγκυκίνη, σουρφακτίνη, βακιλυσίνη, βακιλλομυκίνη L, ιτουρίνη A και βακιλλομυκίνη Δ. Τα αποτελέσματα του gel αγαρόζης επιβεβαίωσαν την ύπαρξη όλων αυτών των γονιδίων στο χρωμοσωμικό DNA των απομονωμένων στελεχών. Η δοκιμασία αντιβακτηριακής δράσης έδειξε ότι όλα τα απομονωμένα στελέχη εμφάνισαν αντιβακτηριακή δράση έναντι της *Salmonella Typhimurium* όπου παρατηρήθηκαν σημαντικές ζώνες αναστολής από 5,3 έως 7,5mm (Stella Anggelia et al., 2020)

Η ανάγκη για περαιτέρω μελέτες και αναλύσεις του μελιού λοιπόν είναι επιτακτική. Το μέλι είναι ένα προϊόν που καταναλώνεται παγκοσμίως σε μεγάλες ποσότητες. Δεν είναι τυχαίο που από την αρχαιότητα ακόμα πολλοί πληθυσμοί πέρα από την κατανάλωση ως τρόφιμο το χρησιμοποιούσαν για την αντιμετώπιση διάφορων παθογόνων λοιμώξεων. Η ανάλυση του μικροβιώματος και η εύρεση των ενώσεων που προσδίδουν στο μέλι αντιβακτηριακές ιδιότητες αποτελεί στόχο αρκετών ερευνητών ανά τον κόσμο.

## **5.Βιβλιογραφία**

Almasaudi, S. (2021). The antibacterial activities of honey. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(4), 2188–2196. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2020.10.017>

Anthimidou, E., & Mossialos, D. (2013). Antibacterial activity of Greek and Cypriot honeys against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in comparison to manuka honey. *Journal of Medicinal Food*, 16(1), 42–47. <https://doi.org/10.1089/JMF.2012.0042>

Arango-Argoty, G., Garner, E., Pruden, A., Heath, L. S., Vikesland, P., & Zhang, L. (2018). DeepARG: a deep learning approach for predicting antibiotic resistance genes from metagenomic data. *Microbiome*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/S40168-018-0401-Z>

Bachanová, K., Klaudiny, J., Kopernický, J., & Šimúth, J. (2002). Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus larvae* larvae through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie*, 33(3), 259–269. <https://doi.org/10.1051/APIDO:2002015>

Bunnik, E. M., & le Roch, K. G. (2013). An Introduction to Functional Genomics and Systems Biology. *Advances in Wound Care*, 2(9), 490–498. <https://doi.org/10.1089/WOUND.2012.0379>

Burke, C., Kjelleberg, S., & Thomas, T. (2009). Selective extraction of bacterial DNA from the surfaces of macroalgae. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), 252–256. <https://doi.org/10.1128/AEM.01630-08>

Cienciosi, D., Forbes-Hernández, T. Y., Afrin, S., Gasparrini, M., Reboredo-Rodriguez, P., Manna, P. P., Zhang, J., Lamas, L. B., Flórez, S. M., Toyos, P. A., Quiles, J. L., Giampieri, F., & Battino, M. (2018). Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 23(9). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23092322>

Cornara, L., Biagi, M., Xiao, J., & Burlando, B. (2017). Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. *Frontiers in Pharmacology*, 8(JUN), 412. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2017.00412>

de Sousa, T., Hébraud, M., Enes Dapkevicius, M. L. N., Maltez, L., Pereira, J. E., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Igrejas, G., & Poeta, P. (2021). Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/IJMS222312892>

Fernández, L. A., Ghilardi, C., Hoffmann, B., Busso, C., & Gallez, L. M. (2017). Microbiological quality of honey from the Pampas Region (Argentina)

