

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



**ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΤΥΠΩΝ
ΜΕΛΙΟΥ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ
ΑΠΟ ΑΥΤΟΥΣ**

**ANTIFUNGAL ACTIVITY OF TYPES OF GREEK HONEY AND
BACTERIA ISOLATED FROM THEM**

**Μπούτρου Ιωάννα του Χριστοφόρου
ΛΑΡΙΣΑ 2023**

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπων:

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

Μέλη:

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

Γιαβάσης Ιωάννης: Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, με γνωστικό αντικείμενο «Μικροβιολογία Τροφίμων και Μικροβιακές Ζυμώσεις για Παραγωγή Βιοπολυμερών». Υπεύθυνος του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Έχοντας φτάσει στο τέλος του αυτό το ταξίδι, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα αυτής της εργασίας, καθηγητή κ. Μόσιαλο Δημήτριο, αφενός για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου το καινοτόμο αυτό θέμα και αφετέρου για την καθοδήγηση που παρείχε καθόλη την ερευνητική διαδικασία. Οφείλω επίσης να τον ευχαριστήσω για τις εμπειρίες και τις γνώσεις που απέκτησα μέσα στο εργαστήριο. Με την βοήθειά του, ανακάλυψα εκ νέου την γοητεία της επιστήμης, την πρώτη φορά που είδα ένα τρυβλίο με θετικό αποτέλεσμα.

Θα ήθελα, επίσης, να εκφράσω την εκτίμησή μου στα υπόλοιπα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, τον κ. Αμούτζια Γρηγόριο και κ. Γιαβάση Ιωάννη.

Είμαι εξαιρετικά ευγνώμων για την υποψήφια διδάκτορα Χριστίνα Τσαδήλα, η οποία από την πρώτη κιόλας μέρα μοιράστηκε απλόχερα και αφειδώς τις γνώσεις της μαζί μου ενώ φρόντισε για την ομαλή ένταξή μου στην ομάδα του εργαστηρίου. Ακούγοντας με περίσσεια υπομονή τα χιλιάδες ερωτήματα και δίνοντας βάρος στις προτάσεις μου, μαζί με την άψογη συνεργασία της Chiara Amoroso, απόφοιτη του μεταπτυχιακού προγράμματος Κτηνιατρικής Βιοτεχνολογίας, επιμελήθηκαν για μια θαυμάσια εργαστηριακή εμπειρία.

Τέλος, θα ήθελα να δηλώσω πραγματικά υπόχρεη προς τους γονείς μου για την υποστήριξη που μου έχουν προσφέρει όλα αυτά τα χρόνια αλλά και για την πίστη τους σε μένα η οποία φαντάζει ακλόνητη. Είναι οι άνθρωποι στην ζωή μου οι οποίοι με τον τρόπο που διέπουν την δική τους, πρώτοι μου ενστάλαξαν την εκτίμηση για την έρευνα και την μαγεία των αναπάντητων ερωτημάτων. Οι ευχαριστίες μου επεκτείνονται σε όλα τα πολύ αγαπημένα μου πρόσωπα, που έχουν σταθεί ακούραστα στο πλάι μου, προσφέροντας στήριξη, συμβουλές και ισορροπία.

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη	7
Abstract.....	8
1. Τι είναι μέλι	9
1.1 Σύσταση μελιού	9
1.1.1 Σάκχαρα	10
1.1.2 Αμινοξέα και πρωτεΐνες.....	10
1.1.2.1 Ένζυμα	10
1.1.3 Υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF)	11
1.1.4 Μέταλλα και ιχνοστοιχεία	12
1.1.5 Πολυφαινόλες	12
1.1.6 Οργανικά οξέα	12
1.1.7 Βιταμίνες.....	13
1.1.8 Μικροβιακή σύσταση μελιού.....	13
1.1.9 Οφέλη στην υγεία	14
1.2 Είδη μελιού	16
1.2.1 Μέλι Manuka	16
1.2.2 Μέλι ερείκης	17
1.2.3 Μέλι Καστανιάς	19
1.3 Μυκητιακά στελέχη	20
1.3.1 Μύκητες αλλοίωσης τροφίμων	20
1.3.1.1 <i>Penicillium expansum</i> / <i>Penicillium commune</i>	20
1.3.1.2 <i>Aspergillus niger</i>	21
1.3.2 Παθογονικοί μύκητες ανθρώπων	22
1.3.2.1 <i>Candida albicans</i>	22
1.4 Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	22
2. Υλικά και Μέθοδοι	23
2.1 Υλικά	23
2.1.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός	23
2.1.2 Θρεπτικά	24
2.1.3 Καλλιέργειες βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν από ελληνικούς τύπους μελιών και εξετάστηκαν για την αντιμυκητιακή τους δραστηριότητα	24
2.1.4 Αρχικές αποικίες μυκήτων.....	26
2.1.5 Μέλι Manuka	27
2.1.6 Ελληνικοί τύποι μελιού.....	27
2.2 Μέθοδοι	28

2.2.1 Δημιουργία εναιωρήματος σπορίων μυκήτων	28
2.2.2 Αντιμυκητιακή δράση μελιού	29
2.2.2.1 Δοκιμή μεθόδων προκειμένου να επιλεγθούν τα βέλτιστα πρωτόκολλα - Μέθοδος Διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (Well Diffusion) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης μελιού.....	29
2.2.2.2 Μέθοδος Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης - MIC (Minimum Inhibition Concentration) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης μελιού έναντι των <i>P. expansum</i> , <i>P. commune</i> , <i>A. niger</i> και <i>C. albicans</i>	29
2.2.2.3 Μέθοδος Ελάχιστης Μυκητοκτόνου Συγκέντρωσης - MFC (Minimum Fungicidal Concentration) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης μελιού έναντι των στελεχών της <i>C. albicans</i>	31
2.2.3 Αντιμυκητιακή δράση βακτηριακών στελεχών έναντι των μυκήτων <i>P. commune</i> , <i>P.expansum</i> , <i>A. niger</i>	31
2.2.3.1 Δοκιμή μεθόδων προκειμένου να επιλεγθούν τα βέλτιστα πρωτόκολλα - Δοκιμή επίστρωσης διπλής καλλιέργειας (Dual culture overlay assay) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών	31
2.2.3.2 Δοκιμή ανταγωνισμού (antagonism assay) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών έναντι των μυκήτων <i>P. commune</i> , <i>P. expansum</i> , <i>A. niger</i>	32
2.2.4 Αντιμυκητιακή δράση βακτηριακών στελεχών έναντι των μυκήτων <i>C. albicans</i> M10/20 και <i>C.albicans</i> M351/19.....	33
2.2.4.1 Δοκιμή μεθόδων προκειμένου να επιλεγθούν τα βέλτιστα πρωτόκολλα - Μέθοδος Διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (Well Diffusion) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών έναντι της <i>C. albicans</i>	33
2.2.5 Θερμική επεξεργασία υπερκειμένου βακτηριακής καλλιέργειας	33
3. Αποτελέσματα.....	34
3.1 Αποτελέσματα αντιμυκητιακής δράσης μελιού.....	34
3.1.1 Αποτελέσματα δοκιμαστικής μεθόδου Διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (Well Diffusion) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης μελιού	34
3.1.2 Αποτελέσματα Μεθόδου Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης - MIC (Minimum Inhibition Concentration) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης μελιού έναντι των <i>P. expansum</i> , <i>P. commune</i> , <i>A. niger</i> και <i>C. albicans</i>	35
3.1.2.1 Αποτελέσματα των <i>P. commune</i> , <i>P. expansum</i> , <i>A. niger</i>	35
3.1.2.2 Αποτελέσματα των <i>C. albicans</i> 10/20 και <i>C. albicans</i> 351/19.....	38
3.1.3 Μέθοδος Ελάχιστης Μυκητοκτόνου Συγκέντρωσης - MFC (Minimum Fungicidal Concentration) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης μελιού έναντι των στελεχών της <i>C. albicans</i>	40
3.2 Αποτελέσματα Αντιμυκητιακής δράσης βακτηριακών στελεχών έναντι των μυκήτων <i>P. commune</i> , <i>P.expansum</i> , <i>A. niger</i>	42
3.2.1 Αποτελέσματα δοκιμαστικής Δοκιμής επίστρωσης διπλής καλλιέργειας (Dual culture overlay assay) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών.....	42

3.2.2 Αποτελέσματα Δοκιμής ανταγωνισμού (antagonism assay) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών έναντι των μυκήτων <i>P. commune</i> , <i>P. expansum</i> , <i>A. niger</i>	43
3.2.2.1 Αποτελέσματα έναντι των <i>P. commune</i> , <i>P. expansum</i>	43
3.2.2.2 Αποτελέσματα έναντι του <i>A. niger</i>	46
3.2.2.3 Βακτήρια που παρουσιάζουν αντιμυκητιακή δράση έναντι και των τριών ανωτέρω μυκήτων (<i>A. niger</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. expansum</i>).....	48
3.3 Αποτελέσματα Αντιμυκητιακής δράσης βακτηριακών στελεχών έναντι των μυκήτων <i>C. albicans</i> M10/20 και <i>C. albicans</i> M351/19	49
3.3.1 Αποτελέσματα δοκιμαστικής μεθόδου ανταγωνισμού (antagonism assay) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης των βακτηριακών στελεχών έναντι των μυκήτων <i>C. albicans</i> M10/20 και <i>C. albicans</i> M351/19	49
3.3.2 Αποτελέσματα Μεθόδου Διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (Well Diffusion) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών έναντι της <i>C. albicans</i>	50
3.3.3 Αποτελέσματα θερμικής επεξεργασίας υπερκειμένου βακτηριακής καλλιέργειας	53
4. Συζήτηση.....	54
Βιβλιογραφία	59

Περίληψη

Το μέλι, από την αρχαιότητα, είναι συνυφασμένο με την διατροφή και την υγεία των ανθρώπων, ενώ τα τελευταία χρόνια στο προσκήνιο για τις ευεργετικές του ιδιότητες έχει έρθει το μικροβίωμα του μελιού. Πληθώρα ερευνών αποδεικνύει την αντιβακτηριακή, αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση του μελιού, σε αντίθεση με την αντιμυκητιακή η οποία δεν είναι εξίσου μελετημένη. Σε μια εποχή που η μικροβιακή ανθεκτικότητα είναι παγκόσμιο πρόβλημα της δημόσιας υγείας, η ανάδειξη νέων αντιμυκητιακών παραγόντων, όπως και η εύρεση εναλλακτικών θεραπειών είναι καίριας σημασίας. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της αντιμυκητιακής δράσης ελληνικών μελιών ερείκης και καστανιάς, καθώς και βακτηρίων που έχουν απομονωθεί από αυτά, έναντι των μυκήτων *P. commune*, *P. expansum*, *A. niger*, *C. albicans* M10/20 και *C. albicans* M 351/19. Εξετάστηκε *in vitro* η αλληλεπίδραση των μυκήτων με τα βακτηριακά στελέχη και προσδιορίστηκαν οι ελάχιστες συγκεντρώσεις των μελιών ικανές να αναστείλουν την ανάπτυξη των μυκήτων, οι οποίες συγκρίθηκαν με του μελιού Manuka. Μυκητοστατική δράση έναντι και των πέντε μυκήτων και μυκητοκτόνο δράση έναντι των δύο στελεχών της *C. albicans*, εμφάνισαν τα περισσότερα ελληνικά μέλια, αποτελέσματα εφάμιλλα του μελιού Manuka. Τα απομονωμένα βακτηριακά στελέχη στην πλειοψηφία τους παρουσίασαν δραστηριότητα έναντι των μυκήτων σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό, ενώ τρία βακτήρια, μέλη του γένους *Bacillus*, ανέστειλαν την ανάπτυξη και των πέντε μυκητιακών στελεχών. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας αναδεικνύουν την σημαντική αντιμυκητιακή δράση ελληνικών τύπων μελιού, ενώ παράλληλα ανοίγουν τον δρόμο για περαιτέρω έρευνα προκειμένου να αναπτυχθούν νέες θεραπευτικές μέθοδοι.

Abstract

Honey has been linked with human nutrition and health since ancient times, while recently honey microbiome has come to the fore for its beneficial properties. A plethora of studies proves the antibacterial, antioxidant and anti-inflammatory activity of honey, in contrast to their antifungal activity which is underinvestigated. At a time when antimicrobial resistance is at its peak, the emergence of new antifungal agents, as well as the identification of alternative therapies, is crucial. The present study aims to investigate the antifungal activity of Greek heather and chestnut honey, and of bacteria isolated from them, against the fungi *P. commune*, *P. expansum*, *A. niger*, *C. albicans* M10/20 and *C. albicans* M 351/19. The interaction between the fungal and bacterial strains was examined *in vitro*. In addition, the Minimum Inhibitory Concentration of honeys were determined and compared with that of Manuka honey. Fungistatic activity against all five fungi and fungicidal activity against the two strains of *C. albicans* was exerted by most of the Greek honeys, results comparable to those of Manuka honey. The majority of the bacterial isolates showed activity against fungi to a lesser or greater extent, while three bacteria, members of *Bacillus*, inhibited the growth of all five fungal strains. The results of our study validated the significant antifungal activity of Greek honey types, while simultaneously pave the way for further research on novel antifungal agents and alternative therapies.

1. Τι είναι μέλι

Γνωστό στους ανθρώπους από αρχαιοτάτων χρόνων, το μέλι έχει αποτελέσει τροφή, σπονδή και ίαμα για μυριάδες πολιτισμούς από την προϊστορία έως και σήμερα. Παράγεται από τις μέλισσες του είδους *Apis mellifera* μέσω κατεργασίας νέκταρ και εκκρίσεων των φυτών καθώς και εκκριμάτων από απομυζούντων σε αυτά εντόμων.

Τόσο το νέκταρ όσο και το μελίτωμα, όπως ονομάζονται αυτές οι εκκρίσεις, είναι σακχαρούχα υγρά τα οποία περιέχουν μεταλλικά στοιχεία, ένζυμα και φυτοχημικά σε συστάσεις και ποσοστά οι οποίες διαφέρουν ανάλογα με το φυτό από το οποίο προέρχονται (1).

Οι συλλέκτριες μέλισσες συλλέγουν με τις προβοσκίδες τους το νέκταρ από τα άνθη, πληρούν με αυτό ένα είδος κύστεως που βρίσκεται προ του κύριου στόμαχού τους, τον προλοβό, και, φτάνοντας στην κυψέλη, μέσω της διαδικασίας της τροφάλλαξης το μεταβιβάζουν στις μέλισσες αποθηκάρους (2). Αυτές εναποθέτουν το νέκταρ στα κελιά των κηρήθρων, αφού προηγουμένως μειώσουν τα επίπεδα υγρασίας του με την επαναλαμβανόμενη παλινδρόμηση και επανακατάπωση των σταγόνων νέκταρ, μια διεργασία που ονομάζεται ‘tongue lashing behaviour’ (3) ή αλλιώς συμπεριφορά μαστιγώματος της γλώσσας και συντελεί στην προσθήκη ενζύμων, όπως η ιμπερτάση, στο μέλι (4). Στην συνέχεια, ολοκληρώνεται το στάδιο της ενεργούς εξάτμισης, με την δημιουργία εντός την κυψέλης ισχυρού ρεύματος αέρος προερχόμενου από την ταχύτατη κίνηση των φτερών εργατριών μελισσών, που έχει ως αποτέλεσμα την συμπίκνωση του νέκταρ σε ποσοστό υγρασίας 50-60%. Η τελική περιεκτικότητα σε νερό περιορίζεται σε $\leq 20\%$ με παθητική εξάτμιση μέσω μετακίνησης του μελιού από κελί σε κελί (1).

Παράλληλα με την διαδικασία της εξάτμισης, η μετατροπή του νέκταρ σε μέλι περιλαμβάνει την υδρόλυση της σουκρόζης σε φρουκτόζη και γλυκόζη, η οποία διεξάγεται με την βοήθεια ενζύμων, όπως η ιμπερτάση, τα οποία προστίθενται στο νέκταρ από τους υποφαρυγγικούς αδένες των μελισσών κατά την συλλογή και επεξεργασία του (3).

Όταν είναι πλέον έτοιμο το μέλι, με σκοπό να διατηρηθεί αναλλοίωτο και κυρίως για να μην απορροφήσει υγρασία μέχρι να καταναλωθεί, οι μέλισσες σφραγίζουν τα γεμάτα με μέλι κελιά με ένα λεπτό κάλυμμα από κερί.

1.1 Σύσταση μελιού

Το κάθε μέλι ανάλογα με την προέλευση του - βοτανική, γεωγραφική ή χρονική - παρουσιάζει διαφορές στην σύσταση και στις φυσικοχημικές του ιδιότητες, οι οποίες σε συνάρτηση με τα οργανοληπτικά και μικροσκοπικά χαρακτηριστικά του, συνιστούν και την ταυτότητα του.

Ωστόσο, υπάρχει μια κοινή βάση σε όλους τους τύπους μελιού η οποία αποτελείται από τα εξής:

1.1.1 Σάκχαρα

Βασικό συστατικό του μελιού, απαρτίζοντας περίπου το 60-95% του ολικού ξηρού του βάρους, είναι οι υδατάνθρακες. Οι μονοσακχαρίτες γλυκόζη και φρουκτόζη, που προέρχονται από την υδρόλυση του δισακχαρίτη σακχαρόζη, συνιστούν το μεγαλύτερο μέρος αυτών, με συγκεντρώσεις 20-35% και 28-40% αντίστοιχα, ενώ έχει ταυτοποιηθεί η ύπαρξη τουλάχιστον άλλων είκοσι σακχάρων σε δείγματα μελιού ανά τον κόσμο. Η αναλογία των μονοσακχαριτών φρουκτόζη και γλυκόζη χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση των μονοποικιλιακών μελιών. Η περιεκτικότητα του μελιού σε δισακχαρίτες υπολογίζεται στο 5% με πιο συνήθεις τους μαλτόζη, μαλτουλόζη, τυρανόζη, σακχαρόζη και νιγερόζη ενώ οι τρισακχαρίτες αποτελούν το 1% με κυριότερους τους ερλοζη, ισομαλτόζη, πανόζη, και κεστόζη (5).

1.1.2 Αμινοξέα και πρωτεΐνες

Η περιεκτικότητα του μελιού σε αμινοξέα και πρωτεΐνες είναι σχετικά μικρή, στο μέγιστο 0,7%, ωστόσο περιέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα με πολυπληθέστερη την προλίνη, η οποία αποτελεί το 50% επι του συνόλου (6). Η προέλευση του πρωτεϊνικού περιεχομένου του μελιού είναι κατά κύριο λόγο το νέκταρ και η γύρη των φυτών, ωστόσο η τελική του μορφή καθορίζεται έπειτα από τις μεταβολές που υφίσταται κατά την επεξεργασία του μελιού από τις μέλισσες (5,7). Μια σημαντική κατηγορία πρωτεϊνικών μορίων που απαντώνται στο μέλι και χρήζουν περαιτέρω ανάλυσης είναι τα ένζυμα.

1.1.2.1 Ένζυμα

Τα κύρια ένζυμα του μελιού είναι η ιμπερτάση, η οξειδάση της γλυκόζης, η καταλάση, η διασάση και οι πρωτεάσες.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η ιμπερτάση καταλύει την υδρόλυση της σακχαρόζης σε φρουκτόζη και γλυκόζη, αν και μια μικρή ποσότητα σακχαρόζης βρίσκεται παρούσα στο ώριμο μέλι.

Η οξειδάση της γλυκόζης, η οποία καταλήγει στο μέλι από τους υποφαρυγγικούς αδένες των μελισσών, διαδραματίζει ρόλο στην διάσπαση των υδατανθράκων, όπως αυτή της γλυκόζης σε γλυκουρονικό οξύ και υπεροξειδίο του υδρογόνου, με συμπράγοντες μοριακό οξυγόνο και βιταμίνη B2 (4). Το υπεροξειδίο του υδρογόνου στην συνέχεια μετατρέπεται σε νερό και

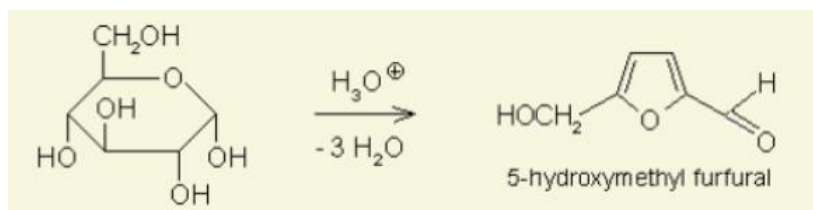
μοριακό οξυγόνο υπό την δράση καταλάσης. Δείγματα μελιού με υψηλή ενεργότητα διαστασών έχουν χαμηλή περιεκτικότητα υπεροξειδίου του υδρογόνου, σε αντίθεση με δείγματα με υψηλή ενεργότητα οξειδάσης της γλυκόζης και χαμηλή ενεργότητα καταλάσης, τα οποία έχουν αποδειχθεί χρήσιμα στην ίαση πληγών (4,8). Οι κύριες πηγές της καταλάσης στο μέλι είναι το νέκταρ και οι ενδογενείς μικροοργανισμοί του μελιού (9).

Οι πρωτεάσες είναι υπεύθυνες για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών προς αμινοξέα ή ολιγοπεπτίδια. Μέρος αυτών των πεπτιδίων εμφανίζουν αντιοξειδωτικές, ογκοκατασταλτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες (10,11).

Τέλος, η λειτουργία της διαστάσης είναι η διάσπαση των χημικών δεσμών των πολυσακχαριτών του νέκταρ, όπως η αμυλόζη, και η μετατροπή τους σε γλυκόζη. Η ποσότητα και η ενεργότητα της αποτελούν δείκτες ποιότητας, καθώς όντας θερμοευαίσθητο ένζυμο, η απουσία της υποδηλώνει θερμική επεξεργασία. Μάλιστα, παρόλο που προέρχεται από τις μέλισσες και όχι από τα φυτά, τα επίπεδά της δίνουν στοιχεία για την βοτανική προέλευση του μελιού καθώς το υπόστρωμα επηρεάζει την ενεργότητα της (4,12).

1.1.3 Υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF)

Η υδροξυμεθυλοφουρφουράλη είναι προϊόν της μη ενζυμικής διάσπασης της φρουκτόζης ή της γλυκόζης (4). Είναι κυκλικός υδρογονάνθρακας με λειτουργικές ομάδες αλδεϋδης και υδροξυλίου. Ως ενδιάμεσο προϊόν της αντίδρασης Maillard, η παραγωγή της επάγεται από την θέρμανση και από την μείωση του pH.



Εικόνα 1: Παραγωγή υδροξυμεθυλοφουρφουράλης από γλυκόζη(13)

Η επικρατούσα άποψη για την περιεκτικότητα του μελιού σε HMF, υποστηρίζει ότι σε φρέσκο μέλι είναι παρούσα μόνο σε μικρές ποσότητες, ενώ η συγκέντρωση της αυξάνεται κατά την αποθήκευση ή την θέρμανση. Για τον λόγο αυτό έχει αποτελέσει κριτήριο ποιότητας και “δείκτη ηλικίας” του μελιού (14). Ωστόσο, υπάρχουν και έρευνες που δεν υποστηρίζουν την αναλογική σχέση χρόνου αποθήκευσης - συγκέντρωσης HMF (4).

