



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΑΣΟΥΤΗΣ ΔΙΔΑΡΑΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ
ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ**

ΛΑΡΙΣΑ 2023

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ
ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΓΙΑΒΑΣΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Μικροβιολογίας Τροφίμων και Μικροβιακών Ζυμώσεων για Παραγωγή Βιοπολυμερών
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΦΑΝΗ ΧΑΤΖΗΝΑ

Τακτική Ερευνήτρια (Α') Δ/ντρια Ινστιτούτου Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής - Τμήματος Μελισσοκομίας (ΕΛΓΟ «ΔΗΜΗΤΡΑ») Ν. Μουδανιά.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΓΙΑΒΑΣΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Μικροβιολογίας Τροφίμων και Μικροβιακών Ζυμώσεων για Παραγωγή Βιοπολυμερών
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΦΑΝΗ ΧΑΤΖΗΝΑ

Τακτική Ερευνήτρια (Α') Δ/ντρια Ινστιτούτου Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής - Τμήματος Μελισσοκομίας (ΕΛΓΟ «ΔΗΜΗΤΡΑ») Ν. Μουδανιά.

ΠΟΥΡΝΑΡΑΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ

Καθηγητής Ιατρικής Μικροβιολογίας
Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ ΓΡΗΓΟΡΗΣ

Καθηγητής Βιοπληροφορικής με Έμφαση στην Μικροβιολογία
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΑΤΕΡΑΚΗ ΧΡΥΣΑΝΘΗ

Επίκουρη καθηγήτρια Μικροβιολογίας με Έμφαση στην Βιοτεχνολογία
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΑΠΑΧΡΙΣΤΟΦΟΡΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

Επίκουρος καθηγητής Εφαρμοσμένης Μελισσοκομίας,
Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Νικόλαος Ασούτης Διδάρας

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ
ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ**

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΑΣΟΥΤΗΣ ΔΙΔΑΡΑΣ

2023

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

ΠΡΟΚΑΤΑΡΤΙΚΕΣ ΣΕΛΙΔΕΣ: 16

ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΕΛΙΔΩΝ: 149

ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ: 35

ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ: 10

ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΩΝ: 18

ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΩΝ: 0

ΑΡΙΘΜΟΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΠΟΜΠΩΝ: 319

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γύρη που συλλέγεται από τις μέλισσες (ΓΜ) είναι ένα πολύ γνωστό λειτουργικό τρόφιμο που χρησιμοποιείται ευρέως ως διατροφικό συμπλήρωμα αλλά και από την εναλλακτική ιατρική και τη μελισσοθεραπεία για τις σπουδαίες βιολογικές της δράσεις. Το μελισσόψωμο (bee bread) ή αμβροσία (ambrosia, food of the Gods) ή πέργκα (Perga) είναι ένα περιζήτητο μελισσοκομικό προϊόν, ιδίως στις χώρες της Ανατολικής και Κεντρικής Ευρώπης αλλά και σε Ασιατικές χώρες, που στις μέρες μας αναδεικνύεται επίσης σε λειτουργικό τρόφιμο.

Πρόκειται για το μοναδικό ζυμωμένο προϊόν της κυψέλης και προκύπτει από τη γύρη που η μέλισσα συλλέγει, αποθηκεύει σε κελιά κοντά στο γόνο και εμπλουτίζει με νέκταρ ή μέλι εμβολιάζοντάς το ταυτοχρόνως με μικροοργανισμούς του μικροβιώματος της.

Για τη μέλισσα το μελισσόψωμο (ΜΨ) αποτελεί την κύρια πηγή πρωτεϊνών, λιπών, βιταμινών και ιχνοστοιχείων. Η ζύμωση συντηρεί και αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών της γύρης, το δε μικροβίωμα του ΜΨ πιθανά εμπλουτίζει το προϊόν με θρεπτικές και βιοενεργές ουσίες που παράγουν οι μικροοργανισμοί.

Η έρευνα για το ΜΨ ήταν μάλλον περιορισμένη μέχρι τώρα. Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει ένα αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον για τις αντιμικροβιακές ιδιότητες τόσο της γύρης μελισσών όσο και του ΜΨ, λόγω και της αναδυόμενης μικροβιακής ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά που αναπτύσσουν τα παθογόνα. Τόσο η γύρη μελισσών όσο και το ΜΨ παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι διαφόρων παθογόνων, όπως βακτήρια και μύκητες. Όπως συμβαίνει και με άλλα μελισσοκομικά προϊόντα, η έλλειψη ανάπτυξης ανθεκτικότητας των παθογόνων μικροβίων σε αυτά μπορεί να αποδοθεί στη συνέργεια περισσότερων της μιας αντιμικροβιακών ενώσεων εντός της γύρης και του ΜΨ. Επιπλέον, η γύρη μελισσών και το ΜΨ ασκούν στοχευμένη δράση ενάντια στα παθογόνα και επηρεάζουν το μικροβίωμα του ξενιστή λόγω των πρεβιοτικών χαρακτηριστικών τους.

Στο πλαίσιο αυτής της διδακτορικής διατριβής, 18 δείγματα ελληνικού ΜΨ, δύο εκ των οποίων μονοανθικά, καθώς και 2 δείγματα γύρης, συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια διαφορετικών εποχών από διάφορες τοποθεσίες, προσδιορίστηκε η βοτανική τους προέλευση και ελέγχθηκε η βιοδραστικότητά τους.

Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πρώτο στάδιο για τις αντιβακτηριακές τους ιδιότητες, την αντιοξειδωτική τους δράση, τη συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά (TPC) και τη συνολική περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή (TFC). Η αντιμικροβιακή δράση κάθε δείγματος δοκιμάστηκε έναντι των *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* και *S. enterica serotype Typhimurium*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα δείγματα ασκούν ανασταλτική και τα περισσότερα από αυτά βακτηριοκτόνο δράση έναντι τουλάχιστον δύο παθογόνων.

Επιπλέον, όλα τα δείγματα ασκούν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, με το μονοανθικό δείγμα από *Castanea sativa* να επιδεικνύει την πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Ενδιαφέρον είναι ότι δε βρέθηκε ισχυρή συσχέτιση μεταξύ αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης, αλλά οι μέθοδοι μηχανικής μάθησης έδειξαν ότι η μελισσοπαλυνολογική σύνθεση των δειγμάτων είναι καλός προγνωστικός δείκτης της αντιοξειδωτικής τους δράσης.

Σε δεύτερο στάδιο, τα δείγματα ελέγχθηκαν για την *in vitro* αντι-ιική δράση τους έναντι του Εντεροϊού D68. Πραγματοποιήθηκε μια δοκιμασία κυτταροκαλλιέργειας σε συνδυασμό με συγκριτική ανάλυση PCR πραγματικού χρόνου, χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις δείγματος για την αξιολόγηση της αντι-ιικής δράσης. Η μέθοδος MTT εφαρμόστηκε για τον υπολογισμό των επιπέδων τοξικότητας του δείγματος στην κυτταρική καλλιέργεια. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το ελληνικό ΜΨ και η γύρη που συλλέγεται από τις μέλισσες εμφανίζουν ισχυρή αντι-ιική δράση έναντι του EV-D68 με τιμές IC₅₀ που κυμαίνονται από 0,048 έως 5,45 mg/ml.

Αυτή είναι η πρώτη έρευνα παγκοσμίως που διερεύνησε την αντι-ικκή δράση της ΓΜ και του ΜΨ και, με βάση αυτά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, διερευνήθηκε η αντι-ικκή δράση της ΓΜ, του ΜΨ και τεχνητά ζυμωμένης γύρης έναντι του ιού της γρίπης Α (ΙΑV) H1N1.

Σε αυτή τη δεύτερη έρευνα ελέγχθηκαν και τα πρωτεϊνούχα, υδατικά και n-βουτανολικά κλάσματα των δειγμάτων, ώστε να διερευνηθεί και η φύση των αντι-ικών παραγόντων. Επιπλέον, αξιολογήθηκε και η αντι-ικκή δράση τεχνητά ζυμωμένης ΓΜ, στο εργαστήριο, με μικροοργανισμούς που απομονώθηκαν από το ΜΨ, έναντι του ΙΑV (H1N1). Η αντι-ικκή δράση αξιολογήθηκε *in vitro* με συγκριτική ανάλυση PCR πραγματικού χρόνου. Οι τιμές IC₅₀ κυμαίνονταν από 0,022 έως 10,04 mg/ml και οι τιμές του δείκτη επιλεκτικότητας (SI) κυμαίνονταν από 1,06 έως 338,64. Τα τεχνητά ζυμωμένα δείγματα γύρης μελισσών AF5 και AF17 επέδειξαν υψηλότερες τιμές SI από τη μη ζυμωμένη γύρη και τα πρωτεϊνικά κλάσματα έδειξαν τις υψηλότερες τιμές SI. Επιπλέον, το χημικό προφίλ των δειγμάτων ΓΜ και ΜΨ, που αναλύθηκαν με χρήση NMR και LC-MS, αποκάλυψε την παρουσία συγκεκριμένων μεταβολιτών (φλαβονοειδή) που μπορεί να συμβάλλουν στην αντι-ικκή δράση. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η σημαντική αντι-ΙΑV δράση των προϊόντων που ελέγχθηκαν θα μπορούσε να αποδοθεί στη χημική σύνθεση (ιδιαίτερα σε μη ταυτοποιημένες ακόμη πρωτεϊνικές ενώσεις) και πιθανώς σε ουσίες που προκύπτουν από το μεταβολισμό του μικροβιώματος.

Περαιτέρω έρευνα σχετικά με τις αντι-ικές ιδιότητες της ελληνικής γύρης μελισσών και του ΜΨ, θα αποσαφηνίσει τον τρόπο δράσης και θα μπορούσε να οδηγήσει σε νέες θεραπείες κατά του ΙΑV ή άλλων ιογενών ασθενειών.