- throughout the extraction process. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(1), 55–61. <https://doi.org/10.1016/J.RAM.2016.05.010>
- Fuhrman, J. A. (2012). Metagenomics and its connection to microbial community organization. *F1000 Biology Reports*, 4(1). <https://doi.org/10.3410/B4-15>
- Galán, J. E. (2021). Salmonella Typhimurium and inflammation: a pathogen-centric affair. *Nature Reviews. Microbiology*, 19(11), 716. <https://doi.org/10.1038/S41579-021-00561-4>
- Giannella, R. A. (1996). Salmonella. *Medical Microbiology*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8435/>
- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 669. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004>
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, 5(10). [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90108-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90108-9)
- Hetem, D. J., Ekkelenkamp, M. B., & Rooijackers, S. H. M. (2017). Staphylococci and Micrococci. *Infectious Diseases, 2-Volume Set*, 1509-1522.e2. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00176-3>
- Hossain, M. L., Lim, L. Y., Hammer, K., Hettiarachchi, D., & Locher, C. (2022a). A Review of Commonly Used Methodologies for Assessing the Antibacterial Activity of Honey and Honey Products. *Antibiotics*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11070975>
- Hossain, M. L., Lim, L. Y., Hammer, K., Hettiarachchi, D., & Locher, C. (2022b). A Review of Commonly Used Methodologies for Assessing the Antibacterial Activity of Honey and Honey Products. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11070975>
- Huang, Y. Y., Price, M., Hung, A., Gal-Oz, O., Ho, D., Carion, H., Deutschbauer, A., & Arkin, A. (2022). Functional screens of barcoded expression libraries uncover new gene functions in carbon utilization among gut Bacteroidales. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.10.10.511384>
- Iurlina, M. O., & Fritz, R. (2005). Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3), 297–304. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2005.03.017>
- Kunin, V., Copeland, A., Lapidus, A., Mavromatis, K., & Hugenholtz, P. (2008). A bioinformatician's guide to metagenomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 72(4), 557–578. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00009-08>



- Kwakman, P. H. S., Velde, A. A. te, Boer, L., Speijer, D., Christina Vandembroucke-Grauls, M. J., & Zaat, S. A. J. (2010). How honey kills bacteria. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(7), 2576–2582. <https://doi.org/10.1096/FJ.09-150789>
- Kwakman, P. H. S., & Zaat, S. A. J. (2012). Antibacterial components of honey. *IUBMB Life*, 64(1), 48–55. <https://doi.org/10.1002/IUB.578>
- Lee, C. R., Lee, J. H., Park, M., Park, K. S., Bae, I. K., Kim, Y. B., Cha, C. J., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2017). Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(MAR), 55. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2017.00055>
- Lin, M.-F., & Lan, C.-Y. (2014). Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World Journal of Clinical Cases : WJCC*, 2(12), 787. <https://doi.org/10.12998/WJCC.V2.I12.787>
- López, A. C., & Alippi, A. M. (2007). Phenotypic and genotypic diversity of *Bacillus cereus* isolates recovered from honey. *International Journal of Food Microbiology*, 117(2), 175–184. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2007.03.007>
- Mahmood, A., & Altalibi, M. (2012). Potential Antibacterial Effects on Iraqi Honey on. *International Journal of Advanced Biological Research*, 2(4), 747–749. [https://books.google.com/books/about/The\\_Archaeology\\_of\\_of\\_Beekeeping.html?hl=el&id=SOgBAAAAMAAJ](https://books.google.com/books/about/The_Archaeology_of_of_Beekeeping.html?hl=el&id=SOgBAAAAMAAJ)
- Mandal, M. D., & Mandal, S. (2011). Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2), 154–160. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60016-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60016-6)
- Mavric, E., Wittmann, S., Barth, G., & Henle, T. (2008). Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(4), 483–489. <https://doi.org/10.1002/MNFR.200700282>
- Ngara, T. R., & Zhang, H. (2018). Recent Advances in Function-based Metagenomic Screening. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 16(6), 405–415. <https://doi.org/10.1016/J.GPB.2018.01.002>
- Nikolouli, K., & Mossialos, D. (2012). Bioactive compounds synthesized by non-ribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases discovered through genome-mining and metagenomics. *Biotechnology Letters*, 34(8), 1393–1403. <https://doi.org/10.1007/S10529-012-0919-2>
- Nnadozie, C. F., & Odume, O. N. (2019). Freshwater environments as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and their role in the dissemination of antibiotic

- resistance genes. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 254(Pt B).  
<https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2019.113067>
- Quail, M. A., Matthews, L., Sims, S., Lloyd, C., Beasley, H., & Baxter, S. W. (2011). Genomic libraries: I. Construction and screening of fosmid genomic libraries. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 772, 37–58.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-61779-228-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-228-1_3)
- Ranneh, Y., Akim, A. M., Hamid, H. A., Khazaai, H., Fadel, A., Zakaria, Z. A., Albuja, M., & Bakar, M. F. A. (2021). Honey and its nutritional and anti-inflammatory value. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1).  
<https://doi.org/10.1186/S12906-020-03170-5>
- Srivastava, S., Ghosh, N., & Pal, G. (2013). Metagenomics: Mining Environmental Genomes. *Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery*, 162–189. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-0876-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-81-322-0876-1_10)
- Stella Magdalena, Anggelia, Yogiara: Characterization of antibacterial activity produced by Bacillus spp. isolated from honey and bee-associated products against foodborne pathogens. B I O T E K N O L O G I ISSN: 0216-6887 Volume 17, Number 2, November 2020 E-ISSN: 2301-8658 Pages: 51-59
- Streit, W. R., Schmitz, R. A., Boone, C., & Glaser, P. (2004). Metagenomics-the key to the uncultured microbes This review comes from a themed issue on Genomics Edited by. *Current Opinion in Microbiology*, 7, 492–498.  
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.08.002>
- Subedi, D., Vijay, A. K., & Willcox, M. (2021). Overview of mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: an ocular perspective. <https://doi.org/10.1111/Cxo.12621>, 101(2), 162–171.  
<https://doi.org/10.1111/CXO.12621>
- Sudarikov, K., Tyakht, A., & Alexeev, D. (2017). Methods for The Metagenomic Data Visualization and Analysis. *Current Issues in Molecular Biology*, 24, 37–58.  
<https://doi.org/10.21775/CIMB.024.037>
- Syed Yaacob, S. N., Huyop, F., Kamarulzaman Raja Ibrahim, R., & Wahab, R. A. (2018). Identification of Lactobacillus spp. and Fructobacillus spp. isolated from fresh Heterotrigna itama honey and their antagonistic activities against clinical pathogenic bacteria. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1428047>, 57(3), 395–405. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1428047>
- Tramuta, C., Nebbia, P., Robino, P., Giusto, G., Gandini, M., Chiadò-Cutin, S., & Grego, E. (2017). Antibacterial activities of Manuka and Honeydew honey-based membranes against bacteria that cause wound infections in animals. *Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde*, 159(2), 117–121. <https://doi.org/10.17236/SAT00106>
- Tsadila, C., Nikolaidis, M., Dimitriou, T. G., Kafantaris, I., Amoutzias, G. D., Pournaras, S., & Mossialos, D. (2021). Antibacterial activity and characterization of bacteria

isolated from diverse types of greek honey against nosocomial and foodborne pathogens. *Applied Sciences (Switzerland)*, *11*(13), 5801.  
<https://doi.org/10.3390/APP11135801/S1>

Wooley, J. C., Godzik, A., & Friedberg, I. (2010). A primer on metagenomics. *PLoS Computational Biology*, *6*(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1000667>

Yaghoobi, N., Al-Waili, N., Ghayour-Mobarhan, M., Parizadeh, S. M. R., Abasalti, Z., Yaghoobi, Z., Yaghoobi, F., Esmaeili, H., Kazemi-Bajestani, S. M. R., Aghasizadeh, R., Saloom, K. Y., & Ferns, G. A. A. (2008). Natural Honey and Cardiovascular Risk Factors; Effects on Blood Glucose, Cholesterol, Triacylglycerole, CRP, and Body Weight Compared with Sucrose. *The Scientific World Journal*, *8*, 463.  
<https://doi.org/10.1100/TSW.2008.64>

Zhang, L., Chen, F. X., Zeng, Z., Xu, M., Sun, F., Yang, L., Bi, X., Lin, Y., Gao, Y. J., Hao, H. X., Yi, W., Li, M., & Xie, Y. (2021). Advances in Metagenomics and Its Application in Environmental Microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, *12*.  
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.766364>