1.1.4 Μέταλλα και ιχνοστοιχεία

Η περιεκτικότητα του μελιού μεταλλικά στοιχεία κυμαίνεται από 0,1 και 0,3% για τα ανθόμελα, ενώ στα μέλια από μελίτωμα φτάνει στο 1%, με τα ποσοστά και την σύσταση να εμφανίζουν διαφορές ανά την υφήλιο. Κατά κύριο λόγο, το πολυπληθέστερο στοιχείο που βρίσκεται στο μέλι είναι το κάλιο, ακολουθούμενο από τα μαγνήσιο, ασβέστιο, σίδηρο, ψευδάργυρο και χαλκό. Ανάλογα με την καθαρότητα της περιοχής στην οποία τρυγάνε οι μέλισσες, το μέλι μπορεί να περιέχει ίχνη βαρέων μετάλλων, όπως μόλυβδος, κάδμιο και χρώμιο, τα οποία προέρχονται από ρυπασμένα ύδατα και γεωργικά λιπάσματα. Λόγω της ποικιλότητας των μεταλλικών στοιχείων κάθε τοποθεσίας, το μεταλλικό προφίλ ενός μελιού μπορεί να αποτελέσει το κλειδί για την ταυτοποίηση της γεωγραφικής προέλευσης του (15).

1.1.5 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι μια ευρεία ομάδα ενώσεων που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη φαινολικών δομών και περιλαμβάνει φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα. Η πλειοψηφία όσων απαντώνται στο μέλι αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών, αν και ενίοτε υφίστανται επεξεργασία από τις μέλισσες. Οι ενώσεις αυτές συντελούν στην εύρεση της βοτανικής προέλευσης του μελιού, καθώς εμφανίζουν αποκλίσεις ανάμεσα σε διαφορετικά μονοποικιλιακά μέλια (16). Οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση, που περιγράφεται στην παράγραφο 1.2 (5,8,16,17).

1.1.6 Οργανικά οξέα

Το μέλι περιέχει οργανικά οξέα, σε ισορροπία με τις αντίστοιχες λακτόνες τους, προερχόμενα ακέραια από το νέκταρ ή συχνότερα από την επεξεργασία των σακχάρων του κατά την ωρίμανση του μελιού. Παρόλο που αποτελούν στο μέγιστο το 0.5% του συνολικού στερεού υπολείμματος του μελιού, είναι καίρια για τα ευχάριστα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά όπως και για την συντήρησή του. Στο μέλι υπάρχει πληθώρα γλυκονικού οξέος, όντας προϊόν της οξειδωσης της γλυκόζης από την οξειδάση της γλυκόζης. Συνολικά στο μέλι απαντώνται τουλάχιστον τριάντα μη αρωματικά οργανικά οξέα κάποια εκ των οποίων αποτελούν ενδιάμεσα ενζυμικών διεργασιών όπως ο κύκλος Krebs (17,18).

1.1.7 Βιταμίνες

Η περιεκτικότητα του μελιού σε βιταμίνες είναι σχεδόν αμελητέα, ωστόσο υπάρχουν ίχνη της βιταμίνης C, ακολουθούμενη από θειαμίνη (B1), ριβοφλαβίνη (B2), πυριδοξίνη (B6) και νιασίνη (17,18).

1.1.8 Μικροβιακή σύσταση μελιού

Το μικροβίωμα του ακατέργαστου μελιού διαμορφώνεται από την γύρη και το νέκταρ των φυτών, τις πεπτικές οδούς των μελισσών, ακόμα και από το φυσικό περιβάλλον της κυψέλης (19). Οι μικροοργανισμοί που αποικίζουν το μέλι, πρέπει να έχουν την δυνατότητα να επιβιώνουν σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων, σε χαμηλό ποσοστό υγρασίας, χαμηλή οξύτητα και υπό την παρουσία ενδογενών αντιμικροβιακών παραγόντων του μελιού. Για τον λόγο αυτό οι κύριες κατηγορίες οργανισμών που εντοπίζονται στο μέλι είναι σποριογόνα βακτήρια και ζύμες (20). Βακτήρια του γένους των *Bacillus* βρίσκονται στο μέλι σε αρκετά μεγάλο ποσοστό επί του συνόλου και μπορούν να προέρχονται από διαφορετικές πηγές (20–22). Συντηρημένα παγκοσμίως μέλη του μικροβιώματος των μελισσών είναι τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) - *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* - τα οποία απαντώνται επίσης πολύ συχνά στο μέλι (23,24). Όσον αφορά τους μύκητες που εντοπίζονται στο νέκταρ και ανήκουν στην χλωρίδα του μελιού, είναι κυρίως ασκομυκητικές ζύμες, συνήθως γένους *Candida*, *Saccharomyces* ή μυκηλιακοί ασκομύκητες όπως *Aspergillus*, *Penicillium* και *Fusarium*.(22)

Άξια αναφοράς είναι η ύπαρξη του βακτηρίου *Clostridium botulinum*, το οποίο καταλήγει στο μέλι από το περιβάλλον(25), και παρόλο που δεν βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις, έχει αποτελέσει τον λόγο που η κατανάλωση μελιού απαγορεύεται πριν την ηλικία του ενός έτους, καθώς μπορεί να προκαλέσει βοτουλισμό στα βρέφη(26).

Στο αντίξοο μικροπεριβάλλον του μελιού, τα μέλη του μικροβιώματος ανταγωνίζονται το ένα το άλλο για τους περιορισμένους διαθέσιμους πόρους, προκειμένου να εξασφαλίσουν την επιβίωση τους. Έντονες ανταγωνιστικές σχέσεις αναπτύσσονται μεταξύ συγγενικών και μη ειδών, καταλήγοντας στην σύνθεση και έκκριση πληθώρας μορίων που στοχεύουν στην καταστροφή βασικών κυτταρικών δομών και λειτουργιών των ανταγωνιστικών μικροοργανισμών. Παράλληλα, η δράση τους αφορά την διατάραξη βιοφιλμ, την σύζευξη με μέταλλα για μείωση της βιοδιαθεσιμότητας τους και την κυτταροτοξικότητα. Σε αυτά τα μόρια περιλαμβάνονται κατά κύριο λόγο, οι βακτηριοσίνες, οι επιφανειοδραστικές ουσίες, τα σιδηροφόρα και οι μυκοτοξίνες που παράγονται από βακτήρια και μύκητες. Η συσσώρευσή αυτών των ουσιών στο μέλι προσδίδει στην αντιμικροβιακή του δράση (22).

Η οικογένεια *Bacillaceae* κυριαρχεί στη μικροβιακή χλωρίδα του μελιού λόγω της εξαιρετικής ικανότητας παραγωγής αντιμικροβιακών ενώσεων που στρέφονται κατά ανταγωνιστικών μικροοργανισμών. Μία τέτοια ένωση αποτελεί η βακυλυσίνη (bacilysin), ένα μικρό μη ριβοσωμικά παραγόμενο διπεπτίδιο με αντιβιοτικές ιδιότητες, το οποίο έχει δράση ανταγωνιστικού αναστολέα ενός ενζύμου (glucosamine synthase) που συμμετέχει στην σύνθεση μαννοπρωτεΐνης ή πεπτιδογλυκάνων, σε μύκητες και βακτήρια αντίστοιχα, προκαλώντας λύση του μικροβιακού κυτταρικού τοιχώματος (27). Παράλληλα, τα γένη *Bacillus* και *Paenibacillus* είναι γνωστοί παραγωγοί λιποπεπτιδίων με αντιμυκητιασικές και αντιβακτηριακές δράσεις, τα οποία χάρη στην αμφιφιλική δομή τους, μειώνουν την επιφανειακή τάση της λιπιδιακής διπλοστοιβάδας της μεμβράνης. Με τον αυτόν τον τρόπο δράσης, βιοτασιενεργά λιποπεπτίδια όπως η σουρφακτίνη, η ιτουρίνη και η φενγγυσίνη βρέθηκαν να είναι πολύ αποτελεσματικά στην διατάραξη των βιοφίλμ, μειώνοντας την υδροφοβικότητα της κυτταρικής επιφάνειας και στην κυτταρική λύση λόγω του σχηματισμού διαμεμβρανικών διαύλων στις μεμβράνες των μυκήτων (28).

1.1.9 Οφέλη στην υγεία

Το μέλι κατέχει πολύτιμη θέση στην παραδοσιακή ιατρική εδώ και αιώνες, έχοντας αποτελέσει γιατροσόφι πρώτης γραμμής για περιπτώσεις από ερεθισμένο λαιμό έως δερματικές παθήσεις, μέσω κατανάλωσης ή επάλειψης. Παρόλο που μέχρι πρότινος οι πρακτικές αυτές βασιζόνταν σε εμπειρικά στοιχεία, έρευνες έχουν αποδείξει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές ακόμα και αντικαρκινικές ιδιότητες του μελιού.

Οι επουλωτικές ικανότητες του μελιού πηγάζουν κυρίως από συνδυασμό της αντιμικροβιακής του δραστηριότητας και του προστατευτικού φράγματος που προσφέρει το υψηλό ιξώδες του. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι κάποιοι τύποι μελιών έχουν την ικανότητα να διεγείρουν τα μονοκύτταρα, πρόδρομα μόρια των μακροφάγων, προς παραγωγή TNF- α , μια ανοσορρυθμιστική κυτοκίνη (16).

Σε αυτήν την διαδικασία συμμετέχει και η bee defensin I, ένα αντιμικροβιακό πεπτίδιο που έχει εντοπιστεί στην αιμόλεμφο και στους υποφαρυγγικούς αδένες των μελισσών (8), η οποία παρουσιάζει διττό ρόλο. Στην συγκεκριμένη περίπτωση προωθεί την επανεπιθηλιοποίηση των πληγών, επάγοντας την παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας (MMPs) από άωρα κερατινοκύτταρα, οι οποίες στην συνέχεια μεταναστεύουν στο σημείο της πληγής με σκοπό την επούλωση (29).

Από την άλλη, σχετίζεται και με την αντιμικροβιακή δράση του μελιού, καθώς η φυσιολογική λειτουργία της bee defensin I (αντιμικροβιακό ολιγοπεπτίδιο) μέσα στη μέλισσα είναι η εγγενής ανοσολογική απόκριση, παρουσιάζοντας δραστηριότητα έναντι μυκήτων, ζυμομυκήτων, πρωτόζωων και τόσο θετικών όσο και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (30). Με τις προστατευτικές, αντιοξειδωτικές ικανότητες του μελιού έχει συσχετιστεί και η φαινολική του σύσταση. Φλαβονοειδή και πολυφαινόλες που απαντώνται συχνά στο μέλι, όπως το βενζοϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ, η κατεχίνη και καμπεφερόλη, καταπολεμούν σε εύρος παθολογικών καταστάσεων, από φλεγμονές έως νευροεκφυλιστικές διαταραχές (31). Είτε εξουδετερώνοντας ενεργές ρίζες οξυγόνου είτε διεγείροντας διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες που σχετίζονται με τις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες (5), είναι υπεύθυνες για πολλές από τις ευεργετικές ιδιότητες του μελιού, παρά το συγκριτικά μικρό ποσοστό τους.

Όσον αφορά την αντιμικροβιακή του δράση, το μέλι αποτελεί όξινο περιβάλλον, με pH ανάμεσα στο 3,2 και 4,5, το οποίο είναι αρκετά χαμηλό ώστε να του προσδίδει βακτηριοστατικές ιδιότητες. Ταυτόχρονα, η υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα δημιουργεί υψηλή ωσμωτικότητα, συνεισφέροντας στο αντιμικροβιακό αποτέλεσμα. Ο υγροσκοπικός χαρακτήρας του μελιού συντελεί στην “δέσμευση” νερού από το περιβάλλον με αποτέλεσμα να αφυδατώνει τα βακτήρια(16).

Κατά κύριο λόγο όμως, η αντιμικροβιακή ικανότητα των περισσότερων μελιών οφείλεται στην ενζυμική παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου, το οποίο κατατάσσεται ως οξειδωτικό βακτηριοκτόνο, καθώς αφαιρεί ηλεκτρόνια από χημικές δομές με αποτέλεσμα την οξείδωση. Η οξείδωση αυτή παράγει ενεργές ρίζες οξυγόνου που προκαλούν μη αναστρέψιμη βλάβη στο DNA, αναστέλλοντας την μικροβιακή ανάπτυξη (8). Η συγκέντρωση του στο μέλι καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τα επίπεδα της οξειδάσης της γλυκόζης, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Η θέρμανση ή ύπαρξη καταλάσης στο μέλι μειώνουν την ποσότητα του υπεροξειδίου και κατά συνέπεια την δραστηριότητα του. Η αραίωση του μελιού (40-20%) αυξάνει τα επίπεδα υπεροξειδίου διότι η ύπαρξη νερού προάγει την δραστηριότητα της οξειδάσης της γλυκόζης άρα και την παραγωγή υπεροξειδίου (9,32).

Μια άλλη ουσία εξέχουσας αντιμικροβιακής σημασίας, που εντούτοις απαντάται μόνο στο μέλι Manuka, είναι η μεθυλογλυοξάλη (MGO). Αποτελεί προϊόν της διυδροξυακετόνης, η οποία καταλήγει στο μέλι προερχόμενη από το νέκταρ που συλλέγουν οι μέλισσες από το φυτό *Leptospermum scoparium*. Η μετατροπή της διυδροξυακετόνης σε MGO στο μέλι μπορεί να συμβεί τόσο μη ενζυμικά όσο και ενζυμικά από τη συνθάση της μεθυλογλυοξάλης (8). Ο

μηχανισμός δράσης της MGO στηρίζεται στην ικανότητά της να μεταβάλλει τη δομή των βακτηριακών φιλμίων και βλεφαρίδων και συνεπώς να προκαλεί δυσλειτουργία στην προσκόλληση και κινητικότητα των βακτηρίων (33). Η δυνατότητα αναστολής της βακτηριακής ανάπτυξης από την μεθυλογλυοξάλη, έχει, επίσης, αποδοθεί κατά τους Rückriemen et al (34), στην ικανότητα αναστολής του βακτηριακού ενζύμου ουρεάση, η οποία διευκολύνει τα βακτήρια να εγκλιματιστούν και να αναπτυχθούν γρήγορα με την παραγωγή αμμωνίας σε όξινο περιβάλλον.

Όλα τα επιμέρους αντιμικροβιακά συστατικά του μελιού δεν λειτουργούν μόνο ανεξάρτητα αλλά και συνεργιστικά. Ο συνδυασμός της ιδιότητας της bee defensin I να διασπά κυτταρικές μεμβράνες και της μεθυλογλυοξάλης να μεταβάλλει τα φίμπρια και τις βλεφαρίδες των βακτηρίων, καθιστά το μέλι κατάλληλο για την διατάραξη των μικροβιακών βιοφίλμ (8). Μια τέτοια ικανότητα είναι ύψιστης σημασίας διότι, η δημιουργία βιοφίλμ είναι καίρια για τα βακτήρια που έχουν την δυνατότητα αυτή, καθώς παρέχει προστασία και διευκολύνει την συμβίωση, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην ανθεκτικότητά τους στα αντιβιοτικά (35,36).

1.2 Είδη μελιού

1.2.1 Μέλι Manuka

Το μέλι που προέρχεται από το δέντρο Manuka (*Leptospermum scoparium*), ενδημικό στην Νέα Ζηλανδία και Αυστραλία, παρουσιάζει αντιβακτηριακές ικανότητες, οι οποίες δεν σχετίζονται με την περιεκτικότητα του σε υπεροξειδίο του υδρογόνου αλλά με την ύπαρξη μεθυλογλυοξάλης, όπως προαναφέρθηκε (37). Το όνομά του προέρχεται από την ονομασία των Μάορι ιθαγενών για το φυτό *Leptospermum scoparium*. Έχει αποτελέσει ένα από τα πιο μελετημένα είδη μελιού, λόγω της μοναδικότητας του στην προέλευση και στην αποδεδειγμένη δυνατότητα αναστολής περίπου 60 βακτηριακών ειδών, συμπεριλαμβανομένων θετικών και αρνητικών κατά Gram, αερόβιων και αναερόβιων βακτηρίων (16). Λογικό επακόλουθο αυτού είναι η παγκόσμια αναγνώριση και εμπορευματοποίηση του ως θεραπευτικό προϊόν. Επειδή ωστόσο δεν έχουν όλα τα μέλια Manuka την ίδια σύσταση, υπάρχουν κάποια κριτήρια βάσει των οποίων καθορίζεται η ποιότητα του μελιού και αποκτά το δικό του μοναδικό αριθμό “Unique Manuka Factor - UMF™”.

Αρχικό κριτήριο το οποίο προσδιορίζει την αυθεντικότητα και την καθαρότητα του μελιού είναι η λεπτοσπερίνη, μία ουσία που εντοπίζεται αποκλειστικά στο νέκταρ των λουλουδιών

του δέντρου Manuka. Στην συνέχεια, κρίνονται οι ιαματικές ικανότητες του μελιού βάσει των επιπέδων διυδροξυακετόνης και μεθυλογλυοξάλης, με επιθυμητές συγκεντρώσεις διυδροξυακετόνης πάνω από 70 mg/kg. Τέλος, η παρουσία υδροξυμεθυλοφουρφυράλης (HMF), δίνει στοιχεία για την πάροδο του χρόνου από την ημερομηνία παραγωγής του μελιού, με όριο αποδοχής τα 40mg/kg (38).

Παρόλο που η αντιμυκητιακή ικανότητα του μελιού Manuka δεν είναι τόσο εκτενώς μελετημένη όσο η αντιβακτηριακή, υπάρχουν αρκετές μελέτες που την υποστηρίζουν. Οι Yabes et al (39) ανέδειξαν το μέλι Manuka ως μυκητοστατικό και μυκητοκτόνο, έναντι μυκήτων των οικογενειών *Mucorales*, *Aspergillus*, και *Fusarium*. Αποδείχθηκε επίσης αποτελεσματικό στην καταστροφή των βιοφιλμ που δημιουργούν τα μέλη του γένους *Candida* (40), στην οποία συμμετέχει ενεργά η μεθυλογλυοξάλη (41).

1.2.2 Μέλι ερείκης

Με τις ονομασίες ερείκη, έρικα, ρέικι, σουσούρα περιγράφονται είδη της οικογένειας *Ericaceae*, κυρίως γένους *Erica* αλλά και η *Calluna vulgaris*, μοναδική *Calluna* σε αυτήν την οικογένεια. Αποτελούν θαμνώδη, πολυετή φυτά, των οποίων τα άνθη είναι πλούσια σε νέκταρ και γύρη. Στην Ελλάδα, τα είδη *Erica manipuliflora* και *Erica arborea* κυριαρχούν στην παραγωγή ερεικόμελου. Ενδημούν στις ίδιες περιοχές, με διαφορετικές περιόδους ανθοφορίας για αυτό και ονομάζονται φθινοπωρινή και ανοιξιιάτικη ερείκη αντίστοιχα. Το μέλι που προέρχεται από την ανοιξιιάτικη ερείκη (*Erica arborea*), συνήθως καταναλώνεται από τις ίδιες τις μέλισσες κατά την ανάπτυξη τους οπότε σπάνια καταλήγει στα ράφια. Η φθινοπωρινή ερείκη (*Erica manipuliflora*) ανθίζει από αρχές Σεπτεμβρίου έως το Νοέμβριο, μια περίοδος σχετικά χαμηλής ανθοφορίας άλλων φυτών, έχοντας ως αποτέλεσμα ένα αμιγές μέλι ερείκης. Χωρίς να παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές στην σύστασή τους, τα μέλια που παράγονται από την *Erica arborea* και την *Erica manipuliflora*, αποκλίνουν ελαφρώς στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Το ανοιξιιάτικο μέλι ερείκης είναι σκούρο διαυγές καστανό χρώμα, που ανοίγει κατά την κρυστάλλωση, ενώ το φθινοπωρινό έχει βαθιά καφέ όψη με κοκκινωπές αποχρώσεις. Διακρίνεται από το ιδιαίτερο άρωμά του που ομοιάζει καραμέλα βουτύρου και την υπόπικρή γεύση του (42,43).

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα 1. Σημειωτέα είναι η υψηλή περιεκτικότητα του σε υγρασία, η οποία μπορεί να ξεπεράσει τα θεσμοθετημένα όρια $\leq 20\%$. Για το ερεικόμελο που προέρχεται μόνο από την *Calluna vulgaris*, έχει θεσπιστεί εξαίρεση που επιτρέπει ποσοστά υγρασίας έως 23% και αναγράφεται στο Άρθρο 67 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (ΦΕΚ 788/31-12-87) προς τις διατάξεις της οδηγίας

2001/110/E.K. του Συμβουλίου (ΕΕ L 10/12-01-2002). Ενδιαφέρον προξενεί και η υψηλή περιεκτικότητα του ερεικόμελου σε γλυκόζη η οποία προκαλεί την ταχεία κρυστάλλωση του.

Πίνακας 1: Φυτικοχημικά χαρακτηριστικά ερεικόμελου που παράγεται από τις *Erica manipuliflora* και *Erica arborea*. Θρασυβούλου Α., Μανίκης Ι., Τανανάκη Χ., Τσέλιος Δ., Καραμπουρνιώτη Σ., Δήμου Μ. (2002). Η ταυτότητα του ελληνικού μελιού, Α. Φυτικοχημικά χαρακτηριστικά που στηρίζουν την ποιότητα του προϊόντος, 1 Επιστημονικό Συνέδριο Μελισσοκομίας – Σηροτροφίας, Αθήνα 29 Νοεμβρίου – 1 Δεκεμβρίου, σελ. 232-253.

Χημικά Χ/κα	Αριθ. δειγμ.	Μέσος όρος	Ελάχ.-Μεγ. τιμή	Τυπική αποκλ.	Συντελεστής Παραλ. %
Υγρασία %	35	18,8	16,0 - 23,0	2,19	11,6
Τέφρα %	35	0,4	0,3-0,6	0,11	27,5
pH	35	4,2	3,30- 4,62	0,27	6,4
HMF mg/Kg	35	4,3	0,0 - 11,9	3,2	7,4
Γλυκόζη %	35	31,2	29,4-38,8	1,5	4,8
Φρουκτόζη %	35	36,8	34,8-43,4	2,5	6,7
Γλυκόζη+Φρουκτόζη	35	68,0	64,2-82,2	4,1	6,0
Ανάγοντα ζάχαρα	35	74,3	69,8-81,7	8,3	11,1
Σουκρόζη %	35	0,25	0,20-0,50	0,04	16
Χρώμα 560 nm	35	0,524	0,396-0,644	0,114	26,8
Αγωγιμότητα mS.cm	35	0,67	0,56-0,89	0,16	23,8
Διαστάση DN	35	27,6	15,9 - 32,1	5,3	19,20
Ιμπερτάση IN	20	19,6	12,7-39,6	4,7	29,2
Προλίνη mg/kg	35	536	329-931	332	61,2
Συνολική οξύτητα meq/Kg	20	31,6	31,8-43,6	2,5	7,9
Ποσοστά γυρεοκόκκων%	35	63,3	45,0-90,0	15,6	24,6
Κάλιο mg/Kg	20	2,38	2,15-2,55	0,13	5,69
Νάτριο mg/Kg	20	0,1	0,1-0,1	0,0	0,0
Ασβέστιο mg/Kg	20	5,1	4,0-6,0	0,7	13,4
Μαγνήσιο mg/Kg	20	2,8	1,6-5,2	1,3	46,9
Μαγγάνιο mg/Kg	20	0,03	0,00-0,042	0,02	60,7
Ψευδάργυρο mg/Kg	20	-	-		-
Σίδηρος mg/Kg	20	-	-		-
Χαλκός mg/Kg	20-	-	-		-

Το μέλι ερείκης έχει αποδειχθεί εξέχον αντιμικροβιακό προϊόν, δραστικό έναντι βακτηρίων και μυκήτων. Οι Feas και Estevinho χρησιμοποιώντας μονοποικιλιακά μέλια ερείκης από φυτά γένους *Erica* σε συγκεντρώσεις 10-60%, κατάφεραν να αναστείλουν επιτυχώς την ανάπτυξη των μυκήτων *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans*(44). Οι ίδιοι απέδωσαν αυτήν την ικανότητα στα φλαβονοειδή και τις πολυφαινόλες που περιέχει. Όμοια αποτελέσματα επέφερε και στην ανάπτυξη της *Pseudomonas aeruginosa*, ενός αρνητικού κατά Gram βακτηρίου που συχνά αποικίζει ανοιχτές πληγές και έλκη, διολισθαίνοντας την επούλωση τους (45).

1.2.3 Μέλι Καστανιάς

Το μέλι καστανιάς παράγεται κατά κύριο λόγο από τις εκκρίσεις της *Myzocallis castanicola*, αφίδα που συναντάται στα φύλλα και στους καρπούς του δέντρου. Ο συνδυασμός νέκταρ και μελιτώματος καθώς και η σύσταση του, όπως αναγράφεται στον πίνακα 2, συνάδουν με χαρακτηριστικά μελιού μελιτώματος, ωστόσο σύμφωνα με το σύστημα κατάταξης των μελιών βάσει της οπτικής περιστροφής τους, το μέλι καστανιάς συγκαταλέγεται στα ανθόμελα γιατί είναι αριστερόστροφο (46,43).



Εικόνα 2: Η αφίδα *Myzocallis castanicola*

Στην Ελλάδα, η καστανιά (*Castanea sativa*) φύεται σε ορεινές περιοχές, ενώ για την ποιότητα του καστανόμελου της διακρίνεται η χερσόνησος του Αγίου Όρους.

Πίνακας 2: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά καστανόμελου που παράγεται από τις εκκρίσεις της αφίδας *Myzocallis castanicola*. Θρασυβούλου Α., Μανίκης Ι., Τανανάκη Χ., Τσέλιος Δ., Καραμπουρνιώτη Σ., Δήμου Μ. (2002). Η ταυτότητα του ελληνικού μελιού, Α. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που στηρίζουν την ποιότητα του προϊόντος, 1 Επιστημονικό Συνέδριο Μελισσοκομίας – Σηροτροφίας, Αθήνα 29 Νοεμβρίου – 1 Δεκεμβρίου, σελ. 232-253.

Χημικά Χ/κα	Αριθ δειγ	Μέσος όρος	Ελάχ-Μεγ. τιμή	Τυπική αποκλ	Συντελ. Παραλ.%
Υγρασία %	25	16,4	14,8 - 17,6	0,71	4,3
Τέφρα %	25	0,8	0,6-1,2	0,15	18,7
pH	25	4,9	4,4- 5,4	0,19	3,8
HMF mg/Kg	25	3,50	1,68 - 8,25	1,76	50,2
Γλυκόζη %	25	29,5	23,5- 33,3	2,3	7,7
Φρουκτόζη %	25	37,6	33,0- 44,8	3,2	8,5
Γλυκόζη+φρουκτόζη	25	67,1	56,5- 78,1	5,8	8,6
Ανάγοντα ζάχαρα	25	64,1	57,8-75,6	4,9	7,6
Σουκρόζη %	25	1,5	1,1-1,9	0,25	50
Χρώμα 560 nm	25	0,52	0,31 - 0,68	0,089	17,1
Αγωγιμότητα mS.cm	25	1,53	1,11 – 2,06	0,32	21,1
Διαστάση DN	25	32,5	16,5 - 51,0	8,9	27,3
Ινβερτάση IN	25	20,4	16,4-34,3	4,0	16,6
Προλίνη mg/kg	25	554	432-734	139	25,0
Ελεύθερη οξύτητα meq/Kg	25	13,4	9,5-27,5	3,0	22,3
Συνολική οξύτητα meq/Kg	25	17,3	12,1-21,3	4,0	23,1
Γυρεόκοκκοι %	25	90,4	85,0-95,0	3,3	3,6
Κάλιο mg/Kg	15	3,09	2,0-3,7	0,63	20,5
Νάτριο mg/Kg	15	0,26	0,15-0,35	0,05	19,9
Ασβέστιο mg/Kg	15	5,3	3,2-7,2	1,3	24,6
Μαγνήσιο mg/Kg	15	4,1	2,4-6,4	1,3	32,9
Μαγγάνιο mg/Kg	15	0,005	0,001-0,010	0,003	67,9
Ψευδάργυρο mg/Kg	15	0,000	0,000	0,000	0,000
Σίδηρος mg/Kg	15	0,010	0,005-0,017	0,004	37,8
Χαλκός mg/Kg	15	0,000	0,000	0,000	0,000

Το καστανόμελο είναι λιγότερο όξινο από τα περισσότερα μέλια, ωστόσο εμφανίζει υψηλή αγωγιμότητα και μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ένζυμα. Η υπεροχή της φρουκτόζης έναντι στην γλυκόζη όσον αφορά την σύστασή του, ευθύνεται για την δυσκολία κρυστάλλωσης του. Τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά εξαρτώνται από την αναλογία του νέκταρ και του μελιτώματος που συλλέχθηκαν και το χρώμα του κυμαίνεται από κεχριμπαρένιο μέχρι πολύ σκούρο καστανό αν πρόκειται για μελίτωμα. Έχει έντονη, αρωματική οσμή, η οποία συνάδει με την πικρή γεύση του.

Οι ιαματικές ιδιότητες του μελιού της καστανιάς που μέχρι πρότινος βασίζονταν σε εμπειρικές γνώσεις, επιβεβαιώνονται πλέον καθώς όλο και περισσότερες έρευνες αποδεικνύουν τις αντιφλεγμονώδεις και αντιμικροβιακές του ικανότητες (47,48). Σε πρόσφατο πείραμα των Kačanióna et al, ανάμεσα σε 14 τύπους μελιού, το καστανόμελο παρουσίασε ισχυρότερη δράση έναντι του βακτηρίου *B. subtilis* (49). Παρόμοια ανασταλτική δράση εκδήλωσε κατά των βακτηριακών στελεχών *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* αλλά και των μυκήτων *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cladosporium cladosporioides* και *Rhodotorula mucilaginosa*, όπως παραθέτουν οι Kunčič et al (50). Ακόμα, έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί να λειτουργήσει συνεργειακά με βακτηριοφάγους με σκοπό τον κατακερματισμό μικροβιακών βιοφίλμ σε πληγές, *in vivo* και *ex vivo* (51).

1.3 Μυκητιακά στελέχη

1.3.1 Μύκητες αλλοίωσης τροφίμων

Η αλλοίωση των τροφίμων είναι μια μεταβολική διεργασία που καθιστά τα τρόφιμα ανεπιθύμητα ή μη αποδεκτά για ανθρώπινη κατανάλωση λόγω αλλαγών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Περιλαμβάνει μεταβολές στην οσμή, την όψη, την υφή, παραγωγή υγρών και προκαλείται από έντομα, ενδογενή ένζυμα των τροφίμων ή μικροοργανισμούς που τα αποικίζουν. Ένα μεγάλο ποσοστό αυτών των οργανισμών είναι μύκητες, με συνηθέστερους τους *Aspergillus* spp, *Rhizopus* spp, *Penicillium* spp, *Alternaria* spp, *Bothrytis*, *Byssochlamys* και *Fusarium* spp. Εκτός από τις προαναφερθείσες αλλοιώσεις, οι μύκητες παράγουν μυκοτοξίνες οι οποίες μπορούν να αποβούν επικίνδυνες για τον άνθρωπο.

1.3.1.1 *Penicillium expansum*/*Penicillium commune*

Το γένος *Penicillium* περιλαμβάνει περίπου 200 αναγνωρισμένα είδη εκ των οποίων τα 50 απαντώνται πολύ συχνά στο έδαφος, σε αποσυντιθέμενη βλάστηση, σε ξηρά δημητριακά, φρέσκα φρούτα και λαχανικά. Σχεδόν όλα τα είδη αναπτύσσονται καλά σε ένα ευρύ φάσμα εργαστηριακών μέσων, παράγοντας μικρές, κυκλικές αποικίες, συνήθως με άφθονο σχηματισμό σπορίων σε γκριζοπράσινο ή γκριζογάλανο χρώμα. Έχουν την δυνατότητα να αναπτύσσονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες και στην πλειοψηφία είναι ικανά να αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες κάτω των 5°C και ορισμένα σε θερμοκρασίες 0°C, καθιστώντας τους πολύ σημαντικούς μύκητες αλλοίωσης τροφίμων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες ψύξης (52).

Ένα τέτοιο είδος είναι ο *P. expansum*, ο κοινός μύκητας της σήψης των μήλων, που παράγει βαθιές, σκούρες πράσινες αποικίες, διαμέτρου 30-35 mm, σε ιδανικές συνθήκες θερμοκρασίας 25 °C και σχετικής υγρασίας 90%, δηλαδή συνθήκες αποσύνθεσης φυτικής ύλης. Όσον αφορά το pH, μπορεί να επιβιώσει σε ένα ευρύ φάσμα, όπου από 4,0 έως 5,0 προάγεται η βλάστηση των σπορίων του, ενώ οι ακραίες τιμές pH όπως 2,0 ή 8,0 ασκούν ανασταλτική επίδραση στη βλάστηση των σπορίων (53). Όλες οι ποικιλίες μήλων και αχλαδιών είναι ευαίσθητες στην ανάπτυξη αυτού του μύκητα, αλλά είναι ικανό να αλλοιώσει ντομάτες, αβοκάντο, μάνγκο και σταφύλια. Είναι η κύρια πηγή της μυκοτοξίνης πατουλίνης στους χυμούς φρούτων, η οποία αν και όχι ιδιαίτερα ισχυρή τοξίνη, κατηγορείται για τερατογενέσεις ενώ η άμεση κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων προκαλεί έλκος, οίδημα, σπασμούς και εμετό (54).

Ένα άλλο είδος του γένους *Penicillium* είναι ο *Penicillium commune*, του οποίου το κύριο ενδιαίτημα είναι το τυρί, προκαλώντας του αλλοιώσεις. Επίσης, αναπτύσσεται και αλλοιώνει άλλα τρόφιμα, όπως τα προϊόντα κρέατος και τα προϊόντα που περιέχουν λίπος, όπως οι ξηροί καρποί και η μαργαρίνη. Όπως και τα περισσότερα συγγενικά του είδη, ο *P. commune* αναπτύσσεται γρήγορα σε θερμοκρασίες ψύξης, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης κοντά στους 25°C και ανώτατη στους 35°C. Τα περισσότερα στελέχη του παράγουν κυκλοπιαζονικό οξύ, μια αρκετά δρασική τοξίνη, που λειτουργεί ως ανοσοκατασταλτικό σε χαμηλές δόσεις και έχει προκαλέσει μυκοτοξίκωση σε χοίρους (55).

1.3.1.2 *Aspergillus niger*

Οι μύκητες του γένους *Aspergillus* είναι πολύ διαδεδομένοι, συμμετέχουν στην αλλοίωση των τροφίμων αν και ορισμένοι είναι χρήσιμοι στην ζύμωσή τους. Αναπτύσσονται καλά σε υψηλές

συγκεντρώσεις ζάχαρης και αλατιού και συνεπώς σε πολλά τρόφιμα με χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία. Το γένος *Aspergillus* αποτελείται από 344 είδη, η ποικιλομορφία μεταξύ των οποίων είναι πολύ υψηλή (56).

Ο *Aspergillus niger* βρίσκεται άφθονος στην φύση και αποτελεί χρήσιμο εργαλείο στα χέρια βιοτεχνολόγων για την εργαστηριακή παραγωγή ενζύμων και κιτρικού οξέος. Οι θερμοκρασίες ανάπτυξης του είναι ελάχιστες 6-8°C, μέγιστες 45-47°C και βέλτιστες 35-37°C. Διακρίνεται από τα σφαιρικά μαύρα κονίδια του, τα οποία παρέχουν προστασία από το ηλιακό φως και την υπεριώδη ακτινοβολία, παρέχοντας ανταγωνιστικό πλεονέκτημα σε ενδαιτήματα όπως τα θερμότερα κλίματα, τόσο σε εξωτερικές συνθήκες όσο και σε αποθηκευμένα τρόφιμα (57). Αν και ο *A. niger* είναι λιγότερο παθογόνος για τον άνθρωπο από άλλα είδη *Aspergillus*, όπως ο *A. fumigatus* και ο *A. flavus*, έχει συσχετιστεί με ωτομυκώσεις και μπορεί να προκαλέσει διεισδυτική πνευμονική ασπεργίλλωση σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς (58,59).

1.3.2 Παθογονικοί μύκητες ανθρώπων

1.3.2.1 *Candida albicans*

Ο μύκητας *Candida albicans* θεωρείται μέλος του φυσιολογικού ανθρώπινου στοματικού και γαστρεντερικού μικροβιώματος. Εντοπίζεται σε υγιή άτομα και αποικίζει τον κοιλικό, στοματοφαρυγγικό, οισοφαγικό και γαστρεντερικό βλεννογόνο. Η *Candida albicans* μπορεί να προκαλέσει καντιντίαση του βλεννογόνου σε αυτές τις περιοχές, όταν αποικίζει έναν ανοσοκατεσταλμένο ξενιστή (60). Η ανάπτυξη λοιμώξεων οφείλεται στη δυσβίωση της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας, στην ανοσολογική δυσλειτουργία και στη βλάβη του βλεννοεντερικού φραγμού. Η παρουσία της *C. albicans* στο αίμα (καντινταιμία) αποτελεί καθαρά παθολογική κατάσταση. Η συμβιωτική σχέση υφίσταται εφόσον υπάρχει ισορροπία μεταξύ του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή και των παραγόντων μολυσματικότητας της *C. albicans*. Εμφανίζεται σε διάφορες μορφολογικές δομές (βλαστοσπόρια, ψευδοϋφές και υφές). Τα βλαστοσπόρια διαιρούνται αγενώς με εκβλάστηση, κατά την οποία, σχηματίζεται νέο κυτταρικό υλικό στην επιφάνεια του βλαστοσπόρου(61).

1.4 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν διττός. Η διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης τόσο ελληνικών τύπων μελιού, όσο και βακτηριακών στελεχών απομονωμένων από αυτά, έναντι των μυκήτων *Penicillium expansum*, *Penicillium commune*, *Aspergillus niger* και *Candida albicans*. Τα μέλια που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από περιοχές της ηπειρωτικής και

νησιωτικής Ελλάδας. Ως μέτρο σύγκρισης υπήρξε η δραστηριότητα του αναγνωρισμένου μελιού Manuka.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Εργαλεία:

- Πιπέτες των 2-20ml, 20-200ml και 100-1000ml
- Μικροβιολογικός κρίκος
- Μεταλλικό τρίγωνο επίστρωσης (spreader)
- Ογκομετρικός κύλινδρος
- Γυάλινο ποτήρι ζέσεως
- Φλόγιστρο Bunsen
- Microplate Replicator

Αναλώσιμα Υλικά:

- Tips πιπετών διαφόρων μεγεθών
- Eppendorf των 1,5 ml και 2 ml
- Falcon των 15ml και 50ml
- Γυάλινα Vials των 25ml
- Τρυβλία Petri στρογγυλά και τετράγωνα
- Αποστειρωμένοι βαμβανοφόροι στυλαιοί
- Αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες
- Διηθητικό Χαρτί Whatman No 54
- Αποστειρωμένα φίλτρα σύρριγγας 0.45μm Branchia
- Πλάκες καλλιέργειας 96 θέσεων (96 Well Plate)
- Κυψελίδες

Μηχανήματα:

- Θάλαμος Κάθετης Νηματικής Ροής Bioair Instruments
- Φωτόμετρο Colo LabExperts
- 96 well plate reader
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας
- Υδατόλουτρο
- Κλίβανος επώασης με δυνατότητα ανάδευσης
- Vortex
- Ανάστροφο μικροσκόπιο Wilovert 30 hund Wetzlar
- Φυγόκεντρος 5424 Eppendorf

2.1.2 Θρεπτικά

Potato Dextrose Broth, Biolab Diagnostics Laboratory Inc.

Sabouraud Dextrose Broth, Neogen® Culture Media

Trypton Soy Broth, Neogen® Culture Media

Agar Bacteriological, Biolife Italiana srl

Mueller Hinton Broth, Biolab Diagnostics Laboratory Inc.

Nutrient agar Biolab, Biolab Diagnostics Laboratory Inc.

2.1.3 Καλλιέργειες βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν από ελληνικούς τύπους μελιών και εξετάστηκαν για την αντιμυκητιακή τους δραστηριότητα

Πίνακας 3: Βακτηριακά στελέχη των οποίων ελέγχθηκε η αντιμυκητιακή ικανότητα.

Strain	Bacteria	Genbank Accession Number
CTA1	<i>B. pumilus</i>	MW700012
CTA2	<i>B.pumilus</i>	MW700013
CTA15	<i>B.pumilus</i>	MW700019
CTA16	<i>B.vallismortis</i>	MW700020
CTA31	<i>Bacillus</i> sp. (<i>B. aerius</i> / <i>B. altitudinis</i> / <i>B. aerophilus</i> / <i>B. stratosphericus</i>)	MW700025
CTA57	<i>B.safensis</i>	MW700028
CTA146	<i>B.safensis</i>	MW700038
CTB7	<i>B.safensis</i>	MW700041
CTB16	<i>B.safensis</i>	MW700043
CTB21	<i>B.pumilus</i>	MW700044
CTB26	<i>B.pumilus</i>	MW700045
CTB31	<i>Bacillus</i> sp. (<i>B. amyloliquefaciens</i> / <i>B. velezensis</i>)	MW700046
CTB43	<i>B.safensis</i>	MW700049
CTB89	<i>B.safensis</i>	MW700053
CTB120	<i>B.safensis</i>	MW700057
CTA5	<i>B.subtilis</i>	MW700014
CTA9	<i>B.subtilis</i>	MW700016
CTA10	<i>B.subtilis</i>	MW700017

CTA14	<i>Bacillus</i> sp. (<i>B. haynesii</i> / <i>B. piscis</i> / <i>B. paralicheniformis</i> / <i>B. licheniformis</i>)	MW700018
CTA20	<i>B. subtilis</i>	MW700021
CTA109	<i>Bacillus</i> sp. (<i>B. halotolerans</i> / <i>B. mojavensis</i>)	MW700035
CTB11	<i>Bacillus</i> sp. (<i>B. subtilis</i> subsp. <i>Inaquosorum</i> / <i>B. nakamurai</i> / <i>B. mojavensis</i> / <i>B. halotolerans</i>)	MW700042
CTA7	<i>P. megaterium</i> (<i>B. megaterium</i>)	MW700015
CTA 28	<i>B.paramycoides</i>	MW700024
CTA46	<i>Bacillus</i> sp. (<i>B. proteolyticus</i> / <i>B. wiedmannii</i>)	MW700027
CTB34	<i>B.cereus</i>	MW700048
CTB116	<i>B.cereus</i>	MW700056
CTA39	<i>S. pasteurii</i>	MW700026
CTA79	<i>S.cohnii</i>	MW700029
CTB46	<i>S.cohnii</i>	MW700050
CTA107	<i>P. stutzeri</i>	MW700034
CT110	<i>A. lwoffii</i>	MW700055
CTA23	<i>P. fulva</i>	MW700022
CTA90	<i>Pseudomonas</i> sp. (<i>P. putida</i> / <i>P.fulva</i> / <i>P.parafulva</i> / <i>P. guariconensis</i> / <i>P. plecoglossicida</i> / <i>P. cremoricolorata</i> / <i>P. taiwanensis</i> / <i>P. donghuensis</i> / <i>P.wadenswilerensis</i> / <i>P. alkylphenolica</i>)	MW700031
CTA25	<i>Terribacillus</i> sp. (<i>T. goriensis</i> / <i>T. saccharophylus</i>)	MW700023
CTA84	<i>P.coleopterorum</i>	MW700030
CTA95	<i>M. imperiale</i>	MW700032
CTA99	<i>Bacillus</i> sp. (<i>B. proteolyticus</i> / <i>B. wiedmannii</i>)	MW700033

CTA138	<i>Bacillus</i> sp.(<i>B. proteolyticus</i> / <i>B. wiedmannii</i>)	MW700037
CTB60	<i>L. fusiformis</i>	MW700051
CTA169	<i>P. profundus</i>	MW700040
CTB32	<i>M. yunnanensis</i>	MW700047
CTB93	<i>T. saccharophilus</i>	MW700054
CTB69	<i>Paenibacillus</i> sp.(<i>P. cucumis</i> / <i>P. polysaccharolyticus</i>)	MW700052
CT2H	<i>S. epidermidis</i>	MW700058
CT7C	<i>S. warneri</i>	MW700060
CT6C	<i>S.arlettae</i>	MW700059
CT12B	<i>S.hominis</i>	MW700061

Τα βακτηριακά στελέχη απομονώθηκαν από δείγματα μελιών στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (62).

2.1.4 Αρχικές αποικίες μυκήτων

Οι αρχικές αποικίες των μυκήτων *Penicillium expansum* (DSM 62841), *Penicillium commune* (DSM 2211) και *Aspergillus niger* (DSM 2466) προήλθαν από την εταιρία DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

Τα κάτωθι στελέχη προήλθαν από το Α' εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής ΑΠΘ, προσφορά του Καθηγητή Μικροβιολογίας κ. Τ-Α, Βυζαντιάδη:

Candida albicans M10/20 αποικισμός ανώτερου αναπνευστικού

Candida albicans M351/19 αποικισμός κατώτερου αναπνευστικού

2.1.5 Μέλι Manuka

Το μέλι Manuka που χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο σύγκρισης για την αντιμυκητιακή ικανότητα των δειγμάτων ελληνικών τύπων μελιού παράγεται από την εταιρία New Zealand Honey co., με Unique Manuka Factor - UMF™ 24+ και περιεκτικότητα σε μεθυλογλυοξάλη 1122+



Εικόνα 3: Μέλι Manuka της εταιρείας New Zealand Honey co.

Πηγή: <https://newzealandhoneyco.com/products/Manuka-honey-umf-24-mgo-1122>

2.1.6 Ελληνικοί τύποι μελιού

Συνολικά δέκα έξι δείγματα (16) ελληνικού μελιού από διάφορες γεωγραφικές και βοτανικές προελεύσεις παραχωρήθηκαν από μεμονωμένους μελισσοκόμους και μελισσοκομικούς συλλόγους. Σε κάθε δείγμα δόθηκε ένας μοναδικός αριθμός αναφοράς. Τα δείγματα από την παραλαβή μέχρι την χρήση τους φυλάσσονταν σε στεγνό, σκιερό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα μέλια που αποτέλεσαν τα δείγματα αυτής της έρευνας παρατίθενται στον κάτωθι πίνακα:

Πίνακας 4: Δείγματα ελληνικών τύπων μελιού που χρησιμοποιήθηκαν. Παρέχονται πληροφορίες για την βοτανική και γεωγραφική τους προέλευση και την περίοδο συγκομιδής.

Κωδικός	Προέλευση	Περιοχή	Περίοδος
200	Καστανιά	Βέροια - Ημαθία	7/20
240	Καστανιά	Χανιά	8/20
271	Καστανιά	Φλώρινα	7/21
187	Καστανιά	Φωκίδα	2/20
267	Καστανιά	Σέρρες	7/21
210	Καστανιά	Πέλλα	8/20
212	Καστανιά	Αγ. Όρος	7/20

229	Ερείκη	Αντίπαρος	12/20
183	Ερείκη	Κάλαμος	11/20
244	Ερείκη	Κρήτη	08/20
243	Ερείκη	Κρήτη	10/20
218	Ερείκη	Χανιά	12/20
269	Ερείκη	Καβάλα	04/21
241	Ερείκη	Χανιά	10/20
195	Ερείκη	Ίος	11/20
233	Ερείκη	Άνδρος	01/21

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Δημιουργία εναιωρήματος σπορίων μυκήτων

Όσον αφορά τους μύκητες *P. expansum*, *P. commune* και *A. niger*, η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την δημιουργία εναιωρήματος σπορίων των μυκήτων από στερεή καλλιέργεια, είτε για ανακαλλιέργεια είτε για οποιαδήποτε άλλη χρήση ήταν η εξής:

Προετοιμασία αποστειρωμένου αλατούχου διαλύματος 0,85% και ανάμειξη του με Tween 80 σε τελική συγκέντρωση 0,5% (Διάλυμα 1). Το Tween 80 είναι ένα μη ιοντικό τασιενεργό απορρυπαντικό μέσο που διευκολύνει τη διασπορά των υδρόφοβων σπορίων στο αλατούχο διάλυμα. Σε θάλαμο κάθετου νηματικής ροής και με φλόγιστρο bunsen εν λειτουργία, σε τρυβλίο με καλλιέργεια μύκητα τουλάχιστον 5 ημερών, έγινε εναπόθεση 2ml Διαλύματος 1 με την χρήση πιπέτας 100-1000ml και ακολούθησε ανάμειξη με αποστειρωμένο τρίγωνο επίστρωσης (spreader). Το εναιώρημα συλλέχθηκε με την βοήθεια πιπέτας και φιλτραρίστηκε με διηθητικό χαρτί Whatman No 54 ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υφές και υπολείμματα θρεπτικού(63).

Στην συνέχεια μέρος του εναιωρήματος φωτομετρήθηκε και όποιο δείγμα ήταν πιο πυκνό, αραιώθηκε στην επιθυμητή συγκέντρωση με την χρήση αποστειρωμένου αλατούχου διαλύματος ή θρεπτικού ανάλογα την περίπτωση.

Η διαδικασία αυτή δεν εφαρμόστηκε για την ανακαλλιέργεια των στελεχών της *C. albicans*, οι μύκητες αφού του είδους δεν σχηματίζουν σπόρια αλλά ψευδο-υφές. Για την

ανακαλλιέργεια τους, ακολουθήθηκε εμβολιασμός από ήδη υπάρχουσα καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό μέσο σε αναλογία 1:50.

2.2.2 Αντιμυκητιακή δράση μελιού

2.2.2.1 Δοκιμή μεθόδων προκειμένου να επιλεγθούν τα βέλτιστα πρωτόκολλα - Μέθοδος Διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (Well Diffusion) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης μελιού

Για την ανεύρεση των μεθόδων με την μεγαλύτερη πιστότητα, ακρίβεια και επαναληψιμότητα, αρχικά έγιναν διάφορες προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό της αντιμυκητιακής ικανότητας του μελιού αλλά και των βακτηρίων που απομονώθηκαν από αυτό.

Η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ βασίζεται στην παθητική διάχυση των δυνητικά μυκητοστατικών ή μυκητοκτόνων ουσιών του εξεταζόμενου δείγματος, ξεκινώντας από το πηγαδάκι και καλύπτοντας όλο το τρυβλίο. Σε περίπτωση ύπαρξης τέτοιας ουσίας αναμένεται δημιουργία ζώνης αναστολής γύρω από το πηγαδάκι και διαταραχή της ανάπτυξης του μύκητα.

Εναιώρημα σπορίων μύκητα ($OD_{530}=0,3-0,35$) επιστρώθηκε σε τρυβλία Petri με Plate Count Agar, με την χρήση αποστειρωμένου βαμβανοφόρου στυλεού και έπειτα με το πίσω μέρος αποστειρωμένης γυάλινης πιπέτας παστέρ δημιουργήθηκαν τρία πηγαδάκια (wells) διαμέτρου 6 mm σε κάθε τρυβλίο. Σε κάθε ένα από αυτά εναποτέθηκαν 100μl δείγματος μελιού, αντίστοιχη ποσότητα μελιού Manuka (θετικός μάρτυρας) και συνθετικού σιροπιού σακχαρώδους (αρνητικός μάρτυρας). Τα μέλια και οι μάρτυρες δοκιμάστηκαν σε συγκεντρώσεις 100%, 75%, 50% και 40% v/v. Οι αραιώσεις έγιναν με Mueller Hinton Broth. Η παρατήρηση έγινε μετά από επώαση 48 και 72 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα αποτελέσματα δεν ήταν αξιολογήσιμα οπότε η μέθοδος απορρίφθηκε.

2.2.2.2 Μέθοδος Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης - MIC (Minimum Inhibition Concentration) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης μελιού έναντι των *P. expansum*, *P. commune*, *A. niger* και *C. albicans*

Η μέθοδος βασίζεται στην χρήση διαδοχικών αραιώσεων μελιού για την εύρεση της ελάχιστης ικανής αραιώσης να αναστείλει την ανάπτυξη των μυκήτων.

Ο προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) των εξεταζόμενων μελιών πραγματοποιήθηκε σε αποστειρωμένες πλάκες πολυστυρενίου 96 θέσεων (Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Γερμανία).

Εναιώρημα σπορίων των μυκήτων *P.commune* , *P.expansum*, *A.niger* ή υγρή καλλιέργεια της *C. albicans*, (OD₅₃₀= 0,09-0,13) αραιώθηκαν σε αναλογία 50:1 σε θρεπτικό RPMI 1640 broth, w/ L-Glutamine (BioSera, Γαλλία). Τα δείγματα μελιού αραιώθηκαν επίσης με θρεπτικό μέσο RPMI σε διαδοχικές συγκεντρώσεις 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 και 1,562% (v/v). Στο πρώτο φρεάτιο αναμίχθηκε ο ίδιος όγκος μη αραιωμένου μελιού και εναιωρήματος σπορίων/καλλιέργειας (1:1), με αποτέλεσμα να προκύψει συγκέντρωση μελιού 50%. Στο δεύτερο, αναμίχθηκε 50% αραιωμένο μέλι με RPMI με τον ίδιο όγκο εναιωρήματος σπορίων/καλλιέργειας. Στα πηγαδάκια 3-6, μέρος του προηγούμενου φρεατίου αναμίχθηκε με ίσα μέρη εναιωρήματος/καλλιέργειας, με αποτέλεσμα υποδιπλάσιες αραιώσεις.

Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε RPMI και ως θετικός για τον έλεγχο της ανάπτυξης του μύκητα, RPMI το οποίο είχε εμβολιαστεί με εναιώρημα ή καλλιέργεια μύκητα. Η απόδοση κάθε μελιού συγκρίθηκε με αυτή του Manuka για αυτό υπήρξε δείγμα του σε κάθε πλάκα, ώστε να διασφαλιστούν οι ίδιες συνθήκες ανάπτυξης. Το κάθε δείγμα μελιού, όπως και το Manuka, εξετάστηκε εις τριπλούν σε όλες τις συγκεντρώσεις.

Ο υπολογισμός της ανάπτυξης και των δύο στελεχών της *C. albicans* έγινε με την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε 0 (πριν την τοποθέτηση στον κλίβανο) 24 ή 48 ώρες επώασης στους 37°C. Η οπτική πυκνότητα (OD) προσδιορίστηκε στα 530 nm χρησιμοποιώντας έναν Microplate reader ELx808 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

Για τον υπολογισμό της μεταβολής της οπτικής πυκνότητας στο κάθε πηγαδάκι υπολογίζεται η διαφορά της μέτρησης για t=24h από τη μέτρηση για t=0h ($\Delta OD_{\text{δείγμα}} = OD_{24} - OD_0$). Ως MIC προσδιορίστηκε η χαμηλότερη συγκέντρωση μελιού που οδηγεί σε 100% αναστολή της ανάπτυξης. Το ποσοστό της αναστολής της ανάπτυξης για το κάθε μέλι στο κάθε πηγαδάκι στην κάθε αραιώση προσδιορίστηκε βάσει του τύπου:

$$100\% \text{ Αναστολή} = 1 - (\Delta OD_{\text{δείγμα}} / \Delta OD_{\text{control}}) \times 100 \quad (64).$$

Όσον αφορά τους μύκητες *P.commune* , *P.expansum* και *A.niger*, όντας νηματοειδείς, η ανάπτυξη τους δεν είναι μετρήσιμη βάσει της οπτικής πυκνότητας, λόγω των δομών που σχηματίζουν. Επομένως, τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο, μετά από 72h επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

2.2.2.3 Μέθοδος Ελάχιστης Μυκητοκτόνου Συγκέντρωσης - MFC (Minimum Fungicidal Concentration) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης μελιού έναντι των στελεχών της *C. albicans*

Η ελάχιστη μυκητοκτόνος συγκέντρωση (MFC) είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση οποιουδήποτε αντιμυκητιακού παράγοντα που μπορεί να σκοτώσει τους εξεταζόμενους μύκητες. Η MFC προσδιορίστηκε με τη μεταφορά μικρής ποσότητας δείγματος που περιέχεται σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας μικροτιτλοδότησης στις οποίες υπολογίστηκε το MIC, σε πλάκες άγαρ Sabouraud με τη χρήση replicator (BoekelScientific, Pennsylvania, ΗΠΑ). Οι πλάκες επώαστηκαν στους 37°C για 24 h. Η MFC προσδιορίστηκε ως η χαμηλότερη συγκέντρωση μελιού στην οποία δεν παρατηρήθηκε μυκητιακή ανάπτυξη(65).

Η δοκιμασία αυτή έγινε μόνο στα στελέχη της *C. albicans* διότι δεν μπορεί να εφαρμοστεί στους υπόλοιπους τρεις μύκητες οι οποίοι έχουν την δυνατότητα να σχηματίζουν υφές και σπόρια που το replicator δεν μπορεί να μεταφέρει.

2.2.3 Αντιμυκητιακή δράση βακτηριακών στελεχών έναντι των μυκήτων *P. commune*, *P.expansum*, *A. niger*

2.2.3.1 Δοκιμή μεθόδων προκειμένου να επιλεγθούν τα βέλτιστα πρωτόκολλα - Δοκιμή επίστρωσης διπλής καλλιέργειας (Dual culture overlay assay) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την διερεύνηση της αντιμυκητιακής ιδιότητας των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών. Στηρίζεται στην συνύπαρξη, στο ίδιο τρυβλίο, δυο διαφορετικών θρεπτικών, το καθένα κατάλληλο για τον κάθε μικροοργανισμό, με σκοπό την παρατήρηση της αλληλεπίδρασης τους. Στερεό θρεπτικό υλικό με ποσοστό άγαρ λιγότερο από 1.5%, ονομαζόμενο soft agar, το οποίο είχε εμβολιαστεί με εναιώρημα σπορίων μύκητα, περιχύθηκε σε τρυβλία Petri “στρωμένα” με στερεό θρεπτικό με ποσοστό άγαρ στο 1.5% . Όταν στερεοποιήθηκε το soft agar, μεμονωμένες βακτηριακές αποικίες από στερεή καλλιέργεια τοποθετήθηκαν με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα στην επιφάνεια του εις τριπλούν (triplicates).

Οι αρχικές δοκιμές αφορούσαν την συγκεκριμενοποίηση των παραμέτρων που απέδιδαν τα βέλτιστα διαχειρίσιμα αποτελέσματα.

Ως προς τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν, στερεή βάση αποτέλεσε το Potato Dextrose Agar, ιδανικό για την ανάπτυξη μυκήτων και για soft agar στην επιφάνεια χρησιμοποιήθηκε το Trypton Soy Agar, κατάλληλο για ανάπτυξη βακτηρίων και μυκήτων, για το οποίο

δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις 0,85%, 0,92% και 0,95% w/v άγαρ και επιλέχθηκε η μεγαλύτερη λόγω ευκολίας χειρισμού και καλύτερων αποτελεσμάτων.

Όσον αφορά την πυκνότητα του εναιωρήματος σπορίων, αρχικά 700 μl εναιωρήματος Οπτικής Πυκνότητας (530 nm) 0,1-0,15 αραιώθηκαν σε 5 ml αλατούχου διαλύματος και στην συνέχεια, 1 ml από αυτό το διάλυμα αναμείχθηκε με 100 ml από το soft agar. Η ανάπτυξη του μύκητα δεν ήταν επαρκής, οπότε το βήμα της αραιώσης παραλήφθηκε. Συνεπώς, 1 ml εναιωρήματος Οπτικής Πυκνότητας (530 nm) 0,1-0,15 εμβολιάστηκε σε 100 ml μέσου.

Αναφορικά με τον χρόνο και την θερμοκρασία επώασης, έγιναν δοκιμές τόσο σε επωαστικό κλίβανο στους 33 και 37°C, όσο και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25°C) με χρόνο παρατήρησης έως τις 72 ώρες.

Μια άλλη παράμετρος είναι η ταυτόχρονη ή ετεροχρονισμένη ανάπτυξη των μικροοργανισμών στο τρυβλίο. Οι άνωθι δοκιμές έγιναν με ταυτόχρονη έναρξη ανάπτυξης τους. Διεξήχθη ωστόσο και δοκιμή επίστρωσης διπλής καλλιέργειας, με βάση βακτηριακές αποικίες 24 ωρών και σπόρια μύκητα στο soft agar, όπως περιγράφεται από τους Kropinski et al (66).

Προετοιμάστηκε στερεό θρεπτικό υλικό Potato Dextrose με 1.12% άγαρ στο οποίο αναμείχθηκε εναιώρημα σπορίων μύκητα OD=0,142 και στην συνέχεια περιχύθηκε σε τρυβλία Petri, τα οποία περιείχαν βακτηριακές καλλιέργειες 24ωρών. Τα τρυβλία αφέθηκαν να επωαστούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 72h.

2.2.3.2 Δοκιμή ανταγωνισμού (antagonism assay) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών έναντι των μυκήτων *P. commune*, *P. expansum*, *A. niger*

Η δοκιμασία ανταγωνισμού με τη μέθοδο ταυτόχρονης αναστολής συντελεί στην αξιολόγηση της ικανότητας ενός βακτηρίου να αναστέλλει την ανάπτυξη ενός μύκητα καθώς οι δύο μικροοργανισμοί αναπτύσσονται μαζί επιτρέποντας τον ανταγωνιστικό αποκλεισμό (67).

Στην μέθοδο αυτήν τα δυνητικά μυκητοστατικά/μυκητοκτόνα βακτηριακά στελέχη καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία Petri με Plate Count Agar για 24 ώρες πριν την δοκιμή. Εναιώρημα σπορίων μύκητα (OD₅₃₀=0,3-0,35) επιστρώθηκε σε τρυβλία Petri με Plate Count Agar, με την χρήση αποστειρωμένου βαμβανοφόρου στυλεού. Μετά το πέρας 5 λεπτών κάθε τρυβλίο μολύνθηκε εις τριπλούν με μεμονωμένες βακτηριακές αποικίες από τις στερεές καλλιέργειες, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες. Τα τρυβλία αφέθηκαν να επωαστούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C). Η παρατήρηση έγινε στις 48 και 72 ώρες για τους μύκητες *P. commune*, *P. expansum*, ενώ για τον *A. niger* στις 48, 72 και 120 ώρες.

Σχετικά με τα δύο στελέχη της *C. albicans*, η ίδια μέθοδος δεν απέδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα οπότε δεν χρησιμοποιήθηκε.

2.2.4 Αντιμυκητιακή δράσης βακτηριακών στελεχών έναντι των μυκήτων *C. albicans* M10/20 και *C.albicans* M351/19

2.2.4.1 Δοκιμή μεθόδων προκειμένου να επιλεγθούν τα βέλτιστα πρωτόκολλα - Μέθοδος Διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (Well Diffusion) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών έναντι της *C. albicans*

Στην συγκεκριμένη δοκιμασία ελέγχθηκε η αντιμυκητιακή δράση που εμφανίζει το υπερκείμενο βακτηριακής καλλιέργειας και όχι η καλλιέργεια αυτή καθαυτή. Αναλυτικότερα, καθώς οι βακτηριακές καλλιέργειες αφέθηκαν να επωαστούν για πάνω από 24 ώρες πριν την φυγοκέντρηση, σκοπός ήταν η διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης και η πιθανότητα, αυτή να οφείλεται σε προϊόντα παραγόμενα από τα βακτήρια κατά την στατική φάση ανάπτυξης.

Προκειμένου να βελτιστοποιηθούν οι παράμετροι του πειράματος έγιναν δοκιμές όπου το υπερκείμενο πάρθηκε έπειτα από διαφορετικές συνθήκες φυγοκέντρησης.

Βακτηριακές καλλιέργειες σε Mueller Hinton Broth επώαστηκαν για 48 και 72 ώρες στους 37°C και ακολούθως φυγοκεντρήθηκαν αρχικά στις 8000rpm για 3 λεπτά, έπειτα στις 13500rpm για 20 και τέλος με επαναληπτική φυγοκέντρηση του υπερκειμένου στις 13500rpm για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και μέρος του διηθήθηκε με φίλτρο σύριγγας 0.45, έτσι ώστε να απομακρυνθούν τυχόν κυτταρικά υπολείμματα.

Στην συνέχεια αφού σε τρυβλίο με Plate Count Agar επιστρώθηκε υγρή καλλιέργεια του μύκητα ($OD_{600}=0,1$) με αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στυλεό, με την χρήση της ανάποδης μεριάς αποστειρωμένης γυάλινης πιπέτας παστέρ δημιουργήθηκαν τρία πηγαδάκια ανά τρυβλίο. Σε κάθε ένα από αυτά εναποτέθηκαν 100μl υπερκειμένου φιλτραρισμένου και μη. Η παρατήρηση έγινε μετά από επώαση στους 37°C για 24 ώρες.

2.2.5 Θερμική επεξεργασία υπερκειμένου βακτηριακής καλλιέργειας

Με σκοπό την διερεύνηση της ύπαρξης θερμικής αντίστασης της αντιμυκητιακής ιδιότητας βακτηριακού υπερκειμένου, θερμάνθηκε στους 95°C για 10 λεπτά (68).

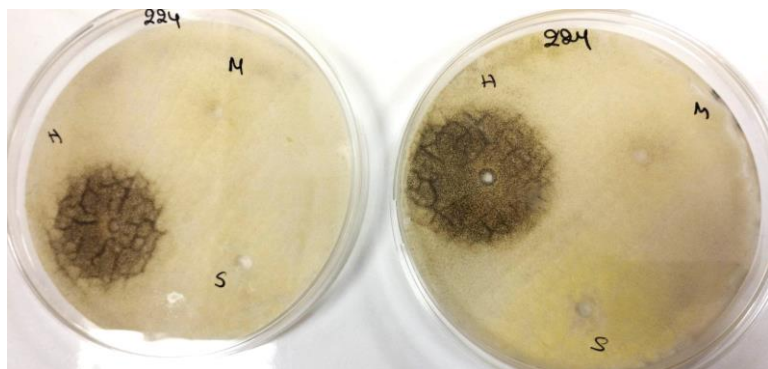
3. Αποτελέσματα

3.1 Αποτελέσματα αντιμυκητιακής δράσης μελιού

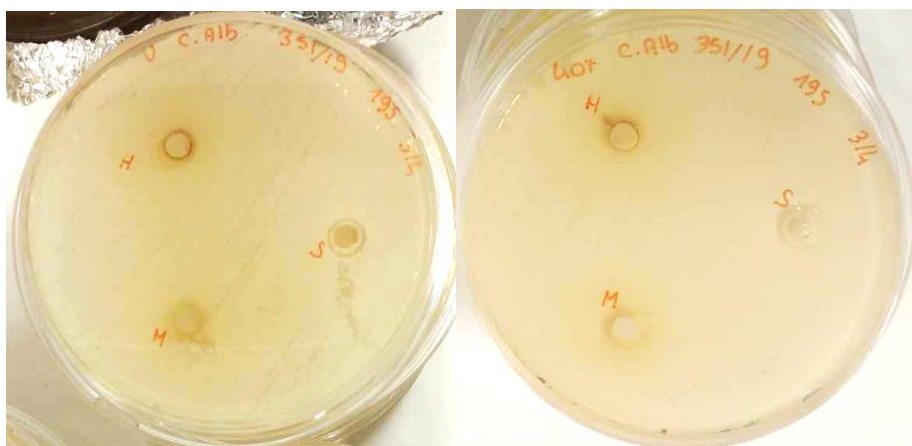
3.1.1 Αποτελέσματα δοκιμαστικής μεθόδου Διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (Well Diffusion) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης μελιού

Τα δείγματα μελιού 218, 224, 195, δοκιμάστηκαν έναντι των μυκήτων *P. commune*, *A. niger* και *C. albicans* M10/20 και M351/19, σε μη αραιωμένη μορφή και σε συγκεντρώσεις 75%, 50% και 40% v/v. Η αραιώση του μελιού συμβάλλει στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου αφού η παρουσία νερού επάγει την λειτουργία της οξειδάσης της γλυκόζης. Ωστόσο τα αποτελέσματα δεν ήταν τα αναμενόμενα, διότι δεν παρατηρήθηκε ζώνη αναστολής σε καμία συγκέντρωση, ούτε στα εξεταζόμενα δείγματα, ούτε στο μέλι Manuka, παρόλο που αποδεδειγμένα παρουσιάζει δράση έναντι αυτών των μυκήτων (69).

Παράλληλα στη περίπτωση του *A.niger* φάνηκε η παρουσία του των δειγμάτων μελιού να προκάλεσε την σποριοποίηση του μύκητα.



Εικόνα 4: Εξέταση του δείγματος 224, μη αραιωμένου (αριστερά) και συγκέντρωσης 50% (δεξιά) έναντι του *A. niger* με την μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια. Όπου H, το δείγμα 224, M το μέλι Manuka (θετικός μάρτυρας) και S το συνθετικό σιρόπι σακχαρόζης (αρνητικός μάρτυρας).



Εικόνα 5: Εξέταση του δείγματος 195, μη αραιωμένου (αριστερά) και συγκέντρωσης 40% (δεξιά) έναντι της *C. albicans* M351/19 με την μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια. Όπου H, δείγμα 195, M το μέλι Manuka (θετικός μάρτυρας) και S το συνθετικό σιρόπι σακχαρόζης (αρνητικός μάρτυρας).

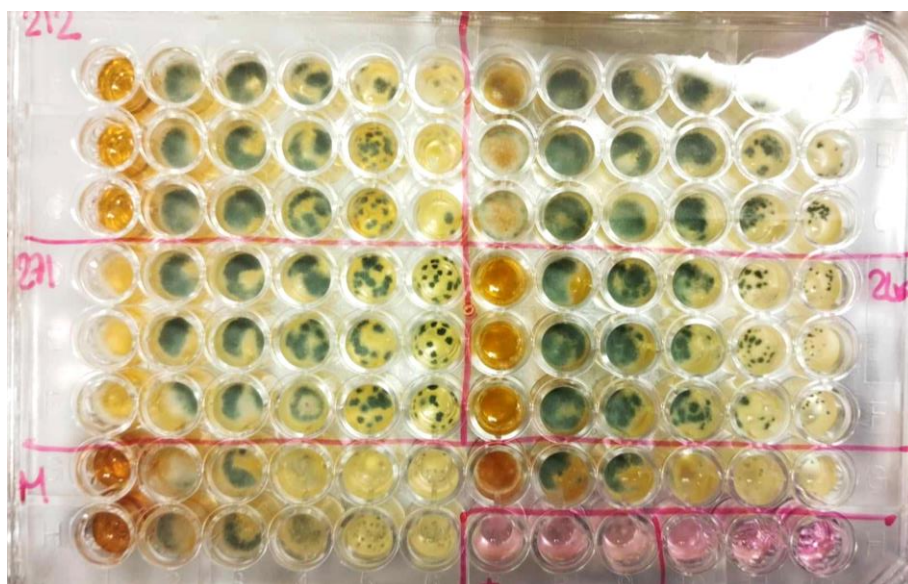
Όπως διαφαίνεται τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος δεν ήταν αξιοποιήσιμα.

3.1.2 Αποτελέσματα Μεθόδου Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης - MIC (Minimum Inhibition Concentration) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης μελιού έναντι των *P. expansum*, *P. commune*, *A. niger* και *C. albicans*

Με την μέθοδο αυτή προσδιορίστηκε η ελάχιστη συγκέντρωση του μελιού που απαιτείται για την αναστολή της ανάπτυξης των μυκήτων και *P. commune*, *P. expansum*, *A. niger*, *C. albicans* 10/20 και *C. albicans* 351/19. Από τα δεκαέξι δείγματα μελιών που ελέγχθηκαν, τα επτά ήταν μέλια Καστανιάς και τα εννέα Ερείκης. Η δράση τους συγκρίθηκε με αυτήν του μελιού Manuka.

3.1.2.1 Αποτελέσματα των *P. commune*, *P. expansum*, *A. niger*

Οι μύκητες αλλοίωσης τροφίμων επωάστηκαν για 72 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και η ανάπτυξη τους μελετήθηκε υπό το ανάστροφο μικροσκόπιο. Στον πίνακα που ακολουθεί παρατίθενται συγκεντρωτικά οι ελάχιστες συγκεντρώσεις κάθε μελιού που ήταν ικανές να αναστείλουν την ανάπτυξη των μυκήτων *P. commune*, *P. expansum*, *A. niger*.



Εικόνα 6: Πλάκα καλλιέργειας πολυστυρενίου 96 θέσεων στην οποία πραγματοποιήθηκε δοκιμή MIC για τα δείγματα 212, 187, 271, 240 και Manuka έναντι του μύκητα *P.expansum* μετά το πέρας 72 ωρών. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν, σε διαδοχικά μειούμενες συγκεντρώσεις από 50%v/v (αριστερά της κάθε εξάδας) έως 1,56%v/v (δεξιά).

Στην εικόνα 6, το πράσινο φιλμ που καλύπτει τα πηγαδάκια είναι υφές και σπόρια του μύκητα που καθιστούν έκδηλη την ανάπτυξη του, ενώ στα διαυγή πηγαδάκια λαμβάνει χώρα πλήρης αναστολή της ανάπτυξης του. Παρατηρείται λοιπόν, ότι τα δείγματα 212, 240 και το μέλι Manuka εμποδίζουν την ανάπτυξη του μύκητα στην συγκέντρωση 50%v/v ενώ τα 271 και 187 δεν εμφανίζουν αναστολή, ευρήματα τα οποία επιβεβαιώνονται με ανάστροφη οπτική μικροσκοπία.

Πίνακας 5: Ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων ελληνικών μελιών έναντι των μυκήτων *P. commune*, *P.expansum*, *A. niger*. Τα δείγματα που εμφάνισαν τις καλύτερες αποδόσεις είναι σημειωμένα με έντονη γραμματοσειρά.

Δείγμα Μελιού	Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) v/v		
	<i>P. commune</i>	<i>P.expansum</i>	<i>A. niger</i>
Manuka	50%	50%	50%
200 Κ Βέροια - Ημαθία 7/20	50%	50%	50%

240 Κ Χανιά 8/20	>50%	50%	>50%
271 Κ Φλώρινα 7/21	>50%	>50%	50%
187 Κ Φωκίδα 2/20	50%	>50%	50%
267 Κ Σέρρες 7/21	50%	50%	50%
210 Κ Πέλλα 8/20	50%	50%	50%
212 Κ Αγ. Όρος 7/20	50%	50%	50%
229 Ε Αντίπαρος 12/20	50%	50%	50%
183 Ε Κάλαμος 11/20	50%	50%	>50%
244 Ε Κρήτη 8/20	50%	50%	50%
243 Ε Κρήτη 10/20	50%	50%	50%
218 Ε Χανιά 12/20	50%	50%	>50%
269 Ε Καβάλα 4/21	50%	50%	>50%
241 Ε Χανιά 10/20	50%	50%	50%
195 Ε Ίος 11/20	50%	50%	>50%
233 Ε Άνδρος 1/21	50%	50%	>50%

Σύμφωνα με τον Πίνακα 5, παρατηρείται ότι σε όλους τους μύκητες η μικρότερη δυνατή τιμή MIC είναι 50% v/v. Συνολικά μεγαλύτερη δράση εμφάνισαν τα δείγματα 200, 267, 210, 212, 229, 244, 243 και 241, των οποίων η ελάχιστη δυνατή συγκέντρωση αναστολής ήταν 50% v/v για την ανάπτυξη και των τριών μυκήτων. Από αυτά τα τέσσερα πρώτα έχουν βοτανική προέλευση καστανιά και τα τέσσερα επόμενα ερείκη. Όμοια αποτελέσματα επέφερε και το μέλι Manuka.

3.1.2.2 Αποτελέσματα των *C. albicans* 10/20 και *C. albicans* 351/19

Τα δύο στελέχη της *C. albicans* επωάστηκαν για 24 και 48 ώρες στις πλάκες μικροτιτλοδότησης και η ανάπτυξη τους υπολογίστηκε από την οπτική πυκνότητα που είχε το κάθε φρεάτιο πριν και μετά την επώαση. Στον πίνακα αναφέρονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα και για τους δύο μύκητες.

Πίνακας 6: Ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων ελληνικών μελιών έναντι των μυκήτων *C. albicans* 10/20 και *C. albicans* 351/19. Τα δείγματα που εμφάνισαν τις καλύτερες αποδόσεις είναι σημασμένα με έντονη γραμματοσειρά. Η τιμή 25-50% v/v αναφέρεται σε περιπτώσεις που η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση βρίσκεται ενδιάμεσα στο 50 και 25% v/v διότι το ποσοστό αναστολής της συγκέντρωσης 25%v/v ήταν πολύ αυξημένο αλλά όχι 100% όπως στην συγκέντρωση 50% v/v.

Δείγμα Μελιού	Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) v/v			
	<i>C. albicans</i> 10/20		<i>C. albicans</i> 351/19	
	24h	48h	24h	48h
Manuka	25%	25-50%	25%	25-50%
200 Κ Βέροια - Ημαθία 7/20	50%	>=50%	25-50%	50%
240 Κ Χανιά 8/20	25%	25-50%	50%	50%
271 Κ Φλώρινα 7/21	25-50%	>50%	50%	50%
187 Κ Φωκίδα 2/20	25-50%	>50%	50%	50%
267 Κ Σέρρες 7/21	25-50%	50%	25-50%	>=50%
210 Κ Πέλλα 8/20	25-50%	50%	25%	50%
212 Κ Αγ. Όρος 7/20	25-50%	50%	50%	50%

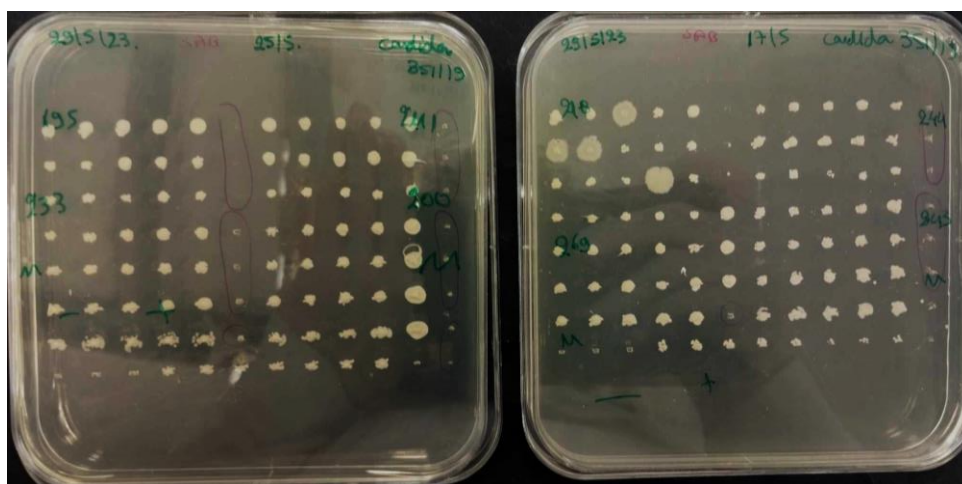
229 Ε Αντίπαρος 12/20	25%	50%	25%	50%
183 Ε Κάλαμος 11/20	25%	50%	25%	50%
244 Ε Κρήτη 8/20	50%	50%	25%	50%
243 Ε Κρήτη 10/20	50%	50%	50%	50%
218 Ε Χανιά 12/20	50%	50%	50%	>=50%
269 Ε Καβάλα 4/21	50%	>=50%	25-50%	50%
241 Ε Χανιά 10/20	50%	>=50%	50%	50%
195 Ε Ίος 11/20	25%	25-50%	25%	25-50%
233 Ε Άνδρος 1/21	25%	50%	50%	50%

Όπως παρατηρείται στον πίνακα 6, η βέλτιστη τιμή MIC για αμφοτέρους τους μύκητες στις 24 ώρες επώασης είναι 25%v/v ενώ στις 48 ώρες βρίσκεται ενδιάμεσα στο 25 και το 50%v/v. Τα μόνα μέλια που εμφάνισαν αυτήν την τιμή MIC ήταν το Manuka και το δείγμα 195, ένα μέλι ερείκης από το νησί της Ίου. Άλλα δείγματα με σημαντική δράση αποτελούν τα 229 και 183, τα οποία είναι συγκριτικά λιγότερο δραστικά μετά το πέρας των 24 ωρών. Επίσης τα δείγματα 233 και 240, εμφάνισαν αποτελέσματα όμοια του Manuka μόνο για την *C. albicans* 10/20, ενώ τα 210, 244 μόνο για την *C. albicans* 351/19. Συνολικά, από τα δείγματα που διακρίθηκαν τα δύο (240, 210) έχουν βοτανική προέλευση καστανιάς και τα υπόλοιπα πέντε (195, 229, 183, 244, 233) ήταν ερεικόμελα.

Σε γενικές γραμμές, το κάθε δείγμα μελιού εμφάνιζε παρόμοια δράση στο κάθε στέλεχος. Παράλληλα, παρατηρήθηκε πως με το πέρας του χρόνου οι αντιμυκητιακές ικανότητες των μελιών εξασθένησαν.

3.1.3 Μέθοδος Ελάχιστης Μυκητοκτόνου Συγκέντρωσης - MFC (Minimum Fungicidal Concentration) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης μελιού έναντι των στελεχών της *C. albicans*

Η μέθοδος εφαρμόστηκε μόνο στα στελέχη της *C. albicans* και στόχος της ήταν η διερεύνηση της μυκητοκτόνου δράσης των δειγμάτων μελιού. Λαμβάνοντας μια μικρή ποσότητα από κάθε πηγαδάκι της δοκιμασίας Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης - MIC, και εναποθέτοντας την σε θρεπτικό κατάλληλο για την ανάπτυξη του μύκητα, έγινε προσδιορισμός της μυκητοκτόνου δράσης των μελιών σε όποιο πηγαδάκι δεν παρατηρήθηκε καθόλου μυκητιακή ανάπτυξη.



Εικόνα 7: Δοκιμή MFC στα δείγματα 195, 233, 241, 200 (αριστερά) και 218, 244, 243, 269 (δεξιά) έναντι της *C. albicans* 351/19. Στην εικόνα απεικονίζεται η κάτω όψη του τρυβλίου οπότε στα αριστερά κάθε εξάδα βρίσκεται η συγκέντρωση 1,56% και στα δεξιά η συγκέντρωση 50%v/v.

Όπως διακρίνεται στην εικόνα 7, ο μύκητας *C. albicans* 351/19 αφού ήρθε σε επαφή με τα δείγματα 195, 233, 241, 200, 218, 244, 243 σε συγκέντρωση 50% v/v, πλέον αδυνατούσε να αναπτυχθεί στο θρεπτικό υλικό, φανερώνοντας την μυκητοκτόνο ικανότητα αυτών των δειγμάτων.

Πίνακας 7: Ελάχιστη μυκητοκτόνος συγκέντρωση των δειγμάτων ελληνικών μελιών έναντι των μυκήτων *C. albicans* 10/20 και *C. albicans* 351/19. Τα δείγματα που εμφάνισαν τις καλύτερες δράσεις είναι σημειασμένα με έντονη γραμματοσειρά.

	Ελάχιστη μυκητοκτόνος συγκέντρωση (MFC) v/v
--	---

Δείγμα Μελιού	<i>C. albicans</i> 10/20	<i>C. albicans</i> 351/19
Manuka	≥50%	≥50%
200 Κ Βέροια - Ημαθία 7/20	>50%	50%
240 Κ Χανιά 8/20	>50%	>50%
271 Κ Φλώρινα 7/21	>50%	>50%
187 Κ Φωκίδα 2/20	>50%	>50%
267 Κ Σέρρες 7/21	50%	>50%
210 Κ Πέλλα 8/20	>50%	50%
212 Κ Αγ. Όρος 7/20	>50%	>50%
229 Ε Αντίπαρος 12/20	50%	50%
183 Ε Κάλαμος 11/20	>50%	50%
244 Ε Κρήτη 8/20	50%	50%
243 Ε Κρήτη 10/20	50%	50%
218 Ε Χανιά 12/20	50%	>50%
269 Ε Καβάλα 4/21	>50%	>50%
241 Ε Χανιά 10/20	50%	50%
195 Ε Ίος 11/20	50%	50%
233 Ε Άνδρος 1/21	50%	50%

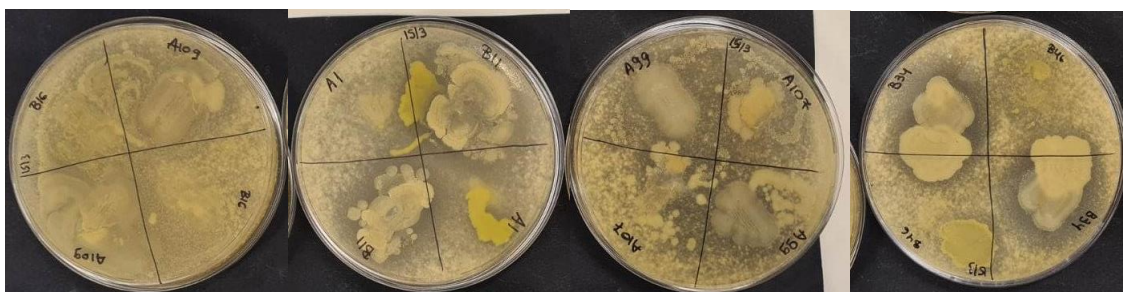
Εξετάζοντας τον πίνακα 7, διαφαίνεται πως η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία τα δείγματα ήταν ικανά να παρουσιάσουν μυκητοκτόνο δράση είναι 50%v/v. Στην συγκέντρωση αυτή, όμοια και στα δύο στελέχη της *C. albicans* ανταποκρίθηκαν έξι δείγματα, 229, 244, 243, 241, 195, 233, όλα ερεϊκόμελα. Συνολικά, δραστικά έναντι στο κάθε στέλεχος ξεχωριστά ήταν οκτώ από τα δεκαέξι δείγματα, η πλειοψηφία των οποίων αφορούσε μέλια ερείκης. Όσον αφορά την απόδοση του μελιού Manuka, εξετάστηκε πολλές φορές καθότι βρισκόταν σε κάθε πλάκα 96 θέσεων ως μέτρο σύγκρισης, και υπολογίστηκε ελαφρώς μεγαλύτερη από 50%.

3.2 Αποτελέσματα Αντιμυκητιακής δράσης βακτηριακών στελεχών έναντι των μυκήτων

P. commune*, *P.expansum*, *A. niger

3.2.1 Αποτελέσματα δοκιμαστικής Δοκιμής επίστρωσης διπλής καλλιέργειας (Dual culture overlay assay) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών

Σκοπός αυτής της μεθόδου ήταν η διερεύνηση της αντιμυκητιακής δραστηριότητας των βακτηριακών στελεχών μέσω της εύκολης διάχυσης των προϊόντων τους στο soft agar. Παρότι το πείραμα επαναλήφθηκε με διαφορετικές συστάσεις soft agar, με διαφορετικές συγκεντρώσεις μυκήτων, σε διαφορετικές συνθήκες επώασης, δεν ήταν δυνατή η εξαγωγή κάποιου σαφούς συμπεράσματος. Από όλες τις δοκιμές, καλύτερη εικόνα απέδωσε η δοκιμή σε βακτηριακές αποικίες 24 ωρών, κατά την οποία παρατηρούνται ζώνες αναστολής, ωστόσο η μέθοδος ήταν χρονοβόρα και όπως φαίνεται και στην εικόνα 8, τα αποτελέσματα δεν είναι απολύτως ξεκάθαρα.



Εικόνα 8: Δοκιμή επίστρωσης διπλής καλλιέργειας έναντι του μύκητα *P. commune*. Σε κάθε τρυβλίο δοκιμάστηκαν δύο βακτηριακά στελέχη. Τα ζεύγη από αριστερά προς τα δεξιά είναι B16-A109, A1-B11, A99-A107, B34-B46.

3.2.2 Αποτελέσματα Δοκιμής ανταγωνισμού (antagonism assay) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών έναντι των μυκήτων *P. commune*, *P. expansum*, *A. niger*

Ο προσδιορισμός αντιμυκητιακής δράσης των βακτηριακών στελεχών έγινε με παράλληλη ανάπτυξη μυκήτων και βακτηριακών στελεχών στο ίδιο θρεπτικό, όπως περιεγράφηκε. Η αντιμυκητιακή ικανότητα κάθε βακτηρίου χαρακτηρίστηκε από την εμφάνιση ‘ζωνών αναστολής’ στο τρυβλίο, δηλαδή σχεδόν διαυγών ζωνών που περιβάλλουν και διαχωρίζουν την βακτηριακή αποικία από τον αναπτυσσόμενο μύκητα. Σε σχέση αναλογίας με την ικανότητα αυτή βρίσκονται η καθαρότητα καθώς και το μέγεθος της ζώνης, χαρακτηριστικά τα οποία αποτέλεσαν βάση για τον διαχωρισμό των αποτελεσμάτων σε κλίμακα αύξουσας απόδοσης ξεκινώντας από ‘-’ ως παντελής έλλειψη αντιμυκητιακής δράσης, σε ‘+’, ‘++’, ‘+++’, ‘++++’ και ‘+++++’.

3.2.2.1 Αποτελέσματα έναντι των *P. commune*, *P. expansum*

Η παρατήρηση για τους δύο μύκητες του γένους *Penicillium* έγινε στις 48 και 72 ώρες επώασης, χωρίς διακριτή διαφορά με την πάροδο του χρόνου. Όσον αφορά τον *P. commune*, από τα 48 βακτηριακά στελέχη που ελέγχθηκαν, τα 13 (A20, A28, A138, A163, B16, B116, A23, A2, A15, A31, B21, B89, B11) κατάφεραν να αναστείλουν την ανάπτυξη του, με βέλτιστη απόδοση το “+++”. Ο *P. expansum* αποδείχθηκε ευάλωτος στην δράση 27 βακτηριακών στελεχών (A57, A146, B43, A109, A46, B34, B46, B32, B69, A5, A9, A28, A138, A99, A31, B7, B16, B89, A20, A23, B93, A15, A163, B21, B120, B11, A2) από τα 48 βακτήρια με εύρος απόδοσης από ‘+’ έως ‘+++++’. Τα συνολικά αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 8: Κατάταξη της αντιμυκητιακής δράσης των αναγραφόμενων βακτηριακών στελεχών έναντι στους μύκητες *P. commune*, *P. expansum*, με την δοκιμασία ανταγωνισμού.

Μύκητες/ Βακτήρια	<i>P. commune</i>	<i>P. expansum</i>
A1	-	-
A2	+++	+++++
A15	+++	++++

Μύκητες/ Βακτήρια	<i>P. commune</i>	<i>P. expansum</i>
A28	++	++
A46	-	+
B34	-	+

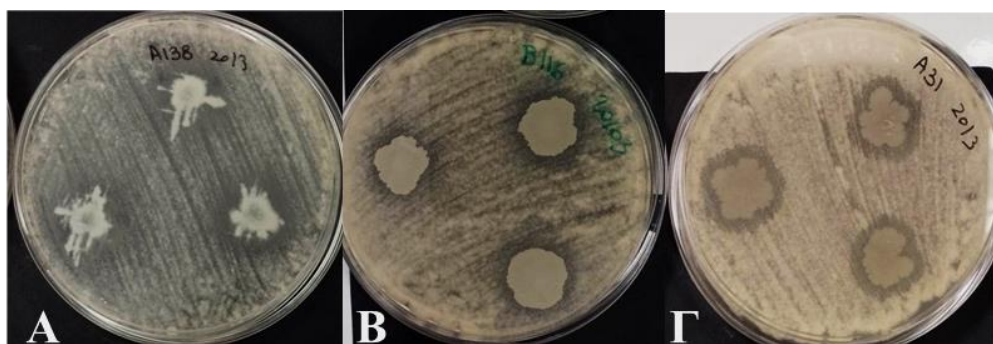
A16	-	-
A31	+++	+++
A57	-	+
A146	-	+
A163	+	++++
B7	-	+++
B16	+	+++
B21	+++	++++
B26	-	-
B31	-	-
B43	-	+
B89	++	+++
B120	-	++++
A5	-	++
A9	-	++
A10	-	-
A14	-	-
A20	++	+++
A109	-	+
B11	+++	++++

B116	+	-
A39	-	-
A79	-	-
B46	-	+
A107	-	-
B110	-	-
A23	+	+++
A90	-	-
A138	++	++
A25	-	-
A84	-	-
A95	-	-
A99	-	++
B60	-	-
B32	-	+
B93	-	+++
B69	-	+
2H	-	-
7C	-	-
6C	-	-

A7	-	-
----	---	---

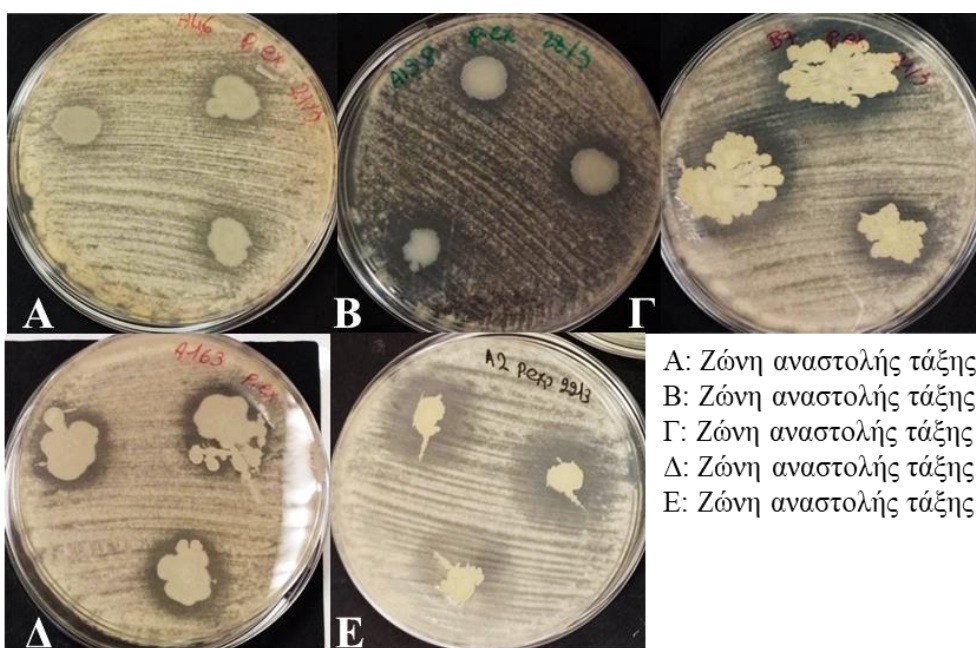
12B	-	-
-----	---	---

Όπως φαίνεται στις εικόνες 9 και 10, η βαθμολογία αποδόθηκε σε κάθε βακτήριο ανάλογα με την ζώνη αναστολής που εμφανίστηκε γύρω τους.



A: Ζώνη αναστολής τάξης ‘+’
B: Ζώνη αναστολής τάξης ‘++’
Γ: Ζώνη αναστολής τάξης ‘+++’

Εικόνα 9: Δοκιμασία ανταγωνισμού των βακτηρίων A138 (A), B116(B) και A31(Γ) έναντι του μύκητα *P. commune*. Γύρω από τις βακτηριακές αποικίες διαφαίνονται οι ζώνες αναστολής της ανάπτυξης του μύκητα.



A: Ζώνη αναστολής τάξης ‘+’
B: Ζώνη αναστολής τάξης ‘++’
Γ: Ζώνη αναστολής τάξης ‘+++’
Δ: Ζώνη αναστολής τάξης ‘++++’
Ε: Ζώνη αναστολής τάξης ‘+++++’

Εικόνα 10: Δοκιμασία ανταγωνισμού των βακτηρίων A46(A), A138(B), B7(Γ), A163(Δ), A2(E) έναντι του μύκητα *P. expansum*. Γύρω από τις βακτηριακές αποικίες φαίνονται οι ζώνες αναστολής της ανάπτυξης του μύκητα.

Το στέλεχος A2, *B. pumilus*, έδειξε σημαντική ανασταλτική δράση έναντι του *P. expansum*, όπως φαίνεται από την μεγάλη ζώνη αναστολής στην εικόνα 10Ε.

3.2.2.2 Αποτελέσματα έναντι του *A. niger*

Η παρατήρηση διεξήχθη σε διάστημα 120 ωρών το οποίο καθορίστηκε από την ανάπτυξη του μύκητα *A. niger* στις συνθήκες του πειράματος. Τα αποτελέσματα στις 48 και 72 και 120 ώρες επώασης εκδήλωσαν κάποιες παρατηρούμενες διαφορές στην αντιμυκητιακή δράση. Από τα 48 βακτηριακά στελέχη που εξετάστηκαν, βρέθηκαν δραστικά τα 31. Όπως φαίνεται στον πίνακα 9, τα βακτήρια A146, B7, B16, B26, B120, B46, A23 είχαν καλύτερη δράση στα αρχικά στάδια ανάπτυξης τους (48h), άλλα όπως τα A2, A15, B89, A20, A28 εμφάνισαν ζενίθ στις 72 ώρες ενώ κάποια, A1, A16, A109, B34, A90, A138, A99, B69 δρούσαν αποτελεσματικότερα στις 120 ώρες.

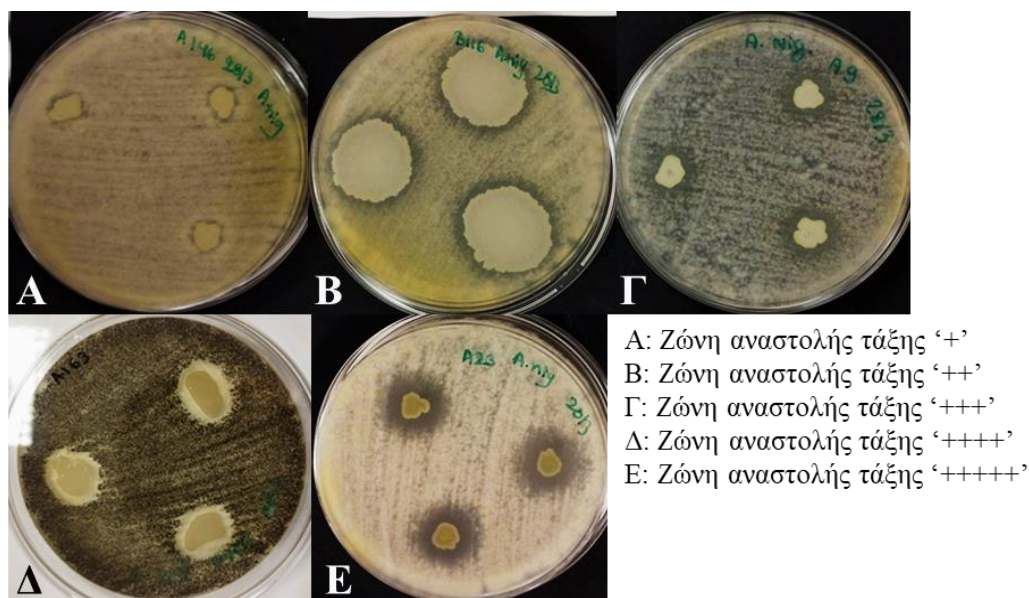
Πίνακας 9: Κατάταξη της αντιμυκητιακής δράσης των αναγραφόμενων βακτηριακών στελεχών ενάντια στον μύκητα *A. niger*, με την δοκιμασία ανταγωνισμού. Οι τιμές που αναγράφονται με έντονη γραμματοσειρά αποτελούν την καλύτερη απόδοση του κάθε βακτηρίου στο διάστημα παρατήρησης.

Μύκητες/ Βακτήρια	<i>A. niger</i>		
	48h	72h	120h
A1	+	+	+++
A2	++	+++	+++
A15	+++	++++	+++
A16	+	++	+++
A31	+++	+++	+++
A57	-	+	-
A146	+	+	-

Μύκητες/ Βακτήρια	<i>A. niger</i>		
	48h	72h	120h
A28	++	+++	+++
A46	+	+	+
B34	++	+++	++++
B116	++	++	++
A39	-	-	-
A79	-	-	-
B46	+	+	-

A163	++++	++++	++++
B7	+++	+++	+
B16	++	++	+
B21	+++	+++	+++
B26	+	+	-
B31	+	+	+
B43	-	-	-
B89	+	+++	+
B120	++	++	+
A5	+++	++++	++++
A9	+++	+++	+++
A10	-	-	-
A14	-	-	-
A20	+++	++++	++
A109	+	-	++
B11	++++	++++	++++
A7	-	-	-

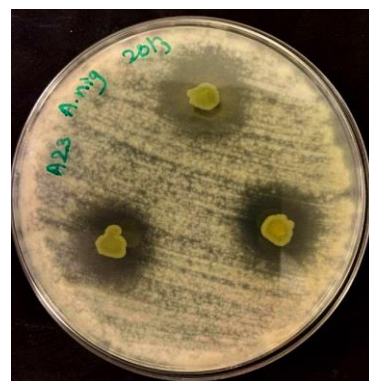
A107	-	-	-
B110	-	-	-
A23	+++++	+++++	+++
A90	+	+	++
A138	+	+	+++
A25	-	-	-
A84	-	-	-
A95	-	-	-
A99	++	++	+++
B60	+	+	+
B32	+++	++	++
B93	-	-	-
B69	+	+	+++
2H	-	-	-
7C	-	-	-
6C	-	-	-
12B	-	-	-



Εικόνα 11: Δοκιμασία ανταγωνισμού των βακτηρίων A146(A), B116(B), A9(Γ), A163(Δ), A23(E) έναντι του μύκητα *A. niger*. Γύρω από τις βακτηριακές αποικίες διαφαίνονται οι ζώνες αναστολής της ανάπτυξης του μύκητα. Στις φωτογραφίες τα βακτήρια απεικονίζονται στις βέλτιστες αποδόσεις τους.

Μεγάλο ενδιαφέρον προκάλεσε η αλληλεπίδραση του μύκητα με το βακτήριο A23, *Pseudomonas fulva*, η οποία οδήγησε σε εξαιρετικά σημαντική αναστολή της μυκητιακής ανάπτυξης και στην απόδοση ενός κυανοπράσινου χρώματος στις βακτηριακές αποικίες (Εικόνα 12).

Εικόνα 12: Αλληλεπίδραση του βακτηριακού στελέχους A23 - *Pseudomonas fulva* με τον μύκητα *Aspergillus niger*



3.2.2.3 Βακτήρια που παρουσιάζουν αντιμυκητιακή δράση έναντι και των τριών ανωτέρω μυκήτων (*A. niger*, *P. commune*, *P. expansum*)

Από την δοκιμασία ανταγωνισμού για τους μύκητες αλλοίωσης τροφίμων αναδείχθηκαν 11 βακτηριακά στελέχη που επέφεραν ανασταλτικά αποτελέσματα στην ανάπτυξη και των τριών μυκήτων. Τα δέκα από τα έντεκα στελέχη είναι γένους *Bacillus*, ενώ το εναπομείναν ήταν η *Pseudomonas fulva*.

Πίνακας 10: Βακτήρια που παρουσίασαν αντιμυκητιακή δράση έναντι και των μυκήτων *A. niger*, *P. commune*, *P. expansum*

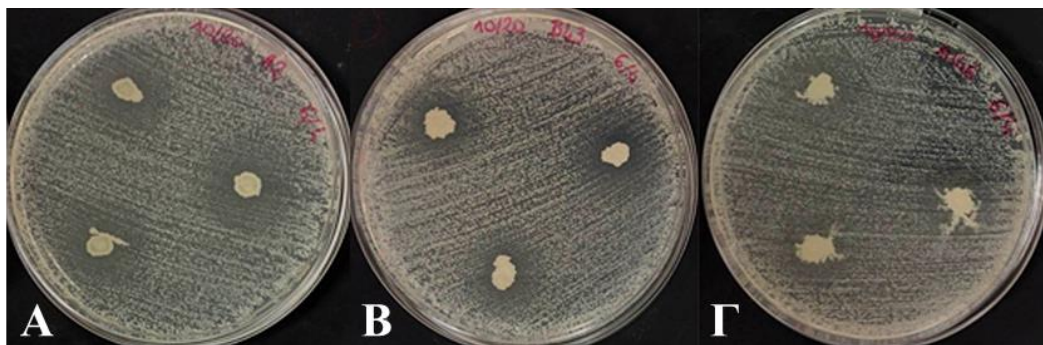
A2, A15	<i>B. pumilus</i>
A31	<i>Bacillus sp. (B. aerius/B. altitudinis/B. aerophilus/B. stratosphericus)</i>
A163	<i>B. licheniformis</i>
B16, B21, B89	<i>B. safensis</i>
A20	<i>B. subtilis</i>
B11	<i>Bacillus sp. (B. subtilis subsp. Inaquosorum/B. nakamurai/B. mojavensis/B. halotolerans)</i>
A28	<i>B. paramycoides</i>
A23	<i>P. fulva</i>

3.3 Αποτελέσματα Αντιμυκητιακής δράσης βακτηριακών στελεχών έναντι των μυκήτων *C. albicans* M10/20 και *C.albicans* M351/19

3.3.1 Αποτελέσματα δοκιμαστικής μεθόδου ανταγωνισμού (antagonism assay) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης των βακτηριακών στελεχών έναντι των μυκήτων *C. albicans* M10/20 και *C.albicans* M351/19

Ακολουθήθηκε η δοκιμή ανταγωνισμού με τα στελέχη της *C. albicans*, καθώς η μέθοδος αυτή παρουσίασε τα βέλτιστα αποτελέσματα στα πειράματα με τους μύκητες αλλοίωσης τροφίμων. Ωστόσο σε αυτήν την περίπτωση τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά

Στην εικόνα 12 παρατίθενται τα τρυβλία με τις καλύτερες αποδόσεις, οι οποίες όπως διαφαίνεται δεν είναι ικανοποιητικές αφού οι ζώνες αναστολής είναι αδύναμες και δεν υποδηλώνουν πλήρη αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα σε εκείνα τα σημεία.



Εικόνα 12: Αποτελέσματα δοκιμής ανταγωνισμού των βακτηρίων A2 (Α), B43(B) και A146 (Γ) έναντι του *C. albicans* M10/20

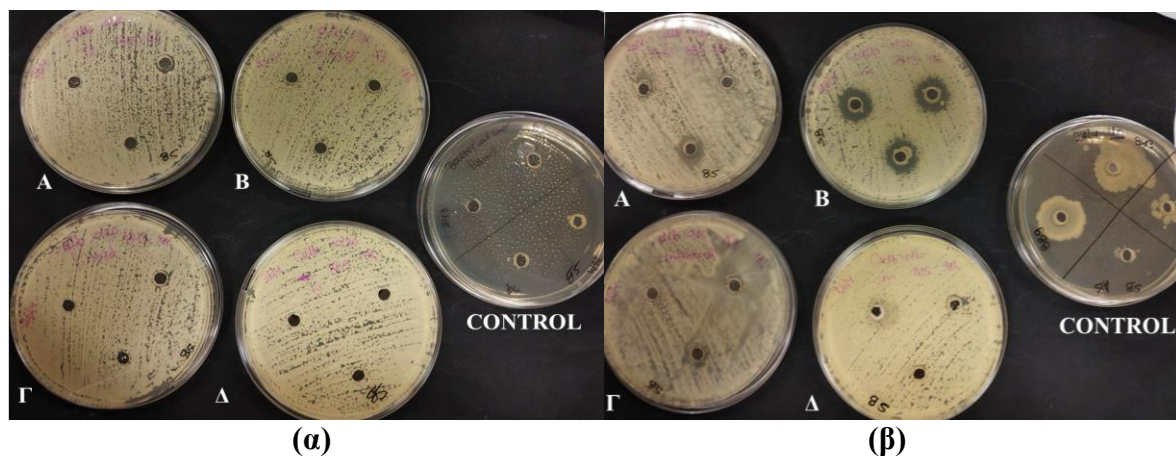
3.3.2 Αποτελέσματα Μεθόδου Διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (Well Diffusion) για διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών έναντι της *C. albicans*

Με την μέθοδο αυτή ελέγχθηκε η αντιμυκητιακή δράση δώδεκα βακτηρίων έναντι των δύο στελεχών της *C. albicans*. Από αυτά, τα έντεκα (A2, A15, A31, A163, B16, B21, B89, A20, B11, A28, A23) ήταν αυτά που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 3.2.2.3 και εμφάνισαν δράση έναντι των μυκήτων *A. niger*, *P. commune*, *P. expansum*, ενώ το δωδέκατο, B43, επιλέχθηκε λόγω της καλής απόδοσης του στην δοκιμή ανταγωνισμού, που διακρίνεται και στην εικόνα 12B.

Στην συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιήθηκε υπερκείμενο υγρής βακτηριακής καλλιέργειας 48 και 72 ωρών με σκοπό την παρατήρηση της αντιμυκητιακής δράσης των προϊόντων που παράγονται κατά την στατική φάση ανάπτυξης.

Στην αρχική δοκιμή αυτής της μεθόδου οι καλλιέργειες 48 και 72 ωρών των βακτηρίων A2, A15, B43 και B89 φυγοκεντρήθηκαν στις 8000rpm για 3 λεπτά. Το υπερκείμενο που συλλέχθηκε και εν μέρει διηθήθηκε με φίλτρο 0,45 μm με σκοπό την απομάκρυνση τυχόν κυτταρικών υπολειμμάτων.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 13α, τα τρυβλία στα οποία εναποτέθηκε φιλτραρισμένο υπερκείμενο στα πηγαδάκια, εμφάνισαν πλήρη μυκητιακή ανάπτυξη χωρίς καμία ένδειξη αναστολής. Ο δε μάρτυρας στον οποίο είχε εναποτεθεί υπερκείμενο χωρίς την ύπαρξη μύκητα, στερείτο οποιασδήποτε βακτηριακής ανάπτυξης.

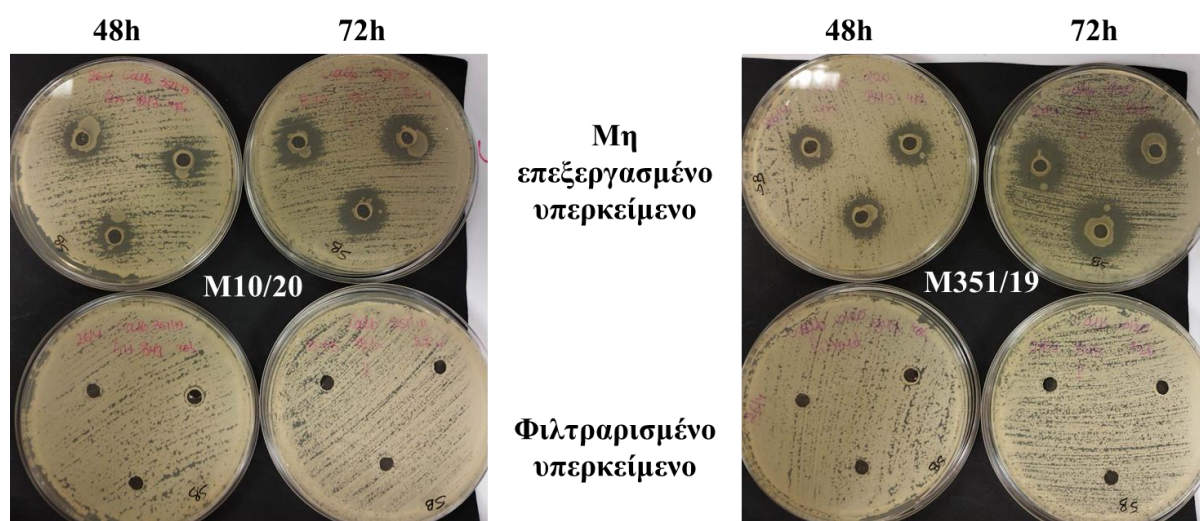


Εικόνα 13: (α) Μέθοδος Διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια του φιλτραρισμένου υπερκειμένου των βακτηρίων A15(A), A2(B), B43(Γ), B89(Δ) έναντι του μύκητα *C. albicans* M10/20. Σε κάθε πηγαδάκι του τρυβλίου ελέγχου εναποτέθηκαν από 100μl έκαστου φιλτραρισμένου βακτηριακού υπερκειμένου.

(β) Μέθοδος Διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια του μη επεξεργασμένου υπερκειμένου των βακτηρίων B89(A), B43(B), A2(Γ), A15(Δ) έναντι του μύκητα *C. albicans* M10/20. Σε κάθε πηγαδάκι του τρυβλίου ελέγχου εναποτέθηκαν από 100μl έκαστου βακτηριακού υπερκειμένου.

Όσον αφορά τα μη διηθημένα υπερκείμενα, τα αποτελέσματα ποικίλανε. Τα βακτήρια B89, A15 και A2 εμφάνισαν ελάχιστη έως μηδαμινή αντιμυκητιακή δράση, ενώ γύρω από το πηγαδάκι που περιείχε το υπερκείμενο της καλλιέργειας του βακτηρίου B43 παρατηρήθηκε έντονη ζώνη αναστολής (Εικόνα 13β). Σημαντική παρατήρηση στο σημείο αυτό είναι ότι παρόλη την φυγοκέντρωση, υπάρχει βακτηριακή ανάπτυξη, τόσο στα τρυβλία με τα δείγματα όσο και στα τρυβλία ελέγχου.

Τα αποτελέσματα ήταν τα ίδια τόσο μεταξύ των μυκήτων *C. albicans* M10/20 και *C. albicans* M351/19, όσο και μεταξύ των 48 και 72 ωρών.

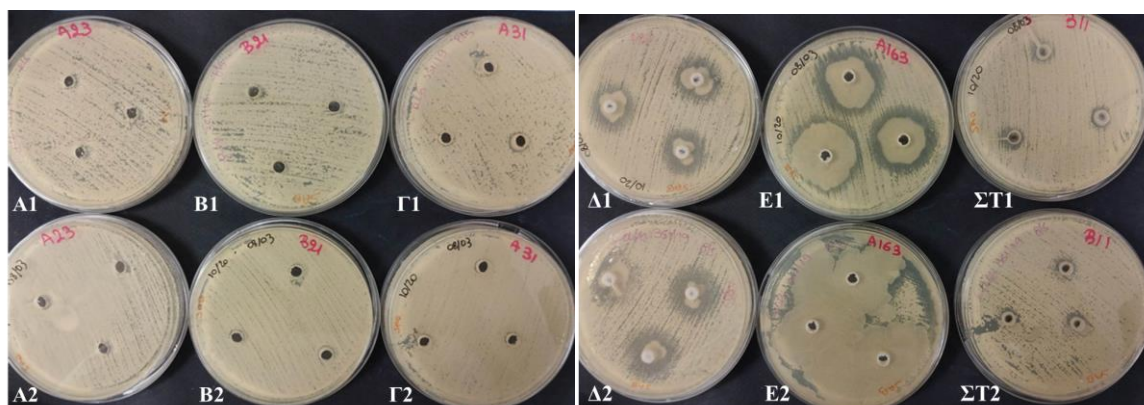


Εικόνα 14: Σύγκριση αποτελεσμάτων της μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια του υπερκειμένου του βακτηρίου B43, έναντι των μυκήτων *C. albicans* M10/20 (αριστερά) και *C. albicans* M351/19 (δεξιά), με φιλτραρισμένο ή όχι υπερκείμενο, καλλιέργειας 48 και 72 ωρών. Παρατηρείται λοιπόν ότι το φιλτράρισμα ανέστειλε την όποια αντιμυκητιακή δράση των βακτηριακών υπερκειμένων.

Με σκοπό την αποφυγή ύπαρξης βακτηριακών κυτταρικών υπολειμμάτων στο υπερκείμενο χωρίς να χρειαστεί φιλτράρισμα, το οποίο πιθανόν να συγκρατεί κάποια αντιμυκητιακά μεγαλομόρια ή πεπτίδια, η ίδια μέθοδος δοκιμάστηκε και με φυγοκέντρηση της βακτηριακής καλλιέργειας στα 14680rpm για 20 λεπτά. Ωστόσο ούτε με αυτόν τον τρόπο ήταν δυνατή η απόκτηση cell-free υπερκειμένου, οπότε υπήρξε βακτηριακή ανάπτυξη και ζώνη αναστολής.

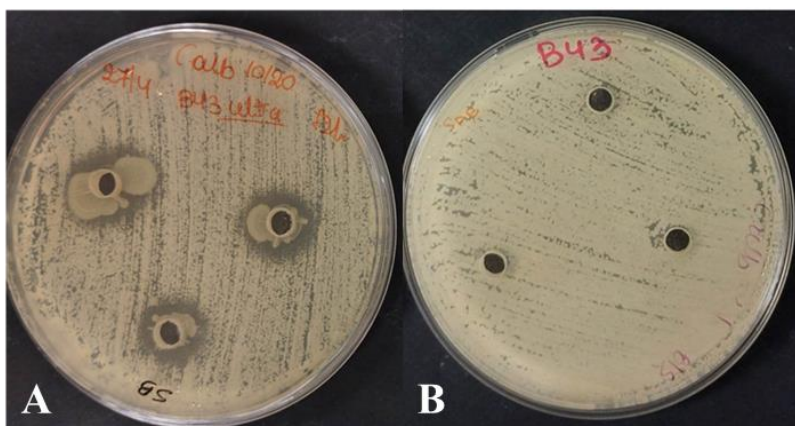
Με τον ίδιο σκοπό, δοκιμάστηκε η φυγοκέντρηση των καλλιιεργειών μία φορά στα 13500rpm για 20 λεπτά, ακολουθούμενη από συλλογή του υπερκειμένου το οποίο φυγοκεντρήθηκε ξανά με τις ίδιες παραμέτρους. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε στα βακτήρια B43, A2, A15, A31, A163, B16, B21, B89, A20, B11, A28 και A23.

Από τα δώδεκα βακτήρια, τα οκτώ (A23, B21, A31, B16, A2, A28, A15, B21) δεν επηρέασαν την ανάπτυξη κανενός από τα δύο στελέχη της *C. albicans*, όπως φανερώνεται στην εικόνα 16. Όσον αφορά τα βακτήρια, A163, B11, και A20, εμφάνισαν ζώνες αναστολής, όμως με παράλληλη βακτηριακή ανάπτυξη.



Εικόνα 15: Αποτελέσματα Μεθόδου Διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια του υπερκειμένου των βακτηρίων A23(A), B21(B), A31(Γ), A20(Δ), A163(E), B11(ΣΤ), έναντι των *C. albicans* M351/19 (σειρά 1) και *C. albicans* M10/20 (σειρά 2).

Ιδιαίτερη περίπτωση αποτελεί αυτή του βακτηριακού στελέχους B43, είδους *B.safensis*, το οποίο υποβλήθηκε στην ίδια δοκιμασία δύο φορές, επιφέροντας διαφορετικά αποτελέσματα. Παρατηρώντας την εικόνα 17A, είναι φανερή η παρουσία ζώνης αναστολής, η οποία απουσιάζει στην 17B. Οι συνθήκες του πειράματος ήταν οι ίδιες με μόνη διαφορά την ύπαρξη βακτηριακής ανάπτυξης στην περίπτωση της δοκιμής που ανέδειξε αντιμυκητιακή ικανότητα. Η βακτηριακή ανάπτυξη πιθανόν να προέκυψε από ύπαρξη κυτταρικών υπολειμμάτων στο υπερκείμενο μετά την φυγοκέντρηση.

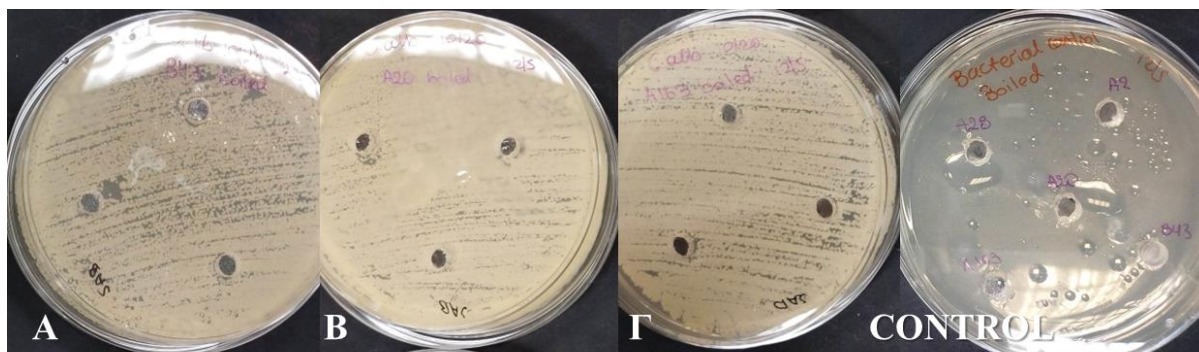


Εικόνα 16: Αποτελέσματα Μεθόδου Διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια του υπερκειμένου του B43 έναντι της *C. albicans* M10/20, σε δύο διαφορετικές δοκιμές, A και B, του ίδιου πειράματος.

Συνολικά, ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των μυκήτων *C. albicans*, παρουσίασαν τα βακτηριακά στελέχη B43, A20, A163 και B11, που ανήκουν στο γένος *Bacillus*. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα, καθίσταται έκδηλη η σχέση μεταξύ της αντιμυκητιακής δράσης και της ύπαρξης αναπτυσσόμενης βακτηριακής αποικίας.

3.3.3 Αποτελέσματα θερμικής επεξεργασίας υπερκειμένου βακτηριακής καλλιέργειας

Από τα προηγούμενα πειράματα απεδείχθη ότι τα βακτήρια B43, A163, B11 και A20, είτε αυτούσια είτε μέσω ουσιών που παρήγαγαν, παρουσίασαν αντιμυκητιακή δράση έναντι των *C. albicans* 10/20 και *C. albicans* 351/19. Για να αποφανθεί αν η ικανότητα αυτή παραμένει αναλλοίωτη μετά από θερμική επεξεργασία, αν παρουσιάζει δηλαδή θερμοανθεκτικότητα, μέρος του υπερκειμένου κάθε βακτηρίου που είχε χρησιμοποιηθεί στην μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια, θερμάνθηκε στους 95oC για 10 λεπτά. Στην συνέχεια υποβλήθηκαν στην ίδια διαδικασία και τα αποτελέσματά τους συγκρίθηκαν με αυτά των μη θερμασμένων υπερκειμένων (Εικόνα 15). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η θερμότητα κατέστειλε την αντιμυκητιακή δράση, καθώς υπήρξε απρόσκοπτη ανάπτυξη του μύκητα.



Εικόνα 17: Αποτελέσματα θερμικής επεξεργασίας υπερκλειμένου βακτηριακής καλλιέργειας των στελεχών B43(A), A20(B), A163(Γ) έναντι της *C. albicans* M10/20. Σε κάθε πηγαδάκι του τρυβλίου ελέγχου εναποτέθηκαν από 100μl έκαστου φιλτραρισμένου βακτηριακού υπερκλειμένου.

4. Συζήτηση

Το μέλι έχει αποτελέσει παγκοσμίως ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον φυσικό προϊόν, τόσο για την διατροφική του αξία όσο και για τις ιαματικές του ικανότητες. Εξέχουσας ποιότητας θεωρούνται οι ελληνικοί τύποι μελιού, όπως επιβεβαιώνεται από την πληθώρα μελετών που έχουν ασχοληθεί με τις ευεργετικές ιδιότητές τους (47,70,71). Η αντιβακτηριακή, αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης δράση τους έχει αποδειχθεί επανειλημμένα, σε αντίθεση με την αντιμυκητιακή, η οποία αποτελεί αντικείμενο της παρούσας εργασίας. Η επιβεβαίωση μιας τέτοιας δράσης είναι σπουδαιότητας σημασίας αφενός για την ανάδειξη των βιολογικών δράσεων των ελληνικών αμιγών μελιών, και αφετέρου για την ανεύρεση νέων αντιμυκητιακών παραγόντων που δύνανται να συμβάλλουν στην καταπολέμηση της ανερχόμενης μυκητιακής ανθεκτικότητας (antifungal resistance) (72,73). Σε αυτήν την μελέτη, μέλι καστανιάς και ερείκης, καθώς και βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από ελληνικά μέλια, εξετάστηκαν έναντι των μυκήτων *P. commune*, *P. expansum*, *A. niger*, *C. albicans* M10/20 και *C. albicans* M 351/19.

Μετά από δοκιμή διαφόρων μεθόδων με σκοπό την επιλογή των καταλληλότερων, επιλέχθηκαν για την εκτίμηση της μυκητοστατικής και μυκητοκτόνου δράσης των δειγμάτων μελιού, οι MIC (Minimum Inhibitory Concentration) και MFC (Minimum Fungicidal Concentration) αντίστοιχα, και για την δράση των βακτηρίων, δοκιμή ανταγωνισμού έναντι στους μύκητες αλλοίωσης τροφίμων και μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια για τα στελέχη της *C. albicans*. Μέσω αυτών των μεθόδων, από τα δεκαέξι (16) δείγματα ελληνικών μελιών που εξετάστηκαν, τα δώδεκα (12) εμφάνισαν αντιμυκητιακή δράση έναντι των

μυκήτων σε όμοιο βαθμό με το μέλι Manuka, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο σύγκρισης. Από τα δώδεκα δείγματα, τα πέντε (5) ήταν δραστικά έναντι όλων των στελεχών. Όσον αφορά τα βακτηριακά στελέχη που αποτελούν μέλη του ενδογενούς μικροβιώματος ελληνικών μελιών, στην πλειοψηφία τους παρουσίασαν δραστικότητα έναντι των μυκήτων σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό, ενώ τρία βακτήρια, μέλη της οικογένειας *Bacillus*, ανέστειλαν την ανάπτυξη και των πέντε μυκητιακών στελεχών.

Παρότι δεν είναι εκτενώς μελετημένη, η αντιμυκητιακή δράση του μελιού δεν αποτελεί έκπληξη, καθώς φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του, όπως η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων αλλά και επιμέρους μόρια που περιέχει, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου και τα αντιμικροβιακά πεπτίδια, δημιουργούν δυσμενείς συνθήκες ανάπτυξης για πολλούς μικροοργανισμούς (8,9,20,22). Η πλειονότητα των ερευνών με αντικείμενο την επίδραση διάφορων τύπων μελιού στην ανάπτυξη των μυκήτων, χρησιμοποιεί το μέλι Manuka ως μέτρο σύγκρισης της δράσης τους. Ανάλογα με την γυρεοκοκκική τους καθαρότητα και την ποσότητα μεθυλογλυοξάλης που περιέχουν, αποδίδεται ένας βαθμός UMF στα μέλια Manuka, ο οποίος αντικατοπτρίζει την αντιμικροβιακή δράση τους. Αντιμυκητιακή δράση έχει παρατηρηθεί σε μέλια Manuka ξεκινώντας από βαθμό UMF 10+ (69), με την ελάχιστη μυκητοστατική συγκέντρωση να κυμαίνεται από 20% v/v έως και άνω της 50% v/v (40,69,74), έναντι της *C. albicans*, της οποίας η αναστολή είναι η πιο μελετημένη, καθώς αποτελεί απειλή για την ανθρώπινη υγεία.

Παρόλο που έως τώρα δεν είχε ερευνηθεί η δράση ερεικόμελων και καστανόμελων ελληνικής προέλευσης, μέλια ίδιας βοτανικής αλλά διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης έχουν αποδειχθεί δραστικά έναντι της *C. albicans*, σε ένα εύρος συγκεντρώσεων. Οι Fernandes et al (75), δοκίμασαν μέλι ερείκης και καστανιάς από την Πορτογαλία έναντι αυτού του μύκητα και παρατήρησαν πως ήταν ικανά να αναστείλουν την ανάπτυξη του σε ελάχιστη συγκέντρωση 50% v/v, ενώ εμφάνισαν μυκητοκτόνες δράσεις σε τιμές συγκέντρωσης πάνω από 50% v/v, όπως και το μέλι Manuka που χρησιμοποίησαν ως control. Στην ίδια έρευνα οι μελετητές αφού εκτίμησαν τις συγκεντρώσεις φαινολών, φλαβονοειδών και υπεροξειδίου του υδρογόνου των μελιών αυτών, τα συνέκριναν με αυτά του μελιού Manuka, και παρατήρησαν ότι βρίσκονται στα ίδια επίπεδα. Στην δραστικότητα του πορτογαλικού ερεικόμελου συνοπογράφουν οι Feas et al (44), αποδεικνύοντας ότι παρουσιάζει 90% αναστολή ανάπτυξης της *C. albicans* σε συγκέντρωση 60% v/v. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, με κάποια από τα ελληνικά μέλια ωστόσο να παρουσιάζουν μυκητοστατική δράση σε συγκέντρωση 25% και μυκητοκτόνο στο 50% v/v, δηλαδή ισχυρότερη από του Manuka, το οποίο σκότωνε τους μύκητες σε συγκεντρώσεις ελαφρώς μεγαλύτερες του 50% v/v.

Εντούτοις, οι Bozdeveci et al (76), χρησιμοποιώντας την μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια παρατήρησαν έλλειψη οποιασδήποτε ανασταλτικής δράσης έναντι της *C. albicans*, τόσο από μέλια ερείκης και καστανιάς Τουρκικής προέλευσης, όσο και μελιών Manuka, UMF 10+, 12+, 15+ και 20+. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν οι Kunčič et al. (50) με μέλια από την Σλοβενία, σε εξεταζόμενες συγκεντρώσεις έως 50% v/v με την μέθοδο Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (MIC). Η διαφορετικότητα των αποτελεσμάτων, δείχνει ότι η δράση των μελιών δεν εξαρτάται απόλυτα από την βοτανική τους προέλευση καθώς η γεωγραφική προέλευση και η επιλεγόμενη μέθοδος καθορισμού της αντιμικροβιακής δράσης ενδέχεται να επηρεάζει το αποτέλεσμα.

Ομοίως, όσον αφορά την δράση των μελιών έναντι των μυκήτων αλλοίωσης τροφίμων, μολονότι η βιβλιογραφία είναι περιορισμένη, ακολουθεί το ίδιο μοτίβο· όταν τα αποτελέσματα δεν είναι εντελώς αρνητικά (50), οι τιμές Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης ποικίλλουν. Δεν υπάρχουν δεδομένα για την ευαισθησία του *P. commune*, στην δράση οποιουδήποτε τύπου μελιού, ωστόσο η ανάπτυξη των μυκήτων *Penicillium expansum*, και *Aspergillus niger* έχει ανασταλεί αποτελεσματικά από μέλια που προέρχονται από διάφορα φυτά (69,77,78), όχι όμως από θάμνους ερείκης. Όπως απέδειξαν οι Suhana et al (69), χρησιμοποιώντας την μέθοδο MIC, το μέλι Manuka παρουσίασε αντιμυκητιακή δράση έναντι του *A. niger* σε συγκέντρωση 21%. Παράλληλα, στην έρευνα που διεξήχθη από τους Kačanióna et al. (79), δημιουργήθηκαν ζώνες αναστολής του *P. expansum* με διήθηση σε άγαρ καστανόμελου σλοβάκινης προέλευσης, συγκέντρωσης 10% v/v. Στην παρούσα εργασία, ερεϊκόμελα, καστανόμελα και μέλι Manuka, ανέστειλαν επιτυχώς την ανάπτυξη και των τριών μυκήτων αλλοίωσης τροφίμων, με ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση και για τους τρεις τύπους μελιού το 50% v/v.

Εκτός από τα μέλια, δραστικά αποδείχθηκαν και βακτηριακά στελέχη που τα αποικίζουν. Η πλειοψηφία αυτών των στελεχών αποτελούν οξυγαλακτικά βακτήρια και βάκιλλοι, τα οποία παράγουν οργανικά οξέα, πτητικές ενώσεις, ριβοσωμικά και μη συντιθέμενα πεπτίδια με αντιμυκητιακές ικανότητες (80–82). Σε προηγούμενες μελέτες, μέλη του γένους *Bacillus* που απομονώθηκαν από ακατέργαστο μέλι ήταν σε θέση να παράγουν μια ποικιλία δευτερογενών μεταβολιτών για να αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών και να αποκτούν πλεονεκτήματα επιβίωσης. Οι Manns et al (83), κατάφεραν να προσδιορίσουν ένα αντιμυκητιακό πεπτίδιο, με ευρύ φάσμα δράσης έναντι των γενών *Aspergillus*, *Penicillium*, *Byssoschlamys*, και *Candida albicans*, το οποίο παράγεται από τον *B. thuringiensis* SF361, στέλεχος απομονωμένο από μέλι αμερικανικής προέλευσης. Ομοίως οι Xiong et al (84), απέδωσαν την αντιμυκητιακή δράση που παρουσιάζουν δύο βακτηριακά στελέχη *Bacillus*

velezensis στην ιτουρίνη A, ένα γνωστό λιποπεπτίδιο που αναστέλλει την μυκητιακή ανάπτυξη (85). Συνεπώς, τα αποτελέσματα της έρευνάς μας βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία με αυτά τα ευρήματα, καθώς όλα τα βακτήρια που αναδείχθηκαν για την δράση τους, εκτός από ένα, ανήκαν στην οικογένεια *Bacillus*. Ειδικότερα, τα στελέχη *B. subtilis* CTA20 και *B. licheniformis* CTA163, ξεχώρισαν διότι εμπόδισαν την ανάπτυξη όλων των μυκήτων έναντι των οποίων εξετάστηκαν. Ακριβώς αυτά τα δύο στελέχη, αποτέλεσαν αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας των Harwood et al (85), με στόχο τον χαρακτηρισμό της σύνθεσης αντιμυκητιακών μη ριβοσωμικά συντιθέμενων πεπτιδίων και πολυκετιδίων που παράγουν. Εξέχουσας σημασίας αποδείχθηκαν κυκλικά λιποπεπτίδια, όπως η σουρφακτίνη, η ιτουρίνη, η πλιπαστατίνη και η φενγγυσίνη, τα οποία βρίσκουν εμπορική χρήση ως αντιμυκητιακοί παράγοντες για καταπολέμηση των ασθενειών των φυτών που προκαλούνται από φυτοπαθογόνα (84).

Το μοναδικό βακτηριακό στέλεχος που είχε σημαντική αντιμυκητιακή δράση αλλά δεν ανήκει στην οικογένεια *Bacillus*, ήταν η *Pseudomonas fulva* CTA23. Ορισμένα μέλη του γένους *Pseudomonas*, είναι ιδιαίτερα γνωστά για τις αντιφυτοπαθογόνες ιδιότητές τους έναντι των μυκήτων που προσβάλλουν τα φυτά (86). Οι Adetomiwa et al (87) πρότειναν την *P. fulva* ως παράγοντα αντιμετώπισης στελεχών του μύκητα *Fusarium*, ενώ ένα συγγενικό είδος, η *P. aeruginosa*, αποδείχθηκε από τους Sulochana et al. (88) ότι δρα έναντι του *A. niger*, μέσω της παραγωγής σιδηροφόρων. Η αλληλεπίδραση του *A. niger* με την *P. fulva* CTA23, στο πείραμά μας, οδήγησε στην απόκτηση της αποικίας κυανοπράσινου χρώματος και στην δημιουργία έντονης ζώνης αναστολής γύρω από αυτήν (Εικόνα 12). Το χρώμα αυτό θα μπορούσε να υποδηλώνει την παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών πυοκυανίνη και πυοβερντίνη, γνωστά αντιμικροβιακά και μάλιστα μυκητοστατικά προϊόντα της *Pseudomonas* (89–91), γεγονός που δικαιολογεί την έντονη αντιμυκητιακή δράση του στελέχους A23.

Όσον αφορά την διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών έναντι της *C. albicans* με την μέθοδο της διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια, η προσέγγιση ήταν η απόκτηση “cell-free” υπερκείμενου. Σκοπός ήταν να εκτιμηθεί η ανασταλτική ισχύς των εκκρινόμενων βιοδραστικών μεταβολιτών από τον υποψήφια βακτηριακά στελέχη, σε αντίθεση με τις ανταγωνιστικές μεθόδους συγκαλλιέργειας που διερευνούν την άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ παθογόνου και υποψήφιου μυκητοκτόνου. Η παραγωγή μεταβολιτών εξαρτάται από τη φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού, δεδομένου ότι η μεταβολική δραστηριότητα μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της μικροβιακής ανάπτυξης. Χρησιμοποιώντας υπερκείμενο από καλλιέργεια 48 και άνω ωρών, τα κύτταρα βρίσκονταν σε όψιμες φάσεις ανάπτυξης κατά τις οποίες μπορεί είτε να παραχθούν δραστικοί δευτερογενείς

μεταβολίτες ή να αποικοδομηθούν ήδη υπάρχοντες (92). Ο δεύτερος ενδεχομένως να είναι ο λόγος που τα υπερκείμενα τα οποία υπέστησαν διήθηση δεν εμφάνισαν καμία αντιμυκητιακή δράση. Ωστόσο, το μεγάλο μοριακό βάρος ή η πιθανή σύνδεση της αντιμυκητιακής ουσίας με την βακτηριακή κυτταρική μεμβράνη, μπορεί να επέφεραν το ίδιο αποτέλεσμα. Όπου δεν έγινε φιλτράρισμα, δεν ήταν δυνατή η απόκτηση “cell-free” υπερκειμένου, οπότε υπήρχε βακτηριακή ανάπτυξη. Εάν σε μελλοντικές έρευνες κριθεί απαραίτητη η απομάκρυνση κυτταρικών υπολειμμάτων από το υπερκείμενο χωρίς την χρήση φίλτρου, η προσθήκη αντιβακτηριακών παραγόντων, όπως περιγράφεται από τους Kjeldgaard et al (93), δίνει αυτήν την δυνατότητα.

Η παρούσα εργασία ανοίγει δρόμους για την ανακάλυψη νέων αντιμυκητιακών παραγόντων με ποικίλα πεδία εφαρμογής, όπως η φαρμακολογία, η τεχνολογία τροφίμων και η αγροκαλλιέργεια. Έχοντας προσδιορίσει τους τύπους Ελληνικών μελιών και τα βακτηριακά στελέχη που ασκούν αντιμυκητιακές δράσεις τίθενται τα θεμέλια για την περαιτέρω συγκεκριμενοποίηση αυτής. Παράλληλα, η μελέτη της συνεργιστικής αγωγής μελιών και αντιμυκητιακών φαρμάκων *in vitro* και στην συνέχεια κλινικά, μπορεί να οδηγήσει σε καινοτόμες θεραπείες μυκητιάσεων στον άνθρωπο. Επίσης, η ταυτοποίηση ουσιών με ανασταλτική δράση στο μέλι ή μεταβολιτών των βακτηρίων και η μελέτη των ειδικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτών και μυκήτων, αποβλέπει στην χρήση τους ως πρωτοποριακά φυσικά συντηρητικά κατά την αποθήκευση τροφίμων και ζωοτροφών. Εν κατακλείδι, η παρούσα μελέτη έδειξε για πρώτη φορά πως οι ελληνικοί τύποι μελιών έχουν σημαντική αντιμυκητιακή δράση, ενώ ταυτόχρονα αποτελεί βάση για την περαιτέρω διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης και άλλων ελληνικών τύπων μελιού έναντι των ίδιων ή και διαφορετικών μυκήτων.

Βιβλιογραφία

1. Fernandes KE, Frost EA, Remnant EJ, Schell KR, Cokcetin NN, Carter DA. The role of honey in the ecology of the hive: Nutrition, detoxification, longevity, and protection against hive pathogens. *Front Nutr*. 2022 Jul 25;9:954170.
2. Johnson BR. Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. *Behav Ecol Sociobiol*. 2010;64(3):305–16.
3. Nicolson SW, Human H, Pirk CWW. Honey bees save energy in honey processing by dehydrating nectar before returning to the nest. *Sci Rep*. 2022 Sep 28;12:16224.
4. Alaerjani WMA, Abu-Melha S, Alshareef RMH, Al-Farhan BS, Ghramh HA, Al-Shehri BMA, et al. Biochemical Reactions and Their Biological Contributions in Honey. *Molecules*. 2022 Jul 23;27(15):4719.
5. Ranneh Y, Akim AM, Hamid HAb, Khazaai H, Fadel A, Zakaria ZA, et al. Honey and its nutritional and anti-inflammatory value. *BMC Complement Med Ther*. 2021 Jan 14;21:30.
6. Iglesias MT, De Lorenzo C, Del Carmen Polo M, Martín-Alvarez PJ, Pueyo E. Usefulness of amino acid composition to discriminate between honeydew and floral honeys. Application to honeys from a small geographic area. *J Agric Food Chem*. 2004 Jan 14;52(1):84–9.
7. Bogdanov S. Honey Composition. *Bee Prod Sci*. 2016 Jan 1;
8. Nolan VC, Harrison J, Cox JAG. Dissecting the Antimicrobial Composition of Honey. *Antibiotics*. 2019 Dec 5;8(4):251.
9. Brudzynski K. A current perspective on hydrogen peroxide production in honey. A review. *Food Chem*. 2020 Dec 1;332:127229.
10. ALaerjani WMA, Abu-Melha SA, Khan KA, Ghramh HA, Alalmie AYA, Alshareef RMH, et al. Presence of short and cyclic peptides in Acacia and Ziziphus honeys may potentiate their medicinal values. *Open Chem*. 2021 Jan 1;19(1):1162–73.
11. Ibrahim HR, Nanbu F, Miyata T. Potent antioxidant peptides derived from honey major protein enhance tolerance of eukaryotic cells toward oxidative stress. *Food Prod Process Nutr*. 2021 Mar 8;3(1):11.
12. Lichtenberg-Kraag B. Evidence for correlation between invertase activity and sucrose content during the ripening process of honey. *J Apic Res*. 2014 Jan;53(3):364–73.
13. Lee R, Harris J, Champagne P, Jessop PG. CO₂-Catalysed conversion of carbohydrates to 5-hydroxymethyl furfural. *Green Chem*. 2016 Nov 21;18(23):6305–10.
14. Shapla UM, Solayman Md, Alam N, Khalil MdI, Gan SH. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. *Chem Cent J*. 2018 Apr 4;12(1):35.
15. Solayman Md, Islam MdA, Paul S, Ali Y, Khalil MdI, Alam N, et al. Physicochemical Properties, Minerals, Trace Elements, and Heavy Metals in Honey of Different Origins: A Comprehensive Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2016 Jan;15(1):219–33.
16. Mandal MD, Mandal S. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2011 Apr;1(2):154–60.
17. Alvarez-Suarez J, Giampieri F, Battino M. Honey as a Source of Dietary Antioxidants: Structures, Bioavailability and Evidence of Protective Effects Against Human Chronic Diseases. *Curr Med Chem*. 2013 Jan 16;20(5):621–38.
18. Machado De-Melo AA, Almeida-Muradian LBD, Sancho MT, Pascual-Maté A. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *J Apic Res*. 2018 Jan 1;57(1):5–37.
19. Olaitan PB, Adeleke OE, Ola IO. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *Afr Health Sci*. 2007 Sep;7(3):159–65.
20. Xiong ZR, Sogin JH, Worobo RW. Microbiome analysis of raw honey reveals important factors influencing the bacterial and fungal communities. *Front Microbiol*. 2023 Jan 12;13:1099522.
21. Pomastowski P, Złoch M, Rodzik A, Ligor M, Kostrzewa M, Buszewski B. Analysis of bacteria associated with honeys of different geographical and botanical origin using two different identification approaches: MALDI-TOF MS and 16S rDNA PCR technique. *PLoS ONE*. 2019 May 23;14(5):e0217078.

22. Brudzynski K. Honey as an Ecological Reservoir of Antibacterial Compounds Produced by Antagonistic Microbial Interactions in Plant Nectars, Honey and Honey Bee. *Antibiotics*. 2021 May 9;10(5):551.
23. Olofsson TC, Vásquez A. Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Curr Microbiol*. 2008 Oct;57(4):356–63.
24. Raymann K, Moran NA. The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Curr Opin Insect Sci*. 2018 Apr;26:97–104.
25. Nevas M, Lindström M, Hörman A, Keto-Timonen R, Korkeala H. Contamination routes of *Clostridium botulinum* in the honey production environment. *Environ Microbiol*. 2006 Jun;8(6):1085–94.
26. Tiwari A, Nagalli S. *Clostridium botulinum* Infection. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cited 2023 Sep 2]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553081/>
27. Wang T, Liu X huan, Wu MB, Ge S. Molecular insights into the antifungal mechanism of bacilysin. *J Mol Model*. 2018 Apr 26;24(5):118.
28. Brudzynski K. Honey as an Ecological Reservoir of Antibacterial Compounds Produced by Antagonistic Microbial Interactions in Plant Nectars, Honey and Honey Bee. *Antibiotics*. 2021 May 9;10(5):551.
29. Bucekova M, Sojka M, Valachova I, Martinotti S, Ranzato E, Szep Z, et al. Bee-derived antibacterial peptide, defensin-1, promotes wound re-epithelialisation in vitro and in vivo. *Sci Rep*. 2017 Aug 4;7(1):7340.
30. Oryan A, Alemzadeh E, Moshiri A. Biological properties and therapeutic activities of honey in wound healing: A narrative review and meta-analysis. *J Tissue Viability*. 2016 May 1;25(2):98–118.
31. Iftikhar A, Nausheen R, Muzaffar H, Naem MA, Farooq M, Khurshid M, et al. Potential Therapeutic Benefits of Honey in Neurological Disorders: The Role of Polyphenols. *Molecules*. 2022 May 20;27(10):3297.
32. Kwakman PHS, Velde AA te, de Boer L, Speijer D, Christina Vandenbroucke-Grauls MJ, Zaat SAJ. How honey kills bacteria. *FASEB J*. 2010;24(7):2576–82.
33. Rabie E, Serem JC, Oberholzer HM, Gaspar ARM, Bester MJ. How methylglyoxal kills bacteria: An ultrastructural study. *Ultrastruct Pathol*. 2016 Mar 3;40(2):107–11.
34. Rückriemen J, Klemm O, Henle T. Manuka honey (*Leptospermum scoparium*) inhibits jack bean urease activity due to methylglyoxal and dihydroxyacetone. *Food Chem*. 2017 Sep 1;230:540–6.
35. Halstead F d., Webber M a., Oppenheim B a. Use of an engineered honey to eradicate preformed biofilms of important wound pathogens: an in vitro study. *J Wound Care*. 2017 Aug 2;26(8):442–50.
36. Maddocks SE, Lopez MS, Rowlands RS, Cooper RA. Manuka honey inhibits the development of *Streptococcus pyogenes* biofilms and causes reduced expression of two fibronectin binding proteins. *Microbiology*. 2012;158(3):781–90.
37. Adams CJ, Manley-Harris M, Molan PC. The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr Res*. 2009 May;344(8):1050–3.
38. Criteria for identifying mānuka honey.
39. Yabes JM, White BK, Murray CK, Sanchez CJ, Mende K, Beckius ML, et al. In Vitro activity of Manuka Honey and polyhexamethylene biguanide on filamentous fungi and toxicity to human cell lines. *Med Mycol*. 2017 Apr;55(3):334–43.
40. Fernandes L, Ribeiro H, Oliveira A, Sanches Silva A, Freitas A, Henriques M, et al. Portuguese honeys as antimicrobial agents against *Candida* species. *J Tradit Complement Med*. 2021 Mar;11(2):130–6.
41. Uskudar-Guclu A, Simsek D, Ata-Vural I, Unlu S, Basustaoglu A. Antibacterial, Antifungal and Antibiofilm Activity of Methylglyoxal: a Phytochemical from Manuka Honey. *Mediterr J Infect Microbes Antimicrob* [Internet]. 2021 Sep 16 [cited 2023 Sep 8]; Available from: http://mjima.org/uploads/pdf/pdf_279.pdf
42. Oddo LP, Piro R, Bruneau É, Guyot-Declercq C, Ivanov T, Piskulová J, et al. Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*. 2004;35(Suppl. 1):S38–81.
43. Θρασυβούλου Α, Μανίκης Ι, Τανανάκη Χ, Τσέλιος Δ, Καραμπουρνιώτη Σ, Δήμου Μ. Η

- ταυτότητα του ελληνικού μελιού, Α. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που στηρίζουν την ποιότητα του προϊόντος. 1 Επιστημονικό Συνέδριο Μελισσοκομίας – Σηροτροφίας,; 2002.
44. Feás X, Estevinho ML. A Survey of the *In Vitro* Antifungal Activity of Heather (*Erica* Sp.) Organic Honey. *J Med Food*. 2011 Oct;14(10):1284–8.
 45. Mullai V, Menon T. Bactericidal Activity of Different Types of Honey against Clinical and Environmental Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Altern Complement Med N Y N*. 2007 Jun 1;13:439–41.
 46. Serrano S, Rodríguez I, Moreno R, Rincón F. Detection of key factors affecting specific optical rotation determination in honey. *CyTA - J Food*. 2019 Jan 1;17(1):574–80.
 47. Stavropoulou E, Ieronymaki E, Dimitroulia E, Constantinidis TC, Vrioni G, Tsatsanis C, et al. Anti-Inflammatory and Antibacterial Effects and Mode of Action of Greek Arbutus, Chestnut, and Fir Honey in Mouse Models of Inflammation and Sepsis. *Microorganisms*. 2022 Nov 30;10(12):2374.
 48. Taş-Küçükaydın M, Tel-Çayan G, Çayan F, Küçükaydın S, Hazar Çiftçi B, Ceylan Ö, et al. Chemometric classification of chestnut honeys from different regions in Turkey based on their phenolic compositions and biological activities. *Food Chem*. 2023 Jul 30;415:135727.
 49. Kačaniová M, Borotová P, Galovičová L, Kunová S, Štefániková J, Kowalczewski PŁ, et al. Antimicrobial and Antioxidant Activity of Different Honey Samples from Beekeepers and Commercial Producers. *Antibiotics*. 2022 Aug 29;11(9):1163.
 50. Kunčič MK, Jaklič D, Lapanje A, Gunde-Cimerman N. Antibacterial and antimycotic activities of Slovenian honeys. *Br J Biomed Sci*. 2012 Oct 1;69(4):154–8.
 51. Oliveira A, Sousa JC, Silva AC, Melo LDR, Sillankorva S. Chestnut Honey and Bacteriophage Application to Control *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Biofilms: Evaluation in an ex vivo Wound Model. *Front Microbiol*. 2018 Jul 31;9:1725.
 52. Pitt JI. *PENICILLIUM* | *Penicillium* and *Talaromyces*: In: *Encyclopedia of Food Microbiology* [Internet]. Elsevier; 2014 [cited 2023 Sep 10]. p. 6–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123847300002482>
 53. Li B, Chen Y, Zhang Z, Qin G, Chen T, Tian S. Molecular basis and regulation of pathogenicity and patulin biosynthesis in *Penicillium expansum*. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2020;19(6):3416–38.
 54. Vidal A, Ouhibi S, Ghali R, Hedhili A, De Saeger S, De Boevre M. The mycotoxin patulin: An updated short review on occurrence, toxicity and analytical challenges. *Food Chem Toxicol*. 2019 Jul 1;129:249–56.
 55. Pitt JI, Hocking AD. *Penicillium* and Related Genera. In: Pitt JI, Hocking AD, editors. *Fungi and Food Spoilage* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2009 [cited 2023 Sep 10]. p. 169–273. Available from: https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2_7
 56. Lorenzo JM, Muneke PE, Dominguez R, Pateiro M, Saraiva JA, Franco D. Main Groups of Microorganisms of Relevance for Food Safety and Stability. *Innov Technol Food Preserv*. 2018;53–107.
 57. Pitt JI, Hocking AD. *Aspergillus* and Related Teleomorphs. In: Pitt JI, Hocking AD, editors. *Fungi and Food Spoilage* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2009 [cited 2023 Sep 10]. p. 275–337. Available from: https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2_8
 58. Romsdahl J, Blachowicz A, Chiang AJ, Singh N, Stajich JE, Kalkum M, et al. Characterization of *Aspergillus niger* Isolated from the International Space Station. *mSystems*. 2018 Sep 18;3(5):e00112-18.
 59. Person AK, Chudgar SM, Norton BL, Tong BC, Stout JE. *Aspergillus niger*: an unusual cause of invasive pulmonary aspergillosis. *J Med Microbiol*. 2010 Jul;59(Pt 7):834–8.
 60. R AN, Rafiq NB. Candidiasis. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cited 2023 Sep 10]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560624/>
 61. Walker GM, White NA. Introduction to Fungal Physiology. In: Kavanagh K, editor. *Fungi* [Internet]. 1st ed. Wiley; 2017 [cited 2023 Sep 10]. p. 1–35. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119374312.ch1>
 62. Tsadila C, Nikolaidis M, Dimitriou TG, Kafantaris I, Amoutzias GD, Pournaras S, et al. Antibacterial Activity and Characterization of Bacteria Isolated from Diverse Types of Greek Honey

- against Nosocomial and Foodborne Pathogens. *Appl Sci*. 2021 Jan;11(13):5801.
63. Fraczek MG, Zhao C, Dineen L, Lebedinec R, Bowyer P, Bromley M, et al. Fast and Reliable PCR Amplification from *Aspergillus fumigatus* Spore Suspension Without Traditional DNA Extraction. *Curr Protoc Microbiol*. 2019 Sep;54(1):e89.
 64. Patton T, Barrett J, Brennan J, Moran N. Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey. *J Microbiol Methods*. 2006 Jan;64(1):84–95.
 65. Szweda P. Antimicrobial Activity of Honey. In: *Honey Analysis* [Internet]. IntechOpen; 2017 [cited 2023 Sep 14]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/54003>
 66. Kropinski AM, Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay. In: Clokie MRJ, Kropinski AM, editors. *Bacteriophages* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2009 [cited 2023 Sep 13]. p. 69–76. (Walker JM, editor. *Methods in Molecular Biology*; vol. 501). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-164-6_7
 67. Molina-Romero D, Baez A, Castañeda-Lucio M, Ernesto L. Antagonism assays to identify bacterial strains producing antimicrobial compounds.
 68. Liu Y, Li S, Shen T, Chen L, Zhou J, Shi S, et al. N-terminal Myristoylation Enhanced the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Peptide PMAP-36PW. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Aug 27;10:450.
 69. Suhana S, Sayadi S, Mohd Zohdi R. Antifungal activity of selected Malaysian honeys: a comparison with Manuka honey. *J Coast Life Med*. 2015 Jun 13;3:539–42.
 70. Tsavea E, Vardaka FP, Savvidaki E, Kellil A, Kanelis D, Bucekova M, et al. Physicochemical Characterization and Biological Properties of Pine Honey Produced across Greece. *Foods*. 2022 Mar 25;11(7):943.
 71. Gkoutzouvelidou M, Panos G, Xanthou MN, Papachristoforou A, Giaouris E. Comparing the Antimicrobial Actions of Greek Honeys from the Island of Lemnos and Manuka Honey from New Zealand against Clinically Important Bacteria. *Foods*. 2021 Jun 17;10(6):1402.
 72. Lee Y, Robbins N, Cowen LE. Molecular mechanisms governing antifungal drug resistance. *Npj Antimicrob Resist*. 2023 Jul 17;1(1):1–9.
 73. Vitiello A, Ferrara F, Boccellino M, Ponzo A, Cimmino C, Comberiati E, et al. Antifungal Drug Resistance: An Emergent Health Threat. *Biomedicines*. 2023 Apr;11(4):1063.
 74. Anand S, Deighton M, Livanos G, Pang ECK, Mantri N. Agastache honey has superior antifungal activity in comparison with important commercial honeys. *Sci Rep*. 2019 Dec 3;9(1):18197.
 75. Fernandes L, Ribeiro H, Oliveira A, Sanches Silva A, Freitas A, Henriques M, et al. Portuguese honeys as antimicrobial agents against *Candida* species. *J Tradit Complement Med*. 2021 Mar 1;11(2):130–6.
 76. Bozdeveci A, Alpay Karaoğlu Ş, Keskin M. Comparison of Antibacterial and Antifungal Effects of Different Varieties of Honey and Propolis Samples. *Acta Aliment*. 2020 Nov 7;49:516–23.
 77. Ahmad K, Khali AT, Somayya R, Khan FN, Shah AR, Ovais M, et al. Potential antifungal activity of different honey brands from Pakistan: a quest for natural remedy. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2017;14(5):18–23.
 78. Vică ML, Glevitzky M, Dumitrel GA, Bostan R, Matei HV, Kartalska Y, et al. Qualitative Characterization and Antifungal Activity of Romanian Honey and Propolis. *Antibiotics*. 2022 Nov;11(11):1552.
 79. Kacániová M, Fatrcová-Sramková K, Nozková J, Melich M, Kadasi-Horáková M, Knazovická V, et al. Antiradical activity of natural honeys and antifungal effect against *Penicillium* genera. *J Environ Sci Health Part B*. 2010 Dec 30;46(1):92–6.
 80. Caulier S, Nannan C, Gillis A, Licciardi F, Bragard C, Mahillon J. Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group. *Front Microbiol*. 2019 Feb 26;10:302.
 81. Bulgasem BY, Lani MN, Hassan Z, Wan Yusoff WM, Fnaish SG. Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Natural Honey against Pathogenic *Candida* Species. *Mycobiology*. 2016 Dec;44(4):302–9.

82. Lee H, Churey JJ, Worobo RW. Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey. *Int J Food Microbiol.* 2008 Aug 15;126(1):240–4.
83. Manns DC, Churey JJ, Worobo RW. Functional Assignment of YvgO, a Novel Set of Purified and Chemically Characterized Proteinaceous Antifungal Variants Produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. *Appl Environ Microbiol.* 2012 Apr;78(8):2543–52.
84. Xiong ZR, Cobo M, Whittall RM, Snyder AB, Worobo RW. Purification and characterization of antifungal lipopeptide produced by *Bacillus velezensis* isolated from raw honey. *PloS One.* 2022;17(4):e0266470.
85. Harwood CR, Mouillon JM, Pohl S, Arnau J. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. *FEMS Microbiol Rev.* 2018 Nov 1;42(6):721–38.
86. Adeniji AA, Ayangbenro AS, Loots DT. Genome Sequence Resource of *Pseudomonas fulva* HARBPS9.1—Candidate Biocontrol Agent. *Phytopathology®.* 2021 May;111(5):896–8.
87. Adeniji AA, Aremu OS, Loots DT, Babalola OO. *Pseudomonas fulva* HARBPS9.1: candidate anti-Fusarium agent in South Africa. *Eur J Plant Pathol.* 2020 Aug 1;157(4):767–81.
88. Sulochana MB, Jayachandra SY, Kumar SKA, Dayanand A. Antifungal attributes of siderophore produced by the *Pseudomonas aeruginosa* JAS-25. *J Basic Microbiol.* 2014;54(5):418–24.
89. Houshaymi B, Awada R, Kedees M, Soayfane Z. Pyocyanin, a Metabolite of *Pseudomonas Aeruginosa*, Exhibits Antifungal Drug Activity Through Inhibition of a Pleiotropic Drug Resistance Subfamily FgABC3. *Drug Res.* 2019 Dec;69(12):658–64.
90. Abdelaziz AA, Kamer AMA, Al-Monofy KB, Al-Madboly LA. *Pseudomonas aeruginosa*'s greenish-blue pigment pyocyanin: its production and biological activities. *Microb Cell Factories.* 2023 Jun 8;22(1):110.
91. Gonçalves T, Vasconcelos U. Colour Me Blue: The History and the Biotechnological Potential of Pyocyanin. *Molecules.* 2021 Feb 10;26(4):927.
92. Mani-López E, Arriola-Bretón D, López-Malo A. The impacts of antimicrobial and antifungal activity of cell-free supernatants from lactic acid bacteria in vitro and foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2022 Jan;21(1):604–41.
93. Kjeldgaard B, Neves AR, Fonseca C, Kovács ÁT, Domínguez-Cuevas P. Quantitative High-Throughput Screening Methods Designed for Identification of Bacterial Biocontrol Strains with Antifungal Properties. *Microbiol Spectr.* 10(2):e01433–21.