Διερευνήθηκε επίσης η ικανότητα του ΜΨ να εκριζώνει ή να παρεμποδίζει το σχηματισμό βιοϋμένων, οι οποίοι έχει υπολογιστεί ότι συμμετέχουν στο 80% των λοιμώξεων του ανθρώπινου σώματος. Τα δείγματα ΜΨ που δοκιμάστηκαν έναντι των *Staphylococcus aureus* και *Acinetobacter baumannii*, έδειξαν σημαντική ικανότητα τόσο αναστολής του σχηματισμού όσο και εκρίζωσης των βιοϋμένων. Με βάση τα αποτελέσματα, η αναστολή δημιουργίας βιοϋμένα εξαρτάται από τη συγκέντρωση του δείγματος ΜΨ και το ποσοστό αναστολής ανά δείγμα ποικίλει ανάλογα με το παθογόνο. Μεγαλύτερα ποσοστά αναστολής παρατηρούνται συνολικά έναντι του *Acinetobacter baumannii*. Η εκρίζωση, για το συγκεκριμένο παθογόνο, σε ικανοποιητικά ποσοστά επιτυγχάνεται σε υψηλές συγκεντρώσεις (12,5% και 25%w/v), πολλαπλάσιες των τιμών MIC των δειγμάτων. Για την εκρίζωση του βιοϋμένα του *Acinetobacter baumannii* απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις ΜΨ σε σύγκριση με αυτές που απαιτούνται για την εκρίζωση του βιοϋμένα του *Staphylococcus aureus*.

Αξιολογήθηκε η αντιμικροβιακή δράση απομονωθέντων στελεχών του μικροβιώματος του ΜΨ που ενοφθαλμίστηκαν σε διπλά παστεριωμένη ΓΜ, ως πρώτη ύλη για τεχνητή ζύμωση στερεάς κατάστασης. Η τεχνική της διπλής παστερίωσης, με ενδιάμεσο στάδιο επώασης, επιλέχθηκε προκειμένου να μειωθεί ο πληθυσμός των σπορογόνων βακτηρίων και αυτή είναι η πρώτη έρευνα που χρησιμοποίησε αυτή την τεχνική.

Ο στόχος του πειράματος ήταν να παραχθεί ένα τρόφιμο με καλύτερη αντιμικροβιακή δράση από την αρχική ΓΜ και να μελετηθεί ταυτόχρονα η συμβολή του μικροβιώματος στην αντιμικροβιακή δράση του ΜΨ. Η διπλά παστεριωμένη ΓΜ έχασε την αντιβακτηριδιακή της δράση έναντι της *Salmonella Typhimurium*. Μετά τη ζύμωση, η τεχνητά ζυμωμένη ΓΜ επανέκτησε τη συγκεκριμένη αντιβακτηριακή της δράση, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα βακτήρια του ΜΨ συμβάλλουν στην αντιμικροβιακή δράση του προϊόντος, είτε παράγοντας αντιβακτηριακές ενώσεις είτε απελευθερώνοντας αντιβακτηριακές ενώσεις κατά τη διάσπαση των γυρεοκόκκων. Το είδος της καλλιέργειας εκκίνησης και οι συνθήκες επώασης επηρεάζουν αμφότερα την αντιβακτηριακή δράση της γύρης που έχει υποστεί τεχνητή ζύμωση.

Τέλος, όσον αφορά τη βιοδραστικότητα, αξιολογήθηκε για πρώτη φορά η τεχνητά ζυμωμένη ΓΜ με μικροοργανισμούς του ΜΨ, σε σύγκριση με την ΓΜ που ήταν η πρώτη ύλη για τη ζύμωση, στη βιωσιμότητα μελισσών που εκτρέφονται σε κλωβούς στο εργαστήριο, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

Εκτός όμως από τη βιοδραστικότητα, στόχος αυτής της διατριβής ήταν να διερευνηθεί το μικροβίωμα του ΜΨ, από τα αρχικά στάδια της ζύμωσης της γύρης έως την ωρίμανσή του (ΓΜ από

γυρεοπαγίδα, ΜΨ 1 ημέρας, 11 ημερών, 27 ημερών και 41 ημερών) και να εντοπίσει τις πιο σχετικά άφθονες, μικροβιακές ομάδες χρησιμοποιώντας τόσο μεταταξινομικές (Next Generation Sequencing, NGS) όσο και καλλιεργητικές μεθόδους. Ελάχιστες μελέτες υπάρχουν πάνω στο μικροβίωμα του ΜΨ παρά τις άφθονες ενδείξεις για τη βιοσυνθετική και αντιμικροβιακή του δράση.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το μικροβίωμα της ΓΜ και του ΜΨ περιλαμβάνουν τόσο περιβαλλοντικά όσο και μικρόβια μελισσών. Στην αρχή της ωρίμανσης του ΜΨ η μικροβιακή ποικιλότητα είναι μεγαλύτερη. Η βακτηριακή ποικιλότητα αυξάνεται συνεχώς από την ημέρα 1 έως την ημέρα 27, ενώ στη συνέχεια μειώνεται σταδιακά (ημέρα 27 έως ημέρα 41). Η ποικιλότητα των μυκήτων, μειώνεται σταδιακά από την ημέρα 1 έως την ημέρα 27. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι κατά την ωρίμανση του ΜΨ, η ποικιλότητα του μικροβιώματος κυμαίνεται δυναμικά καταλήγοντας σε μια μάλλον σταθερή δομή μικροβιακών κοινοτήτων. Αλλαγές που επηρεάζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη (παραγωγή μικροβιακών μεταβολιτών, μικροαερόφιλες ή ανοξικές συνθήκες, οξύτητα, μεταβλητά θρεπτικά υποστρώματα και διαθεσιμότητα νερού), ενδέχεται να εμφανιστούν κατά την ωρίμανση του ΜΨ δημιουργώντας ένα εξαιρετικά μεταβλητό περιβάλλον.

Τα Proteobacteria είναι το κυρίαρχο φύλο στη ΓΜ αντιπροσωπεύοντας άνω του 60% των συνολικών μοναδικών λειτουργικών ταξινομικών μονάδων (OTUs). Η αφθονία τους αυξήθηκε γρήγορα μέσα σε 24 ώρες, φτάνοντας σχεδόν το 70% και σταδιακά μειώθηκε από την 11η ημέρα έως την ημέρα 41, επιστρέφοντας περίπου στην αρχική σχετική αφθονία. Η σχετική αφθονία των Firmicutes, που ήταν το δεύτερο σε αφθονία φύλο, αυξήθηκε έως και 20% στο ώριμο ΜΨ. Το γένος *Lactobacillus* αυξήθηκε γρήγορα μέσα στις πρώτες 24 ώρες, υποδεικνύοντας τη συμβολή των λακτοβακίλλων στη διαδικασία της ζύμωσης ιδιαίτερα στην αρχή. Αξίζει να σημειωθεί ότι λακτοβάκιλοι βρίσκονται επίσης στο ώριμο ΜΨ 41 ημερών, υποδεικνύοντας την προσαρμογή τους σε αυτό το περιβάλλον. Η δράση των λακτοβακίλλων είναι σημαντική για τη συντήρηση του ΜΨ λόγω της αντιμικροβιακής τους δράσης.

Όσον αφορά τους μύκητες, τα Ascomycota ήταν το πιο άφθονο φύλο, το οποίο αντιστοιχούσε σχεδόν στο 100% των σχετικών OTU σε ΜΨ ηλικίας 27 ημερών. Το *Zygosaccharomyces* ήταν το πιο άφθονο γένος καθώς ανέρχεται στο 99,58% των σχετικών OTU σε ΜΨ ηλικίας 27 ημερών. Τα Basidiomycota είναι η δεύτερη σε αφθονία μυκητιακή ομάδα, που μειώθηκε σταδιακά από 20% των σχετικών OTU σε γύρη μιας ημέρας σε 0% στο 27 ημερών ΜΨ.

Τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από ΜΨ εξετάστηκαν για την αντιβακτηριακή τους δράση έναντι των παθογόνων *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium* και *K. Pneumoniae*. Από 309 βακτηριακά απομονωμένα στελέχη, 42 εμφάνισαν αντιβακτηριακή δράση έναντι του στελέχους MRSA 1552 του *S. aureus*, 34 έναντι του ανθεκτικού στην καρβαπενέμη στελέχους *P. aeruginosa* 1773, 47 έναντι του *S. Typhimurium* και 43 κατά του *K. pneumoniae*. Επιλέχθηκαν για ταυτοποίηση στελέχη που άσκησαν αντιβακτηριακή δράση κατά τουλάχιστον δύο παθογόνων και ταυτόχρονα παρήγαγαν διάφορα ένζυμα. Εντοπίστηκαν επτά στελέχη που άσκησαν αντιβακτηριακή δράση έναντι ενός παθογόνου και τρία στελέχη που δεν ασκούν καμία αντιβακτηριακή δράση αλλά ήταν σε θέση να παράγουν διάφορα ένζυμα.

Έναντι 2 παθογόνων έδειξαν αντιβακτηριακή δράση 4 απομονωμένα βακτηριακά στελέχη, έναντι τριών παθογόνων 38 στελέχη και έναντι και των τεσσάρων παθογόνων έδειξαν αντιβακτηριδιακή δράση 23 απομονωμένα στελέχη. Τα στελέχη *Apilactobacillus* και *Fructobacillus* άσκησαν υψηλή αντιβακτηριακή δράση έναντι Gram-αρνητικών παθογόνων αλλά χαμηλότερη αντιβακτηριακή δράση έναντι του Gram-θετικού *S. aureus*. Τα απομονωμένα στελέχη *Bacillus* έδειξαν αντιβακτηριακή δράση κυρίως κατά του *S. aureus*, αν και ορισμένα άσκησαν αντιβακτηριακή δράση έναντι Gram-αρνητικών παθογόνων. Όσον αφορά τις ζύμες, στελέχη του *Z. siamensis* έδειξαν αντιβακτηριδιακή δράση έναντι της *Salmonella Typhimurium*.

Βακτήρια που απομονώθηκαν από το ΜΨ στο εργαστήριό μας έδειξαν θετικό φαινότυπο όσον αφορά την έκκριση κυτταρινασών, αμυλασών και πρωτεΐνασών. Επιπλέον, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που αποκάλυψε θετικούς φαινοτύπους σχετικά με την έκκριση ημικυτταρινασών, ενζύμων αποικοδόμησης χρωστικών Coomassie Brilliant Blue G ή R και ενζύμων αποικοδόμησης χρωστικής Green Malachite από βακτήρια απομονωμένα από ΜΨ.

Από 309 βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από ΜΨ, 41 παρήγαγαν ημικυτταρινάσες, 13 κυτταρινάσες, 39 αμυλάσες, 132 πρωτεϊνάσες, 85 ένζυμα αποικοδόμησης βαφής Coomassie brilliant blue G ή R και 72 ένζυμα αποικοδόμησης βαφής Green Malachite. Όλα τα αναγνωρισμένα στελέχη παρήγαγαν περισσότερα από ένα από τα παραπάνω ένζυμα.

Η παραγωγή ενζύμων αποικοδόμησης λιγνίνης (λακάσες ή οξειδάσες) από τα βακτήρια του ΜΨ τους παρέχει την ικανότητα να αποικοδομούν την εξίνη (το εξωτερικό στρώμα των γυρεοκόκκων). Επίσης, η παραγωγή κυτταρινασών είναι ζωτικής σημασίας για την αποικοδόμηση της ιντίνης (το εσωτερικό στρώμα των κόκκων γύρης) η οποία κατασκευάζεται κυρίως από κυτταρίνη. Η ικανότητα των βακτηρίων του ΜΨ να διασπούν τους γυρεοκόκκους είναι απαραίτητη προκειμένου να απελευθερωθούν τα θρεπτικά συστατικά και οι βιοδραστικές ενώσεις που περιλαμβάνονται σε αυτούς.

Τέλος, επειδή στην εποχή μας οι μέλισσες αντιμετωπίζουν νέες προκλήσεις (από την κλιματική κρίση έως τα φυτοφάρμακα και παθογόνα όπως το *Vairimorpha ceranae*) ελέγχθηκε το κατά πόσο τυχόν αλλαγές στη δομή και την αφθονία των μικροβιακών κοινοτήτων του ΜΨ και του εντέρου των μελισσών μπορούν να χρησιμεύσουν ως προγνωστικοί δείκτες για την επιβίωση ή μη του μελισσιού. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε μια μεταταξινομική προσέγγιση για να διερευνήσουμε εάν το *V. ceranae* επηρεάζει το εντερικό μικροβίωμα (βακτήρια και μύκητες) των ενήλικων μελισσών *A. mellifera* καθώς και το μικροβίωμα του ΜΨ, σε αποικίες που παρουσιάζουν σοβαρή μόλυνση από *V. ceranae* (σπόρια >2.500.000 ανά μέλισσα) σε σύγκριση με αποικίες που παρουσιάζουν πολύ χαμηλό αριθμό σπορίων (<40.000 ανά μέλισσα).

Η ανάλυση αποκάλυψε μια σημαντική τάση μείωσης της μικροβιακής ποικιλότητας που αντικατοπτρίζεται από τον αριθμό των παρατηρούμενων OTUs, τόσο σε βακτήρια όσο και σε μύκητες, σε δείγματα εντέρου μελισσών και ΜΨ. Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν σε επίπεδο φύλου. Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι το *Podosphaera spp.* απουσίαζε σε δείγματα ΜΨ που συλλέχθηκαν από αποικίες με υψηλό αριθμό σπορίων, ενώ η σχετική αφθονία των *Blumeria spp.* μειώθηκε σημαντικά. Είναι ενδιαφέρον ότι η σχετική αφθονία *Rosenbergiella spp.* αυξήθηκε σε δείγματα ΜΨ που συλλέχθηκαν από αποικίες με υψηλό αριθμό σπορίων. Αν και απαιτείται περαιτέρω έρευνα, η συνολική μειωμένη μικροβιακή ποικιλότητα και η σχετική αφθονία ορισμένων μικροβιακών ομάδων μπορεί να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες κατάρρευσης αποικιών μελισσών.

Συνολικά τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, υποδεικνύουν ότι η ελληνική γύρη μελισσών και το ΜΨ αποτελούν σημαντικά λειτουργικά τρόφιμα με υψηλή βιοδραστικότητα. Πέρα από τα οφέλη στην ανθρώπινη υγεία από την κατανάλωσή τους, μπορούν να χρησιμεύσουν ως πηγή νέων αντιμικροβιακών ενώσεων και ενζύμων και να αποτελέσουν τη βάση για καινοτόμα λειτουργικά τρόφιμα. Ιδιαίτερα η τεχνητή ζύμωση της γύρης με μικροοργανισμούς του ΜΨ θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και για την ανάπτυξη καινοτόμων τροφίμων και για την δημιουργία προβιοτικών σκευασμάτων για τη μέλισσα.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση μιας διδακτορικής διατριβής απαιτεί πάντα μεγάλη προσπάθεια, πολύ χρόνο και αφοσίωση στο αντικείμενο της έρευνας και πολύ περισσότερο όταν ξεκινάει κανείς στα 53 του χρόνια, όντας εργαζόμενος και οικογενειάρχης.

Οι πρότερες σπουδές μου στην Κτηνιατρική Σχολή του ΑΠΘ, η εργασία μου ως επιθεωρητής τροφίμων στον ΕΦΕΤ και η ενασχόλησή μου με τις μέλισσες, από το 1996 που είμαι μελισσοκόμος, μου παρείχαν το υπόβαθρο, το πλαίσιο και την έμπνευση που χρειαζόμουν για να προτείνω το θέμα της διατριβής μου. Για την ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας συνέβαλαν πολλοί άνθρωποι.

Οφείλω πολλά στην καθοδήγηση και την υποστήριξη του επιβλέποντα της διατριβής μου Δημήτριο Μόσιαλο, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του ΠΘ. Τον ευχαριστώ θερμά που ενέκρινε και βοήθησε να διαμορφωθεί η πρόταση για μια διδακτορική διατριβή πάνω σε ένα σχετικά άγνωστο προϊόν της μέλισσας. Με εμπιστεύτηκε να τη φέρω εις πέρας, υποστήριξε την προσπάθεια με κάθε τρόπο, ηθικά, υλικά και επιστημονικά και καθοδήγησε τις προσπάθειές μου να πετύχω τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ.

Μεγάλη ήταν η συμβολή και η αρωγή και των δυο άλλων μελών της τριμελούς επιτροπής, του Ιωάννη Γιαβάση, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του ΠΘ και της Φανής Χατζήνα, Τακτικής Ερευνήτριας (Α') και Διευθύντριας του Ινστιτούτου Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής - Τμήματος Μελισσοκομίας ΕΛΓΟ «ΔΗΜΗΤΡΑ». Τους ευχαριστώ για τις συμβουλές τους, την ερευνητική και επιστημονική συνδρομή τους τις παρατηρήσεις τους και τις γνώσεις που μου μετέδωσαν.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου που μοιράστηκαν μαζί μου τις γνώσεις τους και με στήριξαν σε αυτή την προσπάθεια αλλά και για το φιλικό και παραγωγικό περιβάλλον που δημιούργησαν. Κάθε επιστημονική μελέτη είναι καρπός ομαδικής δουλειάς και αισθάνομαι τυχερός που ανήκα στην ομάδα του εργαστηρίου Μικροβιακής Βιοτεχνολογίας – Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του ΠΘ. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Τηλέμαχο Δημητρίου για τη σημαντική συνεχή επιστημονική συμβολή του, επίσης τους διδάκτορες Χριστίνα Τσαδήλα, Ιωάννη Καφαντάρη, Μαρία Δάσκου, καθώς και όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές με τους οποίους συνεργάστηκα.

Για την επιστημονική συμβολή τους και την αγαστή συνεργασία ευχαριστώ τον κ. Γρηγόριο Αμούτζια Καθηγητή Βιοπληροφορικής και τον κ. Δημήτριο Στάγκο Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας - Βιοτεχνολογίας του ΠΘ. Πρέπει επίσης να επισημάνω την καθοριστική συμβολή του Εργαστηρίου Βιοπληροφορικής και του υποψηφίου διδάκτορα Μάριου Νικολαΐδη τον οποίο ευχαριστώ.

Για την εξαιρετική συνεργασία και τη συμβολή τους στην ερευνητική προσπάθεια, ευχαριστώ την Ελένη Σκαλτσά Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του ΕΚΠΑ, καθώς και τη διδάκτορα Χριστίνα Μπάρδα.

Ευχαριστώ το Τμήμα Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας για την ευκαιρία που μου έδωσε. Ειδικότερα ευχαριστώ τη Γραμματεία του Τμήματος και τις κυρίες Αναστασία Παπαδοπούλου και Ιωάννα Στρούλια για τη συνεργασία και καθοδήγηση σε διάφορα θέματα.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Καθηγητή μου Βασίλειο Λιάκο που για πρώτη φορά με έφερε σε επαφή με τη μέλισσα, αυτό τον εκπληκτικό οργανισμό, όχι μόνο μέσα από το μάθημα της μελισσοπαθολογίας αλλά και άμεσα, στο μελισσοκομείο που ο ίδιος είχε στήσει δίπλα στην Κτηνιατρική Σχολή του ΑΠΘ. Αυτή η πρώτη επαφή ήταν καθοριστική για τη συνέχεια.

Ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη της επταμελούς επιτροπής για το χρόνο που αφιέρωσαν στην ολοκλήρωση της προβλεπόμενης διαδικασίας, τις συμβουλές και τις παρατηρήσεις τους για την επίτευξη του καλύτερου δυνατού αποτελέσματος.

Ευχαριστώ την Υπηρεσία μου, τον ΕΦΕΤ, για την έγκριση της εκπαιδευτικής μου άδειας και συγκεκριμένα τις διοικήσεις επί προεδρίας Πολυχρόνη Πολυχρονίου και Αντωνίου Ζαμπέλα, τον Γενικό Δ/ντη Παναγιώτη Βασιλόπουλο και τη διευθύντρια της Περιφερειακής Διεύθυνσης Θεσσαλίας του ΕΦΕΤ, Σοφία Παπαδήμα, για την υποστήριξη και ενθάρρυνση. Επίσης όλους τους συναδέλφους μου επιθεωρητές και το τμήμα Διοικητικού.

Ευχαριστώ την οικογένειά μου για την ποικιλότητα στήριξη και εμπύχωση και ιδιαίτερα τη σύζυγό μου, Κατερίνα Καρατάσου, η οποία ήταν συνεχώς δίπλα μου σε όλη αυτή την προσπάθεια, από τη διαμόρφωση της ιδέας μέχρι την ολοκλήρωση της μελέτης, τόσο ηθικά όσο και έμπρακτα ως μέλος της ομάδας.

Ευχαριστώ τους γονείς μου για την ενθάρρυνσή τους σε κάθε στάδιο της ζωής μου και τα εφόδια που μου παρείχαν ώστε να φτάσω μέχρι εδώ.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους μελισσοκόμους από όλη την Ελλάδα και τα Κέντρα Μελισσοκομίας Λάρισας, Κρήτης, Δυτικής Μακεδονίας, Στερεάς Ελλάδας και Πελοποννήσου που έστειλαν τα δείγματα για να πραγματοποιηθεί αυτή η διατριβή, η οποία ελπίζω να συμβάλλει στην πρόοδο της ελληνικής μελισσοκομίας μέσα από την ανάδειξη της βιολογικής αξίας του ελληνικού μελισσόψωμου για την υγεία των μελισσών και του ανθρώπου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α. ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
Α.1. ΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΗΣ ΜΕΛΙΣΣΑΣ	1
Α.2. ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΓΥΡΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ	4
Α.3. ΤΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ ΤΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ	8
Α.4. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	11
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ Α	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β. ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ, ΤΗΣ ΓΥΡΗΣ ΤΩΝ ΜΕΛΙΣΣΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΤΑ ΖΥΜΩΜΕΝΗΣ ΓΥΡΗΣ	20
Β.1. ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ – ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΕΚΡΙΖΩΣΗ ΒΙΟΪΜΕΝΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.....	20
Β.1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	20
Β.1.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
Β.1.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ –ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β2. ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΥΡΗΣ ΤΩΝ ΜΕΛΙΣΣΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΤΑ ΖΥΜΩΜΕΝΗΣ ΓΥΡΗΣ ΤΩΝ ΜΕΛΙΣΣΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ- ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΤΑ ΖΥΜΩΜΕΝΗΣ ΓΥΡΗΣ ΣΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΡΓΑΤΡΙΩΝ ΜΕΛΙΣΣΩΝ (<i>Apis mellifera</i>)	47
Β.2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	47
Β.2.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	48
Β.2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	50
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΩΝ Β.1 & Β.2	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β.3. ΑΝΤΙ-ΙΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ ΤΗΣ ΓΥΡΗΣ ΤΩΝ ΜΕΛΙΣΣΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΤΑ ΖΥΜΩΜΕΝΗΣ ΓΥΡΗΣ.....	57
Β.3.1. ΑΝΤΙ-ΙΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΓΥΡΗΣ ΤΩΝ ΜΕΛΙΣΣΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΪΟΥ EV D68	57
Β.3.1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	57
Β.3.1.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	57
Β.3.1.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	60

B.3.2. ANTI-ΙΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ, ΤΗΣ ΓΥΡΗΣ ΤΩΝ ΜΕΛΙΣΣΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΤΑ ΖΥΜΩΜΕΝΗΣ ΓΥΡΗΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΪΟΥ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ Α Η1Ν1	63
B.3.2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	63
B.3.2.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	63
B.3.2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	70
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ Β.3	77
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ	81
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ.1. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ – ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ - ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ	81
Γ.1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	81
Γ.1.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	83
Γ.1.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	89
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ Γ.1	107
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΑΠΟ <i>Vairimorpha (Nosema) ceranae</i> ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ ΤΗΣ ΜΕΛΙΣΣΑΣ (<i>Apis mellifera</i>) ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ	111
Γ.2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	111
Γ.2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	112
Γ.2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	114
Γ.2.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	121
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ Γ.2	124
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	127
ABSTRACT	130
Παράρτημα δημοσιεύσεων	133

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Συστατικά μελισσοκομικών προϊόντων που επιδεικνύουν αντιμικροβιακή δράση.....	4
Πίνακας 2. Μεταβολίτες με αντιμικροβιακή δράση που έχουν απομονωθεί από ΓΜ και τρόπος δράσης τους	21
Πίνακας 3. Δείγματα ΜΨ, βοτανική και γεωγραφική προέλευση, εποχή και έτος δειγματοληψίας	24
Πίνακας 4. Παλυνολογική ανάλυση δειγμάτων ΜΨ.....	32
Πίνακας 5. Τιμές MIC and MBC εκφρασμένες σε mg/ml	36
Πίνακας 6. Τιμές δοκιμών TPC, TFC, DPPH και ABTS ^{•+} για τα δείγματα του ΜΨ.....	38
Πίνακας 7. Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης (r) υπολογίστηκαν από την ανάλυση συσχέτισης μεταξύ των τιμών των TPC, TFC, DPPH και ABTS ^{•+} των δειγμάτων του ΜΨ.....	39
Πίνακας 8. Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης (r) υπολογίστηκαν από την ανάλυση συσχέτισης μεταξύ των τιμών των TPC, TFC, DPPH and ABTS ^{•+} και των τιμών MIC και MBC έναντι των τεσσάρων παθογόνων.....	40
Πίνακας 9. Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης (r) υπολογίστηκαν από την ανάλυση συσχέτισης μεταξύ των τιμών των TPC, TFC, της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας (τιμές IC ₅₀ DPPH και ABTS ^{•+}) και της αντιμικροβιακής δραστηριότητας (τιμές MIC και MBC) σε σχέση με τις κυρίαρχες οικογένειες των γυρεόκοκκων για το σύνολο των δειγμάτων	41
Πίνακας 10. Δοκιμές διάχυσης σε άγαρ έναντι του <i>S. aureus</i> . Χρησιμοποιήθηκαν πρωτεϊνικά κλάσματα δειγμάτων ΜΨ και πρωτεϊνικά κλάσματα επεξεργασμένα με πρωτεϊνάση-K. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και το υπερκείμενο μετά την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών	43
Πίνακας 11. Ποσοστό αναστολής σχηματισμού βιοϋμένα σε καλλιέργειες <i>Staphylococcus aureus</i> ανά δείγμα ΜΨ. Η αναστολή υπολογίστηκε για συγκεντρώσεις ίσες με το μισό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) και το ένα τέταρτο της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) των δειγμάτων	44
Πίνακας 12. Ποσοστό αναστολής σχηματισμού βιοϋμένα σε καλλιέργειες <i>Acinetobacter baumannii</i> ανά δείγμα ΜΨ. Η αναστολή υπολογίστηκε για συγκεντρώσεις ίσες με το μισό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) και το ένα τέταρτο της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) των δειγμάτων	44
Πίνακας 13. Ποσοστό εκρίζωσης (%) βιοϋμένα σε καλλιέργεια <i>S. aureus</i> που προκαλείται από διαφορετικές συγκεντρώσεις ΜΨ.....	46
Πίνακας 14. Ποσοστό εκρίζωσης βιοϋμένα (%) σε καλλιέργεια <i>A. baumannii</i> που προκαλείται από διαφορετικές συγκεντρώσεις ΜΨ	46
Πίνακας 15. Τιμές MIC και MBC από τεχνητά ζυμωμένα δείγματα ΓΜ	51
Πίνακας 16. Ποσοστό επιβίωσης, μέσος όρος (ΜΟ) βιωσιμότητας και τυπική απόκλιση (SD) ανά δείγμα τεχνητά ζυμωμένης γύρης σε διάστημα 14 ημερών	52
Πίνακας 17. Παλυνολογική ανάλυση και βοτανική προέλευση των δειγμάτων ΓΜ	58
Πίνακας 18. Γεωγραφική προέλευση, βοτανική προέλευση και αντικό προφίλ (τιμές CC ₅₀ , IC ₅₀ και SI) δειγμάτων ΜΨ και ΓΜ	61
Πίνακας 19. Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης (r) υπολογίστηκαν από τη συσχέτιση των τιμών CC ₅₀ , IC ₅₀ και SI με τα τα ποσοστά συμμετοχής των κυρίαρχων φυτικών οικογενειών που ανιχνεύθηκαν από την παλυνολογική ανάλυση σε κάθε δείγμα	62

Πίνακας 20. Περιγραφή των δειγμάτων που δοκιμάστηκαν ενάντια στον ιό IAV H1N1	64
Πίνακας 21. Τιμές CC ₅₀ , IC ₅₀ των δειγμάτων εκφρασμένες σε mg/ml και τιμές SI	70
Πίνακας 22. Ανάλυση LC-MS των βουτανολικών κλασμάτων (δείγματα 1-BB-Bu, 4-BB-Bu και 6P-BCP-Bu).....	74
Πίνακας 23. Βοτανική προέλευση, τοποθεσία και μήνας συγκομιδής δειγμάτων ΓΜ και ΜΨ.....	84
Πίνακας 24. Στατιστικά στοιχεία πρωτογενών δεδομένων ανάλυσης NGS	89
Πίνακας 25. Δείκτες α-ποικιλότητας ανά δείγμα	90
Πίνακας 26. Δείκτης Jaccard (δείκτης β-ποικιλότητας) για βακτήρια	91
Πίνακας 27. Δείκτης Jaccard (δείκτης β-ποικιλότητας) για μύκητες	91
Πίνακας 28. Βακτηριακές οικογένειες/γένη και η % σχετική αφθονία τους	95
Πίνακας 29. Οικογένειες/γένη μυκήτων και η σχετική % αφθονία τους	96
Πίνακας 30. Αντιβακτηριακή δράση στελεχών <i>Apilato bacillus</i> και <i>Fructobacillus</i>	103
Πίνακας 31. Αντιβακτηριακή δράση και βιοσυνθετικό δυναμικό βακτηρίων απομονωμένων από ΜΨ	104
Πίνακας 32. Αριθμός κυψέλης, μέσος αριθμός σπορίων ανά μέλισσα, προσδιορισμός δείγματος και ομαδοποίηση δειγμάτων για μεταταξινομική ανάλυση	114
Πίνακας 33. Δείκτες α-ποικιλότητας και δείκτης goods coverage για τη 16S περιοχή	115
Πίνακας 34. Δείκτες α-ποικιλότητας και δείκτης goods coverage για την ITS περιοχή	116
Πίνακας 35. Μέση μεταβλητότητα των ταξινομικών κατηγοριών στις τέσσερις ομάδες δειγμάτων (A–D) με βάση το 16S rRNA και την περιοχή ITS	119

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Γυρεόκοκκοι <i>Castanea sativa</i>	31
Εικόνα 2. Άνθη καστανιάς	31
Εικόνα 3. 16S καμπύλες κορεσμού	89
Εικόνα 4. ITS καμπύλες κορεσμού	90
Εικόνα 5. Φύλλα και κλάσεις βακτηρίων που ανιχνεύθηκαν με τη χρήση NGS στα δείγματα S1 - S9	92
Εικόνα 6. Φύλλα και κλάσεις μυκήτων που ανιχνεύθηκαν με τη χρήση NGS στα δείγματα S1 - S9	93
Εικόνα 7. Βιοσυνθετική ικανότητα βακτηριακών στελεχών μελισσόψωμου.....	99
Εικόνα 8. Λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (OTUs): (α) βακτηριακά είδη (Observed species) και (β) μυκητιακά είδη (Observed species) είδη στις ομάδες (Group) A, B, C και D	116
Εικόνα 9. Κατασκευή δέντρου απεικόνισης OTU για κάθε ομάδα δειγμάτων A, B, C και D	117
Εικόνα 10. Κατασκευή δέντρου απεικόνισης OTU για κάθε ομάδα δειγμάτων (A–D), που δημιουργήθηκε με βάση την ITS περιοχή μυκήτων, (α–δ) αντίστοιχα	120

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΩΝ

Φωτογραφία 1. Γύρη μελισσών (ΓΜ) συλλεγμένη από γυρεοπαγίδα εισόδου	2
Φωτογραφία 2. Πλαίσιο με γόνο (σφραγισμένο κυρίως και ελάχιστο ασφράγιστο που φαίνεται λευκός), ΜΨ (τέλη άνοιξης με κύρια πηγή τη λαδανιά) και λίγο μέλι	3
Φωτογραφία 3. Συλλεκτρια μέλισσα με ευδιάκριτο το μπαλάκι γύρης που μεταφέρει	3
Φωτογραφία 4. Βιοϋμένας <i>S. aureus</i> σε καθετήρα	22
Φωτογραφία 5. Δειγματοληψία μελισσόψωμου από την κηρήθρα.....	23
Φωτογραφία 6. <i>Erica arborea</i>	40
Φωτογραφία 7. Δοκιμή αναστολής δημιουργίας βιοϋμένα έναντι του <i>S.aureus</i>	45
Φωτογραφία 8. Ηλεκτρονική μικρογραφία μιας λεπτής τομής πολυάριθμων, σφαιρικών ιϊκών σωματιδίων του Εντεροϊού EV-D68	56
Φωτογραφία 9. Σωματίδια του ιού της γρίπης A H1N1	69
Φωτογραφία 10. Εγκάρσια τομή κελιών με μελισσόψωμο	88
Φωτογραφία 11. Αντιβακτηριακή δοκιμή απιλακτοβακίλλων του μελισσόψωμου (320, 330, 329) έναντι τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων	98
Φωτογραφία 12. Διάσπαση κόκκων ημικυτταρίνης και απελευθέρωση μπλε χρωστικής	99
Φωτογραφία 13. Παραγωγή καφέ χρωστικής από τη διάσπαση της γουαϊακόλης	100
Φωτογραφία 14. Διάσπαση χρωστικής Malachite Green	101
Φωτογραφία 15. Διάσπαση κόκκων κυτταρίνης και απελευθέρωση χρωστικής	102
Φωτογραφία 16. Διάσπαση αμύλου από βακτηριακή αμυλάση (φωτεινές περιοχές)	102
Φωτογραφία 17. Μελίσσι που κατέρρευσε μετά από νόσηση που προκάλεσε η <i>V. ceranae</i>	123
Φωτογραφία 18. Μελισσόψωμο ακριβώς πλάι στο γόνο για άμεση κατανάλωση από τις παραμάνες μέλισσες	129

A. ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1. ΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΗΣ ΜΕΛΙΣΣΑΣ ΚΑΙ ΟΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥΣ

Τα προϊόντα της μέλισσας (μέλι, ΓΜ, ΜΨ, βασιλικός πολτός, πρόπολη, δηλητήριο μέλισσας, κερι μέλισσας) χρησιμοποιούνται ευρέως από την αρχαιότητα σε παραδοσιακές θεραπείες. Στις μέρες μας υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα προϊόντα μελισσών, τη βιοδραστικότητά τους και την εφαρμογή τους στην εναλλακτική ιατρική και τη μελισσοθεραπεία.

Το **μέλι** ασκεί αντιβακτηριακή [1,2,3] και αντιμυκητιακή [4] δράση *in vitro*, αλλά αυτές οι ιδιότητες εμφανίζουν μεγάλη διακύμανση μεταξύ των διαφορετικών τύπων μελιού [5]. Αυτές οι βιολογικές ιδιότητες αποδίδονται σε φυσικούς και χημικούς παράγοντες όπως το χαμηλό pH, η υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα (υψηλή ωσμωτικότητα), η παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου από την ενεργοποίηση της οξειδάσης της γλυκόζης και επιπλέον σε άλλες χημικές ενώσεις, όπως η μεθυλγλυοξάλη, το 3-φαινυλογαλακτικό οξύ (PLA), η ντεφενσίνη των μελισσών, οι Κύριες Πρωτεΐνες του Βασιλικού Πολτού (Major Royal Jelly Proteins, MRJPs) και βακτηριοσίνες [5]. Βιολογικοί παράγοντες όπως το μικροβίωμα του μελιού μπορεί να συμβάλλουν σε αυτές τις ιδιότητες, αν και ο ρόλος του δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Το μέλι ασκεί αντιφλεγμονώδη δράση που μπορεί να μειώσει γρήγορα τον πόνο και τη φλεγμονή, συμβάλλοντας έτσι στην επούλωση των πληγών [6]. Επίσης παρουσιάζει ποικίλες αντιοξειδωτικές ιδιότητες ανάλογα με τη βοτανική του προέλευση. Διαφορετικοί τύποι μελιού αναφέρεται ότι παρουσιάζουν αντικαρκινικές ιδιότητες [8,9,10,11]. Επιπλέον, το μέλι θεωρείται ως πρεβιοτική τροφή που επηρεάζει θετικά το ανθρώπινο μικροβίωμα και την υγεία [12,13,14].

Η **πρόπολη** αποτελείται κυρίως από ρητίνες που συλλέγουν οι μέλισσες από το εξίδρωμα που βρίσκεται στους οφθαλμούς των δέντρων ή άλλες βοτανικές πηγές, οι οποίες στη συνέχεια αναμιγνύονται με αδενικές εκκρίσεις της μέλισσας και κερι μέσα στην κυψέλη. Χρησιμοποιείται για τη σφράγιση ρωγμών και στενών ανοιγμάτων, για την προστασία της κυψέλης από εισβολείς ή κρύες καιρικές συνθήκες. Ακόμα πιο σημαντική είναι η χρήση της πρόπολης για απολύμανση, αφού οι μέλισσες επαλείφουν τα τοιχώματα της φωλιάς και τα κελιά της κηρήθρας με πρόπολη πριν χρησιμοποιηθούν είτε για εκτροφή γόνου είτε για αποθήκευση τροφής. Η χρήση της πρόπολης από το μέλισσι μπορεί να θεωρηθεί ως παράγοντας κοινωνικής ανοσίας [15]. Η πρόπολη παρουσιάζει μια ποικιλία βιολογικών ιδιοτήτων, συμπεριλαμβανομένων αντιβακτηριακών, αντιμυκητιακών, αντι-ικών καθώς και αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων [16,17].

Ο **βασιλικός πολτός** (ΒΠ) παράγεται από τους υποφαρυγγικούς αδένες πολύ νεαρών μελισσών που ονομάζονται παραμάνες. Είναι η μόνη τροφή για τη βασίλισσα μέλισσα. Οι παραμάνες μέλισσες τρέφουν με ΒΠ τις νεαρές προνύμφες, τους νεαρούς κηφήνες και τις συλλέκτριες της αποικίας [18]. Ο βασιλικός πολτός είναι γνωστός για την αντιφλεγμονώδη και ανοσορυθμιστική του δράση [19]. Επιπλέον, τα συστατικά του βασιλικού πολτού όπως το trans-10-υδροξυ-2-δεκενοϊκό οξύ, η ρογιαλιζίνη (royalisin), οι Κύριες Πρωτεΐνες του Βασιλικού Πολτού (MRJPs) και τα προϊόντα διάσπασής τους, οι ζελεΐνες, καθώς και η οξειδάση της γλυκόζης συμβάλλουν στην αντιμικροβιακή του δράση κατά βακτηρίων, μυκήτων και ιών [20,21,22].

Το **δηλητήριο** της μέλισσας (BV) είναι γνωστό ότι ασκεί αντιμικροβιακή [23], αντιφλεγμονώδη [24], νευροπροστατευτική [25] και αντικαρκινική [26] δράση. Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του δηλητηρίου έχουν αποδειχθεί *in vitro* και *in vivo* έναντι βακτηρίων, ιών και μυκήτων [23]. Έχουν επίσης αναφερθεί συνεργιστικές θεραπευτικές αλληλεπιδράσεις του δηλητηρίου με αντιβιοτικά [23,28]. Επιπλέον, το δηλητήριο δρα ενάντια σε τρυπανοσώματα [29] και φαίνεται ότι αποτρέπει τον θάνατο των νευρικών κυττάρων που προκαλείται από πεπτιδία prion [30].

Το **κερί** της μέλισσας έχει επίσης αναφερθεί ότι ασκεί αντιμικροβιακή δράση [31] αλλά η σχετική βιβλιογραφία είναι πολύ περιορισμένη.



Φωτογραφία 1. Γύρη μελισσών (ΓΜ) συλλεγμένη από γυρεοπαγίδα εισόδου. Τα διαφορετικά χρώματα σηματοδοτούν διαφορετική βοτανική προέλευση. Φωτογραφία: Κατερίνα Καρατάσου

Η γύρη που συλλέγεται από τις μέλισσες (ΓΜ) και το **μελισσόψωμο** (ΜΨ) εκτιμώνται κυρίως για την υψηλή διατροφική τους αξία. Και τα δύο προϊόντα είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, απαραίτητα αμινοξέα, σάκχαρα, λιπαρά οξέα (συμπεριλαμβανομένων των ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων), βιταμίνες, μακροστοιχεία και μικροστοιχεία. Επιπλέον, θεωρούνται λειτουργικά τρόφιμα κυρίως επειδή είναι πλούσια σε πολυφαινολικές ενώσεις και παρουσιάζουν σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Περιέχουν επίσης μια μεγάλη ποικιλία άλλων ενώσεων που προάγουν την υγεία και απαντώνται σε λειτουργικά τρόφιμα, όπως πρεβιοτικά, προβιοτικά, φυτικές ίνες, λιγνάνες, τριτερπένια, καροτενοειδή, βιοενεργά πεπτιδία και οργανικά οξέα [32,33,34,35,36]. Η συμπλήρωση του σιτηρεσίου παραγωγικών ζώων και πουλερικών με ΓΜ ενίσχυσε την ανάπτυξη, την ανοσοαπόκριση και την ποιότητα του σφαγίου και θεωρήθηκε εξαιρετικό υποκατάστατο των αντιβιοτικών [37]. Σε πολλές χώρες εφαρμόζονται η χρήση της ΓΜ και του ΜΨ στη μελισσοθεραπεία ή σε άλλους τύπους συμπληρωματικής ιατρικής για μια μεγάλη ποικιλία διαταραχών και παθήσεων [35,38,39,40].

Η ΓΜ είναι η μόνη πηγή πρωτεΐνης και λιπιδίων και η κύρια πηγή μακρο- και μικρο- στοιχείων για το μέλισσι, ενώ το νέκταρ ή το μελίτωμα (επεξεργασμένο και αποθηκευμένο ως μέλι) είναι η κύρια πηγή υδατανθράκων [41]. Μικρότερες ποσότητες ΓΜ αποθηκεύονται στην κυψέλη σε σύγκριση με το μέλι και εξαντλούνται γρήγορα σε περιόδους ελάχιστης ή καθόλου ανθοφορίας [42,43]. Μια αποικία μπορεί να συλλέξει από 10 έως και 26 κιλά γύρης ετησίως [44].

Ο όρος «**μελισσόψωμο**» αναφέρεται στη συλλεγόμενη γύρη που, αφού την επεξεργαστούν οι μέλισσες, αποθηκεύεται και ζυμώνεται στην κηρήθρα. Οι συλλέκτριες μέλισσες ξεφορτώνουν τα σφαιρίδια γύρης που φέρνουν στην κυψέλη απευθείας στα άδεια κελιά της κηρήθρας που βρίσκονται μεταξύ των κελιών εκτροφής του γόνου και των κελιών που αποθηκεύεται το μέλι, σχηματίζοντας έτσι μια τυπική «ζώνη μελισσόψωμου» που διατίθεται για άμεση κατανάλωση από τις παραμάνες μέλισσες. Οι συλλέκτριες χρησιμοποιούν το νέκταρ που αναρροφούν από τον πρόλοβό τους για να συγκρατούν τους κόκκους γύρης μαζί, σχηματίζοντας έτσι το σφαιρίδιο γύρης. Στη συνέχεια, οι μέσης ηλικίας μέλισσες της κυψέλης, προσθέτουν μέλι και αδενικές εκκρίσεις σε αυτό και το πιέζουν καλά μέσα στο κελί της κηρήθρας, σπρώχνοντας με το κεφάλι τους.



Φωτογραφία 2. Πλαίσιο με γόνο (σφραγισμένο κυρίως και ελάχιστο ασφράγιστο που φαίνεται λευκός), ΜΨ (τέλη άνοιξης με κύρια πηγή τη λαδανιά) και λίγο μέλι. Φωτογραφία: Κατερίνα Καρατάσου

Η ανάγκη μετατροπής της ΓΜ σε ΜΨ προέκυψε για δύο λόγους: Πρώτον, η γύρη -και ιδίως η πολύ θρεπτική γύρη- δεν είναι πάντα άφθονη κατά τη διάρκεια του έτους [41]. Δεύτερον, η γύρη είναι μια ευπαθής τροφή που αλλοιώνεται εύκολα στο ζεστό περιβάλλον της κυψέλης, λόγω της σχετικά υψηλής περιεκτικότητάς της σε νερό και της πληθώρας των θρεπτικών συστατικών της [35]. Οι μέλισσες καταναλώνουν μόνο ΜΨ, παράγοντάς το αφενός αντιμετώπισαν αποτελεσματικά αυτά τα ζητήματα και αφετέρου δημιούργησαν μια τροφή πιο θρεπτική και βιοδραστική σε σύγκριση με τη ΓΜ [39, 35, 154]. Θεωρείται ότι η ζύμωση (παραγωγή γαλακτικού οξέος - μείωση pH) και πιθανώς η πρόπεψη των κόκκων γύρης με ένζυμα των μελισσών, καθώς και του μικροβιώματος του ΜΨ, συντηρούν το ΜΨ και προάγουν τη θρεπτική του αξία [45].

Η ΓΜ επιδεικνύει τουλάχιστον *in vitro*, αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση [46,47,48]. Υπάρχουν σημαντικά λιγότερα δεδομένα σχετικά με το ΜΨ, ωστόσο έχει διαπιστωθεί ότι ασκεί σημαντική αντιμικροβιακή δράση [35,49,50, 155,156].



Φωτογραφία 3. Συλλεκτρια μέλισσα με ευδιάκριτο το μπαλάκι γύρης που μεταφέρει Credit: Andreas Trepte Πηγή: Wikimedia Commons

Πίνακας 1. Συστατικά μελισσοκομικών προϊόντων που επιδεικνύουν αντιμικροβιακή δράση

Μέλι	Πρόπολη	Βασιλικός Πολτός	Γύρη	ΜΨ	Δηλητήριο
H ₂ O ₂ [51,52]		Γλυκοξειδάση [53]			
Μεθυλγλυοξάλη [54]					
MRJPs [55,56]		MRJPs [55]			
ντεφενσίνη -1 (ρογαλιζίνη) [6,57]	AMPs [58]	ντεφενσίνη -1 (ρογαλιζίνη) [59]			
Ex.L.V [60]		Ex.L.V [60]	Ex.L.V [60]		
		Ζελεΐνες [61]			
Πολυφαινόλες [62,63]	Πολυφαινόλες [62,63]	Πολυφαινόλες [64]	Πολυφαινόλες [62,63]	Πολυφαινόλες [62,63]	
		Παράγωγα 10-HDA [65,66]	Λιπαρά οξέα [67,68]	Λιπαρά οξέα [67,68]	
1,2- Δικαρβονύλια [5]					
			Αλκαλοειδή [69]		Μελιτίνη Φωσφολιπάση A2 [29]

AMPs: antimicrobial peptides ,αντιμικροβιακά πεπτιδία, **Ex.L.V:** exosome-like vesicles, κυστίδια παρόμοια με εξωσώματα, **10-HDA:** 10-υδροξυ-δεκενοϊκό οξύ, **MRJPs:** Major Royal Jelly Proteins, **Κύριες Πρωτεΐνες Βασιλικού Πολτού**

Αν και οι περισσότερες αντιμικροβιακές ενώσεις των προϊόντων της μέλισσας έχουν ταυτοποιηθεί, ο τρόπος δράσης τους δεν έχει ακόμη πλήρως αποσαφηνιστεί. Ομοίως, η συμβολή του μικροβιώματος των προϊόντων της μέλισσας στην αντιμικροβιακή τους δράση μένει να διευκρινιστεί λεπτομερώς.

A.2. ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΓΥΡΗΣ ΜΕΛΙΣΣΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ

Η χημική σύνθεση της γύρης που συλλέγεται από τις μέλισσες (ΓΜ) εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη βοτανική και γεωγραφική προέλευση αλλά και από το κλίμα, τον τύπο του εδάφους, την εποχή και τις καιρικές συνθήκες κατά τη συλλογή, καθώς και από τη φυλή των μελισσών και ακόμη και τη μελισσοκομική διαχείριση [70,71]. Διαφορετικές μελέτες που παρουσιάζονται από τους Campos et al. [72], έχουν δείξει ότι οι μέλισσες είναι πολύ επιλεκτικές όταν συλλέγουν γύρη και ότι ο κύριος όγκος της συλλεγόμενης γύρης προέρχεται από λίγα είδη φυτών. Ο προσδιορισμός της βοτανικής προέλευσης τόσο της ΓΜ όσο και του ΜΨ είναι υψίστης σημασίας καθώς οι βιολογικές, θρεπτικές, αντιοξειδωτικές και αντιβακτηριακές τους ιδιότητες σχετίζονται άμεσα με τη σύνθεσή τους [73,74].

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι απλές μετρήσεις των θρεπτικών συστατικών της ΓΜ και του ΜΨ δεν μπορούν να προσδιορίσουν με ακρίβεια τη θρεπτική ή την αντιοξειδωτική τους αξία για τις μέλισσες ή τους καταναλωτές. Η βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών είναι σημαντική, ιδιαίτερα αν λάβουμε υπόψη το γεγονός ότι τα συστατικά αυτά είναι εγκλωβισμένα μέσα στους γυρεόκοκκους οι οποίοι είναι δύσκολο να διασπαστούν. Τα τοιχώματα των γυρεόκοκκων αποτελούνται από δύο στρώματα: το εξωτερικό (εξίνη, exine) είναι κατασκευασμένο από ένα ανθεκτικό πολυφαινολικό βιοπολυμερές που ονομάζεται σποροπολενίνη, ενώ το εσωτερικό (ιντίνη, intine) αποτελείται από ελαστικά μικροϊνίδια κυτταρίνης και πηκτίνη [75]. Για αυτόν τον λόγο, ίσως είναι πιο σκόπιμο να αξιολογηθεί η επίδραση της διατροφής με ΓΜ ή ΜΨ τόσο στις μέλισσες όσο και στους ανθρώπους λαμβάνοντας υπόψη την ικανότητα πέψης τους (πεπτικότητα) [76].

Προτείνεται ότι η διάσπαση των γυρεόκοκκων συμβαίνει φυσικά κατά τη διάρκεια της ζύμωσης της γύρης που καταλύεται από ένζυμα και μικροοργανισμούς των μελισσών (βακτήρια, μύκητες και ζυμομύκητες). Μια ένδειξη είναι ότι το ΜΨ είναι πιο θρεπτικό για τις μέλισσες σε σύγκριση με τη ΓΜ [77,78].

Το μικροβίωμα του ΜΨ φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στη διατροφή και την ανάπτυξη των μελισσών [79,80]. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι οι μικροοργανισμοί του ΜΨ διευκολύνουν την ενζυμική πρόπεψη των κόκκων γύρης [45,48,79], αυξάνοντας έτσι την περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά και την πεπτικότητα [81,82]. Οι Vázquez και Olofsson πρότειναν ότι οι λακτοβάκιλοι που αποτελούν τη φυσική μικροβιακή χλωρίδα του προλόβου των μελισσών εμπλέκονται στη ζύμωση του ΜΨ και μπορεί να είναι υπεύθυνοι για τη βελτίωση της θρεπτικής του αξίας με την παραγωγή βιταμινών [80].

Από την άλλη, οι Anderson et al. διαφωνούν πλήρως με την ιδέα της μικροβιακής πρόπεψης της γύρης και την επίδρασή της στη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών του ΜΨ [83]. Οι Nichholson et al. [84], τάισαν νεαρές εργάτριες μέλισσες σε κλουβιά με φρέσκια και αποθηκευμένη γύρη και παρατήρησαν ότι η αποθήκευση της γύρης ηλιάνθου δεν αύξησε την πεπτικότητα της. Οι Carrol et al. παρατήρησαν ότι η γύρη δύο έως τεσσάρων ημερών ήταν σημαντικά πιο πιθανό να καταναλωθεί, αντί της γύρης ηλικίας επτά ημερών [85]. Επιπλέον, νεαρές εργάτριες που εκτράφηκαν για 7 ημέρες με αποθηκευμένη γύρη μίας, πέντε ή δέκα ημερών, δεν έδειξαν διαφορά στη μάζα σώματος, στη συσσώρευση κοπράνων στο οπίσθιο έντερο ή στους τίτλους πρωτεΐνης του υποφαρυγγικού αδένος, υποδηλώνοντας ότι η ηλικία της γύρης είναι άσχετη με τη θρεπτική της αξία [85].

Ωστόσο το γεγονός ότι οι μέλισσες χρησιμοποιούν αποθηκευμένο ΜΨ στις αρχές της άνοιξης (οπότε ξεκινάει η εισροή φρέσκιας γύρης) για να ταΐσουν τον πρώτο γόνο μετά το ξεχειμνιάσμα, συνηγορεί υπέρ της υψηλότερης θρεπτικής του αξίας. Επιπλέον, οι Beutler και Orfinger παρατήρησαν ότι οι μέλισσες που τρέφονταν με ΜΨ ζούσαν περισσότερο σε σύγκριση με τις μέλισσες που τρέφονταν με γύρη που συλλέγονταν από γυρεοπαγίδες [86].

Το εάν η ζύμωση ή/και η αποθήκευση της ΓΜ επηρεάζει τη θρεπτική αξία της ΓΜ και τη γευστικότητά της για τις μέλισσες παραμένει αμφιλεγόμενο μέχρι σήμερα. Ωστόσο, μια πρόσφατη μελέτη παρουσιάζει μια νέα, ενδιαφέρουσα ιδέα: όταν οι προνύμφες καταναλώνουν ΜΨ, καταναλώνουν τόσο μικροβιακή όσο και φυτική βιομάζα, αφομοιώνοντας τόσο μικροβιακά αμινοξέα καθώς και φυτικής προέλευσης (από τη γύρη), κάτι που καθιστά τις μέλισσες παμφάγες και όχι φυτοφάγες [87]. Οι Dharampal et al. παρατήρησαν επίσης ότι τα μικρόβια της γύρης παρέχουν ουσιαστική διατροφή στις προνύμφες των μελισσών κτιστών (mason bees, *Osmia* spp, Megachilidae)[82]. Πρότειναν ότι οι μικροβιακές κοινότητες που σχετίζονται με τη ζύμωση της γύρης είναι απαραίτητες για την υγεία των μελισσών, όχι μόνο ως ωφέλιμα συμβιωτικά μικρόβια, αλλά και ως κύριο διατροφικό συστατικό.

Η χημική σύσταση της ΓΜ και του ΜΨ, όπως έχει αναφερθεί σε σχετικές μελέτες, έχει ως εξής:

Η **υγρασία** της ΓΜ κυμαίνεται από 21,7–27%, ενώ ένα μεγαλύτερο εύρος παρατηρείται για τις τιμές υγρασίας του ΜΨ: 11,41–28% [88,89].

Η περιεκτικότητα σε **πρωτεΐνη** προσδιορίστηκε μεταξύ 7 και 40 g/100 g για τη ΓΜ και 14–37% w/w για το ΜΨ [90,91,92]. Σύμφωνα με τους Nagai et al. [92], το ΜΨ περιέχει μεγάλες ποσότητες (20%) από εύκολα αφομοιώσιμες πρωτεΐνες και όλα τα απαραίτητα για τον άνθρωπο **αμινοξέα**. Αυτά περιλαμβάνουν τα γλουταμικό οξύ, ασπαρτικό οξύ, προλίνη (το πιο άφθονο αμινοξύ), αργινίνη, βαλίνη, ιστιδίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, λυσίνη, μεθειονίνη, τρυπτοφάνη, φαινυλαλανίνη, θρεονίνη, κυστεΐνη, τυροσίνη, αλανίνη, γλυκίνη και σερίνη [93].

Τα **ένζυμα** που υπάρχουν στο ΜΨ περιλαμβάνουν την αμυλάση, την ιμπερτάση, τρανσφεράσες της φωσφατάσης και γλυκοξειδάση. **Συνένζυμα** και παράγοντες που βοηθούν την ενζυματική δραστηριότητα βρίσκονται επίσης στο ΜΨ, συμπεριλαμβανομένης της βιοτίνης, της γλουταθειόνης, του NAD και ορισμένων νουκλεοτιδίων [94]. Οι Andelković et al. [95], συνέκριναν δείγματα ΓΜ και ΜΨ που προέρχονται από τις ίδιες αποικίες μελισσών. Διαπίστωσαν ότι η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη αυξήθηκε κατά 19,91% στο ΜΨ σε σύγκριση με τη ΓΜ.

Οι **υδατάνθρακες** κυμαίνονται μεταξύ 24–60 g/100 g στη ΓΜ και 24–35 g/100 g στο ΜΨ [92,93,96]. Οι Bakour et al. [35], βρήκαν ότι οι υδατάνθρακες ανέρχονται στα $74,82 \pm 0,04$ g/100 g στο ΜΨ και τα κύρια **ελεύθερα σάκχαρα** που εντοπίστηκαν ήταν η φρουκτόζη ($11,8 \pm 0,6$ g/100 g ΜΨ), η γλυκόζη ($5,7 \pm 0,4$ g/100 g ΜΨ) και η τρεαλόζη ($0,92 \pm 0,01$ g/100 g ΜΨ). Το ΜΨ περιέχει λιγότερο **άμυλο** σε σύγκριση με τη ΓΜ [88]. Σύμφωνα με τους Roulston και Cane [76], η περιεκτικότητα σε άμυλο στη ΓΜ κυμαινόταν από 0–22 g/100 g. Οι Andelković et al. [95], προσδιόρισαν την περιεκτικότητα σε **κυτταρίνη** σε ΓΜ (3,7 g/100 g) και ΜΨ (2,7 g/100 g). Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης της ΓΜ που λαμβάνει χώρα στα κελιά της κηρήθρας, οι υδατάνθρακες μεταβολίζονται από λακτοβακίλους και παράγεται γαλακτικό οξύ έως και 3,2% [92,93]. Το pH της ΓΜ κυμαίνεται από 3,8–6,3 και το pH του ΜΨ από 3,8–4,3 [88,90,93].

Τα **λιπίδια** κυμαίνονταν από 1–13 g/100 g στη ΓΜ [97] και 6–13 g/100 g στο ΜΨ [92]. Οι Bakour et al. [35], βρήκαν ότι η συνολική περιεκτικότητα σε λιπίδια του ΜΨ ήταν $1,90 \pm 0,06$ g/100 g BB. Οι Kaplan et al. [89] υπολόγισαν την περιεκτικότητα σε λιπίδια στο ΜΨ μεταξύ 5,93 g/100 g ΜΨ και 11,55 g/100 g ΜΨ. Οι Zuluağa et al. [91], ανέλυσαν δεκαπέντε δείγματα ΜΨ και προσδιόρισαν την περιεκτικότητα σε λιπίδια μεταξύ 1,65 και 5,50 g/100 g (μέση τιμή $3,40 \pm 1,08$ g/100 g). Οι παρατηρούμενες διαφορές θα μπορούσαν να αποδοθούν στη βοτανική προέλευση του ΜΨ. Οι Andelković et al. [95], ανέφεραν ότι η περιεκτικότητα σε λιπίδια στο ΜΨ είναι αυξημένη κατά 4,47% σε σύγκριση με τη ΓΜ.

Τουλάχιστον 14 **λιπαρά οξέα** (FAs) εντοπίστηκαν σε δείγματα ΓΜ από τη Ρουμανία, την Πολωνία, τη Νότια Κορέα και την Κίνα, με τα πιο άφθονα να είναι το α-λινολενικό, το παλμιτικό και το λινολεϊκό [74,98]. Οι Kaplan et al. [89], εντόπισαν 37 λιπαρά οξέα σε 8 δείγματα ΜΨ από την Τουρκία και βρήκαν ότι η **αναλογία ακόρεστων προς κορεσμένα** κυμαινόταν μεταξύ 1,38 και 2,39, υποδεικνύοντας ότι το ΜΨ είναι μια καλή πηγή ακόρεστων λιπαρών οξέων.

Τα λιπαρά οξέα είναι σημαντικά θρεπτικά συστατικά που παίζουν σημαντικό ρόλο στη γονιμότητα και την υγεία των μελισσών [99]. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (**PUFA**), ιδιαίτερα τα **ωμέγα-3**, είναι σημαντικά για τη διατροφή και την υγεία του ανθρώπου, καθώς μειώνουν τα επίπεδα τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης στο αίμα [100]. Επιπλέον, παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδεις και αντιθρομβωτικές ιδιότητες [101]. Τα ωμέγα-3 PUFA παίζουν επίσης ρόλο στην πρόληψη και τη θεραπεία του καρκίνου [102]. Τα λιπαρά οξέα είναι επίσης γνωστοί αντιμικροβιακοί παράγοντες [67,68].

Η ΓΜ περιέχει υδατοδιαλυτές **βιταμίνες**, όπως βιταμίνες του συμπλέγματος Β, βιταμίνη C, ρουτίνη και ινοσιτόλη καθώς και λιποδιαλυτές βιταμίνες, συμπεριλαμβανομένων των Α (κυρίως β-καροτίνη), Ε και D [103,104]. Το ΜΨ είναι πλούσιο σε βιταμίνες του συμπλέγματος Β και **βιταμίνη Κ**, η οποία δεν υπάρχει στη φρέσκια ΓΜ [105,106]. Σύμφωνα με τους Hryniiewicz et al. [107], το ΜΨ είναι πλούσιο σε α-τοκοφερόλη (80 ± 30 μg/g) και περιέχει σχετικά μικρές ποσότητες ($11,5 \pm 0,3$ μg/g) συνενζύμου Q10, ένα από τα πιο σημαντικά κυτταρικά αντιοξειδωτικά [108].

Επιπλέον, η ΓΜ περιέχει πάνω από 25 διαφορετικά **μικρο- και μακροστοιχεία** όπως σίδηρο, ασβέστιο, φώσφορο, κάλιο, χαλκό, ψευδάργυρο, σελήνιο και μαγνήσιο [40]. Τα κυρίαρχα μέταλλα στο ΜΨ ήταν το κάλιο, ακολουθούμενα από φώσφορο, ασβέστιο, μαγνήσιο, σίδηρο, νάτριο, ψευδάργυρο και

μαγγάνιο [35]. Η τέφρα στο ΜΨ κυμαινόταν μεταξύ 1,9 - 2,54% [89] και $3,32 \pm 0,08\%$ [35]. Οι Andelković et al. [95], ανέφεραν ότι η περιεκτικότητα σε τέφρα αυξήθηκε κατά 7,54% στο ΜΨ σε σύγκριση με τη ΓΜ. Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε ασβέστιο, κάλιο, φώσφορο, μαγνήσιο και σίδηρο ήταν αυξημένη σε σύγκριση με τη ΓΜ ενώ ο ψευδάργυρος και το μαγγάνιο μειώθηκαν. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στον μικροβιακό μεταβολισμό που λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης της γύρης σε ΜΨ [109,110].

Οι Vanderplanck et al. [111], εντόπισαν στερόλες στη ΓΜ που προέρχονται από πολλά είδη φυτών (*Calluna vulgaris* L. Hull, *Cistus* spp., *Cytisus scoparius* (L.) Link, *Salix caprea* L. και *Sorbus aucuparia* L.). Οι κύριες **φυτοστερόλες** περιελάμβαναν τη β-σιτοστερόλη και τη δ5-αβεναστερόλη. Σημαντικές ποσότητες δ7-αβεναστερόλης (σε *C. vulgaris*, 20,23%) και 24-μεθυλενοχοληστερόλης/καμπεστερόλης (σε *S. aucuparia* L., 84,07%) μετρήθηκαν σε αρκετά δείγματα γύρης. Οι φυτοστερόλες εμφανίζουν θεραπευτικές ιδιότητες: προκαλούν απόπτωση των κυττάρων, μειώνουν τα επίπεδα χοληστερόλης και ασκούν καρδιοπροστατευτική και αντιφλεγμονώδη δράση [112,113,114].

Στις **πολυφαινολικές ενώσεις** οφείλεται το ξεχωριστό χρώμα των γυρεοκόκκων (κίτρινο, καφέ, μαύρο, κόκκινο, μοβ, κ.λπ.) και το χαρακτηριστικό οργανοληπτικό τους χαρακτηριστικό είναι η πικρή γεύση [115]. Οι πολυφαινόλες, ως αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά, συμβάλλουν στην πρόληψη του καρκίνου [116,117,118] και στη θεραπεία του διαβήτη [119,120], της αθηροσκλήρωσης [121] και των καρδιαγγειακών παθήσεων [122], των αυτοάνοσων νοσημάτων [123] ακόμη και της άνοιας [120,124]. Επιδεικνύουν επίσης ισχυρή αντιμικροβιακή δράση [62,63]. Οι πολυφαινόλες στη γύρη χαρακτηρίζονται χημικά ως φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα. Αρκετοί συγγραφείς εξέτασαν διαφορετικούς διαλύτες εκχύλισης, όπως μεθανόλη, αιθανόλη, εξάνιο ή νερό, προκειμένου να αξιολογήσουν την επίδρασή τους στη συγκέντρωση των βιοδραστικών αυτών ενώσεων καθώς και στις βιοδραστικές ιδιότητες της ΓΜ και του ΜΨ [71].

Σε δείγματα ΓΜ ποικίλης βοτανικής προέλευσης, η τρικετίνη, η λουτεολίνη, η σελαγίνη, η μυρικετίνη, η ραμνετίνη, η ισοραμνετίνη, η ισοκερκετίνη, η κατεχίνη, η ναριγενίνη, η απιγενίνη, η κερκετίνη και η καμπφερόλη, είναι τα πιο αναγνωρισμένα **φλαβονοειδή**. Οι δύο τελευταίες και οι γλυκοσιδικές τους μορφές είναι οι πιο άφθονες [36,125,126]. Άλλα φλαβονοειδή στη γύρη των μελισσών είναι οι λευκοανθοκυανιδίνες και οι κατεχίνες [127].

Τα **φαινολικά οξέα** που υπάρχουν στη ΓΜ περιλαμβάνουν το συρινγγικό, το κουμαρικό, το σιναπικό, το φερουλικό, το κινναμικό, το χλωρογενικό, το γαλλικό και το ασπιρικό οξύ [126,127,128], καφεϊκά οξέα [129], καθώς και το υδροξυκινναμικό, το ορθο-κουμαρικό και το παρα-κουμαρικό οξύ [128,130,131].

Οι σχετικές δημοσιεύσεις για το ΜΨ είναι λιγότερες. Οι Isidorov et al. [34], χρησιμοποιώντας GC-MS, αναφέρουν τις ναριγενίνη, καμπφερόλη, απιγενίνη, ισοραμνετίνη και κερκετίνη ως τα κύρια φλαβονοειδή και το π-κουμαρικό οξύ ως το κύριο φαινολικό οξύ σε δείγματα ΜΨ από τη Λετονία, τη Ρωσία και την Πολωνία. Οι Markiewicz-Zukowska et al. [116], ανέλυσαν τρία δείγματα ΜΨ από την Πολωνία, με GC-MS και προσδιόρισαν την καμπφερόλη και την απιγενίνη ως τα κύρια φλαβονοειδή. Οι Tavdidishvili et al. [132], ανίχνευσαν την παρουσία 12-15 φλαβονοειδών με HPLC σε δείγματα γεωργιανού ΜΨ. Τα πιο άφθονα ήταν η ναριγενίνη, η ρουτίνη και η κερκετίνη (20% της συνολικής περιεκτικότητας σε φλαβονοειδή). Οι Sobral et al. [117] ανέλυσαν έξι δείγματα ΜΨ από την Πορτογαλία και ανέφεραν ότι οι κύριες φαινολικές ενώσεις ήταν η κερκετίνη, η καμπφερόλη, η μυρικετίνη, η ισοραμνετίνη και τα γλυκοσιδικά παράγωγα της ερβακετίνης. Οι Bakour et al. [35], ανέλυσαν τη φαινολική σύνθεση ενός δείγματος μαροκινού ΜΨ και ανέφεραν την παρουσία δεκατριών πολυφαινολικών ενώσεων, με πιο άφθονες την κερκετίνη, την καμπφερόλη, την ισοραμνετίνη και τα γλυκοσιδικά παράγωγα της μεθυλερβακετίνης.

Οι Urcan et al. [71], καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η μεγάλη παραλλακτικότητα όσον αφορά την περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις στο ΜΨ που συναντάμε στη βιβλιογραφία, πιθανότατα οφείλεται στη διαφορετική βοτανική προέλευση. Ωστόσο, η παραλλακτικότητα θα μπορούσε επίσης να αποδοθεί σε διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης και ποσοτικοποίησης που έχουν εφαρμοστεί στις διάφορες μελέτες.

Μια πρόσφατη μελέτη που δημοσιεύθηκε από τους Urcan et al. [133], συγκρίνοντας δείγματα γύρης λουλουδιών, ΓΜ και ΜΨ από τη Ρουμανία και την Ινδία, έδειξε ότι το φαινολικό προφίλ του ΜΨ είναι πανομοιότυπο με αυτό της γύρης της τοπικής χλωρίδας που συλλέγεται με το χέρι καθώς και της γύρης που συλλέγεται από μέλισσες. Ανέφεραν ότι παρά τις βιοχημικές αλλαγές που μπορεί να λάβουν χώρα κατά τη ζύμωση της ΓