

Χαρακτηρισμός της βιολογικής δράσης του μικροβιώματος και των μηχανισμών αντιμικροβιακής δράσης Ελληνικών τύπων μελιού

Τσαδήλα Χριστίνα

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ:

Λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων του όπως η υψηλή θρεπτική αξία και η θετική του επίδραση στην υγεία, το μέλι αποτελεί ένα φυσικό προϊόν που καταναλώνεται σε όλο τον κόσμο. Ιδιαίτερης σημασίας είναι η αντιβακτηριακή δράση του μελιού, η οποία έχει επιβεβαιωθεί από μία πληθώρα μελετών.

Οι μικροοργανισμοί που εντοπίζονται στο μέλι έχει προταθεί ότι συμβάλλουν στην αντιμικροβιακή δράση του ως πιθανή πηγή αντιμικροβιακών ενώσεων. Στόχος του 2<sup>ου</sup> κεφαλαίου ήταν η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός βακτηρίων από 46 ελληνικά δείγματα μελιού ποικίλης βοτανικής και γεωγραφικής προέλευσης και ο προσδιορισμός της αντιβακτηριακής δράσης των βακτηρίων αυτών έναντι πέντε σημαντικών νοσοκομειακών και τροφιμογενών παθογόνων. Απομονώθηκαν 2014 βακτηριακές αποικίες, οι οποίες ελέγχθηκαν για την αντιβακτηριακή τους δράση. Το 16% των απομονωμένων αποικιών ανέστειλε την ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus*, το 11,2% της *Pseudomonas aeruginosa* και του *Acinetobacter baumannii*, το 10,2% ανέστειλε την ανάπτυξη της *Salmonella Typhimurium* και το 12,4% ανέστειλε την ανάπτυξη του παθογόνου *Citrobacter freundii*. Συνολικά, 316 απομονωμένες αποικίες, οι οποίες ανέστειλαν την ανάπτυξη περισσότερων από δύο παθογόνων ομαδοποιήθηκαν με την μέθοδο πολυμορφισμού μήκους θραύσματος περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP) του ενισχυμένου 16S rRNA γονιδίου τους. Πενήντα από αυτές τις αποικίες, έπειτα από την ομοδοποίηση, ταυτοποιήθηκαν μέσω αλληλούχησης του 16S rRNA γονιδίου τους. Η πλειοψηφία (62%) ανήκε στο γένος *Bacillus*. Μόνο 10% ταυτοποιήθηκαν ως Gram-αρνητικά βακτήρια. Επιπλέον, σε αρκετά στελέχη εντοπίστηκαν γονίδια που κωδικοποιούν πολυκετιδικές συνθάσες και μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθετάσες, υπεύθυνες για την σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών μεγάλης βιοτεχνολογικής σημασίας, που μπορεί να συμβάλλουν στην παρατηρούμενη αντιμικροβιακή δράση.

Από τα 50 ταυτοποιημένα βακτηριακά στελέχη επιλέχθηκαν 21 με στόχο την μελέτη του ενζυμικού τους δυναμικού μέσω φαινοτυπικών δοκιμών αμυλάσες, πρωτεϊνάσες, ημικυτταρινάσες, κυτταρινάσες και άλλα ένζυμα υπεύθυνα για την διάσπαση χρωστικών. Μοριακές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν για την ανίχνευση γονιδίων που κωδικοποιούν ημικυτταρινάσες, κυτταρινάσες και λακκάσες. Το 33,3%, των στελεχών βρέθηκε θετικό σε 2 τουλάχιστον από τις 8 φαινοτυπικές δοκιμές, ενώ το 14,3% (όλα του γένους *Bacillus* spp.) βρέθηκε θετικό σε 7 από τις 8. Το 71,4% των στελεχών βρέθηκε θετικό σε τουλάχιστον 1 από τις 3 μοριακές δοκιμές. Στο μεγαλύτερο ποσοστό των στελεχών (66,7%) ενισχύθηκαν γονίδια που κωδικοποιούν κυτταρινάσες.

Σε 33 από τα 50 ταυτοποιημένα βακτηριακά στελέχη πραγματοποιήθηκε έλεγχος του προβιοτικού δυναμικού μέσω δοκιμών ελέγχου της ασφάλεια των στελεχών και αντοχής σε συνθήκες που προσομοιάζουν αυτές της γαστρεντερικής οδού. Το 66,7% των στελεχών εμφάνισε αντοχή σε όξινης συνθήκες (pH 2,5). Το ίδιο ποσοστό, αν και αφορούσε διαφορετικά στελέχη, εμφάνισε αντοχή παρουσία χολικών αλάτων. Η παγκρεατίνη φάνηκε να ενισχύει την ανάπτυξη όλων των στελεχών. Τα στελέχη σε ποσοστό 84,8% φάνηκε να είναι ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά, ενώ περίπου τα μισά (48,5%) ταυτοποιήθηκαν ως γ-αιμολυτικά. Το 45,5%

βρέθηκε ικανό να προσκολλάται σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Συνολικά, το 39,4% των στελεχών βρέθηκε να είναι ασφαλές. Το στέλεχος CTB31 *Bacillus sp. (B. amyloliquefaciens/B. velezensis)*, φάνηκε να πληροί όλα τα κριτήρια των δοκιμών σχετικά με το προβιοτικό δυναμικό.

Συνολικά τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι το μικροβίωμα του μελιού πιθανώς συμβάλλει στην αντιμικροβιακή δράση και είναι μια πιθανή πηγή δευτερογενών μεταβολιτών έναντι σημαντικών νοσοκομειακών και τροφιογενών παθογόνων. Επιπλέον, τα βακτήρια που απομονώθηκαν από Ελληνικά μέλια βρέθηκε να εμφανίζουν ενζυμικό δυναμικό, παράγοντας ένζυμα μεγάλου βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος και προβιοτικό δυναμικό, αν και χρειάζεται περαιτέρω έρευνα με απώτερο στόχο βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

Το πευκόμελο είναι ένα μοναδικό είδος μελιού μελιτώματος που παράγεται αποκλειστικά σε χώρες της Ανατολικής Μεσογείου όπως η Ελλάδα και η Τουρκία. Στο **3<sup>ο</sup> κεφάλαιο** παρουσιάζεται της ποικιλότητας των μικροβιακών κοινοτήτων (microbiota) από τέσσερα πευκόμελα διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης, μέσω αλληλούχησης Επόμενης Γενιάς (NGS), προκειμένου να διερευνηθεί αν υπάρχουν κοινά (core) μέλη μικροβιακών κοινοτήτων στα πευκόμελα, αλλά και πιθανές διαφορές ανάλογα με την γεωγραφική προέλευση. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από τα τέσσερα δείγματα μελιού με διάφορες μεθόδους εκχύλισης και επιλέχθηκε η εκχύλιση μέσω του κιτ Wizard (Promega). Εν συνεχεία ελέγχθηκε η ποιότητα του εκχυλισμένου DNA με ενίσχυση των V3-V4 περιοχών του 16S rRNA γονιδίου για τα βακτήρια και των περιοχών ITS (ITS1-ITS4) για τους μύκητες. Τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχηση επόμενης γενιάς (NGS) μέσω Illumina MiSeq PE250. Στο σύνολο των δειγμάτων κυρίαρχα φάνηκαν να είναι τα γένη *Clostridium* και μη καλλιεργήσιμα βακτήρια της οικογένειας Gemmatimonadaceae. Και στα 4 δείγματα εντοπίστηκαν 6 κοινά γένη. Μεταξύ των δειγμάτων NGS64 και NGS83 (Ρόδος και Χανιά) εντοπίστηκαν 6 κοινά γένη. Τα δείγματα NGS20 και NGS99 (Εύβοια και Θάσος) φάνηκε να διαθέτουν 3 κοινά γένη, ενώ τα NGS20 και NGS83 (Εύβοια και Χανιά) μοιράζονται μόνο ένα κοινό γένος. Τέλος, 5 γένη εντοπίστηκαν μόνο στο δείγμα NGS64 Ρόδος, 4 μόνο στο NGS83 Χανιά, 3 μόνο στο NGS99 Θάσος και 2 γένη μόνο στο δείγμα NGS20 Εύβοια. Τα δεδομένα αν και πολύ πρώιμα δείχνουν πιθανό συσχετισμό του βακτηριώματος των δειγμάτων με την γεωγραφική τους προέλευση. Όσον αφορά τις περιοχές ITS για τους μύκητες, δυστυχώς, λόγω χαμηλής συγκέντρωσης του ολικού DNA των δειγμάτων, αποτελέσματα ελήφθησαν μόνο για ένα εκ των τεσσάρων δειγμάτων. Συνολικά, απαραίτητη κρίνεται περαιτέρω έρευνα με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων με στόχο την ασφαλή διεξαγωγή συμπερασμάτων και ο σαφής χαρακτηρισμός των σαφή χαρακτηρισμό των μικροβιακών κοινοτήτων Ελληνικών πευκόμελων.

Οι αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του πευκόμελου είναι καλά μελετημένες, ωστόσο λιγότερα είναι γνωστά για την αντιβακτηριακή του δράση (ιδιαίτερα από τον ελλαδικό χώρο). Στο **4<sup>ο</sup> κεφάλαιο** παρουσιάζεται η μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή σχετικά με τους μηχανισμούς αντιβακτηριακής δράσης του πευκόμελου έναντι του παθογόνου βακτηρίου *P. aeruginosa* PA14 σε μοριακό επίπεδο χρησιμοποιώντας μια προσέγγιση μελέτης του ολικού μεταγραφώματος του βακτηρίου μέσω αλληλούχησης του RNA (RNA-seq). Το βακτήριο εκτέθηκε σε συγκέντρωση πευκόμελου μισή της ανασταλτική (0,5 MIC) και για σύντομο χρονικό διάστημα (45 λεπτά). Τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχηση (Illumina NovaSeq6000, 2x150bp paired-endreads). Η ποιότητα των δεδομένων που προέκυψαν από την αλληλούχηση ελέγχθηκε με την χρήση του software FASTQC. Για την ανάλυση των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων του

γονιδιώματος της *P. aeruginosa* PA14 και για την μοριακή ανάλυση της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά πακέτα HISAT και DESeq2 (έκδοση 1.18.0). Το πευκόμελο επέφερε τη διαφορική έκφραση (>διπλάσια αλλαγή και  $p \leq 0,05$ ) 463 γονιδίων, 274 εκ των οποίων υποεκφράστηκαν και τα υπόλοιπα 189 υπερεκφράστηκαν. Η ανάλυση γονιδιακής οντολογίας αποκάλυψε ότι το πευκόμελο επηρέασε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών διεργασιών του παθογόνου. Τα γονίδια βιολογικών διεργασιών που επηρεάστηκαν περισσότερο και συγκεκριμένα υποεκφράστηκαν, από την ανάλυση γονιδιακής οντολογίας, φάνηκε ότι συμμετέχουν στην οξειδοαναγωγική διεργασία, στην διαμεμβρανική μεταφορά, στην πρωτεόλυση, στην μεταγωγή σήματος, σε βιοσυνθετικές διεργασίες, στην διαδικασία βιοσύνθεσης την φαιναζίνης, στον βακτηριακό χημειοτακτισμό και στην διαδικασία βιοσύνθεσης αντιβιοτικών. Οι βιολογικές διεργασίες που υπερεκφράστηκαν ως απόκριση στην επεξεργασία με το μέλι πεύκου, ήταν εκείνες που σχετίζονται με την ρύθμιση της μεταγραφής με καλούπι το DNA, με την μεταφορά σιδηροφόρων και την φωσφορυλίωση. Η ανάλυση των μονοπατιών έδειξε ότι η επεξεργασία με το πευκόμελο επηρέασε το ρυθμιστικό σύστημα 2 στοιχείων, το σύστημα μεταφορέων ABC, την αίσθηση μεγέθους πληθυσμού, τον βακτηριακό χημειοτακτισμό, τον σχηματισμό βιοϋμένα (βιοφίλμ) και την απόκριση SOS. Συνολικά τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι πολλαπλοί μηχανισμοί δράσης εμπλέκονται στην αντιβακτηριακή δράση που εμφανίζει το μέλι πεύκου έναντι της *P. aeruginosa*.

Οι πρωτεΐνες στο μέλι εντοπίζονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, παρόλα αυτά θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως δείκτες για τον έλεγχο της αυθεντικότητας τους μελιού. Επιπλέον στο μέλι εντοπίζονται και αντιμικροβιακά πεπτιδία που συμβάλουν στην αντιβακτηριακή του δράση. Στο κεφάλαιο 5, αρχικά καθορίστηκε το πρωτεϊνικό προφίλ 90 δειγμάτων μελιών ποικίλης βοτανικής και γεωγραφικής προέλευσης. Τα δείγματα αραιώθηκαν 50% w/v, ποσοτικοποιήθηκε η συνολική ποσότητα πρωτεΐνης και 10  $\mu\text{g}$ /δείγμα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Το προφίλ μελετήθηκε έπειτα από χρώση με Coomassie. Δείγματα μελιών ίδιας βοτανικής προέλευσης εμφάνισαν εξαιρετικά όμοιο πρωτεϊνικό προφίλ. Η γεωγραφική προέλευση δεν φάνηκε να επηρεάζει το προφίλ αυτό. Επιπλέον, ορισμένες πρωτεϊνικές ζώνες ήταν κοινές σε όλα τα δείγματα μελιών ανεξάρτητα από την βοτανική προέλευση αν και σε κάποιες περιπτώσεις η έντασή τους διέφερε.

Στο ίδιο κεφάλαιο περιγράφεται η προσπάθεια απομόνωσης πρωτεϊνών/ολιγοπεπτιδίων με αντιμικροβιακή δράση από Ελληνικά μέλια. Αρχικά πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) διαφόρων μελιών έναντι των παθογόνων *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* και *Acinetobacter baumannii* πριν και μετά την προσθήκη πρωτεϊνάσης K, για να προσδιοριστεί κατά πόσο η αντιβακτηριακή δράση τους οφείλεται στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο. Αντιβακτηριακή δράση πρωτεϊνικής φύσεως εμφάνισαν 39 δείγματα έναντι του *S. aureus*, 17 έναντι της *P. aeruginosa*, 28 έναντι της *S. Typhimurium*, 33 έναντι της *K. pneumoniae* και 17 έναντι του *A. baumannii*. Σε αυτά τα δείγματα πραγματοποιήθηκε απομόνωση των πρωτεϊνών μέσω κατακρήμνισης με θειικό αμμώνιο και ποσοτικοποίησή τους. Ακολούθησε προσδιορισμός του MIC των πρωτεϊνικών δειγμάτων για τα αντίστοιχα παθογόνα. Τιμές MIC  $\leq 300\mu\text{g/ml}$  για το πρωτεϊνικό κλάσμα εμφάνισαν 14/39 δείγματα για τον *S. aureus*, 1/17 δείγμα για την *P. aeruginosa*, 4/28 έναντι της *S. Typhimurium*, 2/33 έναντι της *K. pneumoniae* και τέλος, 4/17 δείγματα για το παθογόνο *A. baumannii*. Μετά την προσθήκη πρωτεϊνάσης K παρατηρήθηκε αύξηση της τιμής του MIC και στα 14 δείγματα για τον *S. aureus*, σε 1 για την *P. aeruginosa*, σε 4 για την *S. Typhimurium*, 2 για την *K. pneumoniae* και τέλος, σε 4 για το *A. baumannii*. Αυτά ηλεκτροφορήθηκαν

υπερσυμπυκνωμένα έως 10 φορές σε SDS-PAGE χωρίς αποδιάταξη. Ακολούθησε μονιμοποίηση των πρωτεϊνών στην πηκτή, πλύσεις με ddH<sub>2</sub>O και επίστρωση με παθογόνο *S. aureus*, αλλά δεν παρατηρήθηκε σε κανένα από αυτά ζώνη αναστολής μετά την επίστρωση. Σε 1 μόνο από τα δείγματα (Βελανιδιά & άνθη, Άγραφα, 2020) παρατηρήθηκε ζώνη αναστολής της ανάπτυξης του παθογόνου *S. aureus*.

Μέσω λειτουργικής μετα(γονιδιωματικής) ανάλυσης είναι δυνατός ο εντοπισμός γονιδίων και οπερονίων που κωδικοποιούν βιοδραστικά μόρια μεγάλου βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος. Στο κεφάλαιο 6 περιγράφεται η εφαρμογή λειτουργικής (μετα)γονιδιωματικής για την απομόνωση γονιδίων ή γονιδιακών ομάδων που βιοσυνθέτουν βιοδραστικά μόρια που αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων. Επιλέχθηκε ένα δείγμα μελιού (No 41, βαμβάκι, Λάρισα, 2019) με ισχυρή αντιβακτηριακή δράση και από το οποίο απομονώθηκαν βακτήρια με ισχυρή αντιβακτηριακή δράση έναντι πέντε παθογόνων βακτηρίων. Απομονώθηκε από αυτό το ολικό DNA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία βιβλιοθήκης κλώνων, με την βοήθεια του CopyControl Fosmid Library Production Kit with pCC1FOS Vector (Epicentre®). Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για 7 ταυτοποιημένα βακτήρια που έχουν απομονωθεί από δείγμα μελιού, και παρουσίασαν αντιβακτηριακή δράση έναντι 5 υπό μελέτη παθογόνων βακτηρίων. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού γενωμικού DNA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία μίας δεύτερης βιβλιοθήκης κλώνων. Οι δύο βιβλιοθήκες ελέγχθηκαν για το εάν φέρουν κλώνους που κωδικοποιούν βιοδραστικά μόρια τα οποία παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών, μέσω της δοκιμής επίστρωσης διπλής καλλιέργειας με soft agar (gel overlay assay).

Από την βιβλιοθήκη που προέκυψε από το ολικό γενωμικό DNA των 7 ταυτοποιημένων βακτηριακών στελεχών (7144 κλώνοι) ελέγχθηκαν σχετικά με την αντιβακτηριακή τους δράση έναντι των παθογόνων *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium* και *A. baumannii*, 940 κλώνοι. 17 κλώνοι παρουσίασαν αντιβακτηριακή δράση έναντι των τεσσάρων παθογόνων. Αντίστοιχα από τους 48 κλώνους που περιείχε η βιβλιοθήκη του ολικού DNA από το δείγμα μελιού 41, οι 8 παρουσίασαν αντιβακτηριακή δράση έναντι των τεσσάρων παθογόνων. Ποιοτικός έλεγχος των δύο βιβλιοθηκών πραγματοποιήθηκε σε 23 κλώνους (7 για την βιβλιοθήκη PL και 16 για την FOS41), με πέψη με ένζυμο περιορισμού *BamHI*.

Δύο κλώνοι με δράση έναντι της *S. Typhimurium*, επιλέχθηκαν, για να προσδιοριστεί η πλήρης αλληλουχία των φοσμιδίων τους μέσω αλληλούχησης με Illumina PE 150 HiSeq. Η πλήρης συναρμολόγηση των δύο φοσμιδίων δεν ήταν εφικτή και από την ανάλυση δεν καθορίστηκε οργανισμός προέλευσης, ούτε ταυτοποιήθηκαν γονίδια ή γονιδιακές ομάδες που εμπλέκονται στην σύνθεση αντιμικροβιακών ενώσεων και μορίων έναντι του παθογόνου βακτηρίου *S. Typhimurium*.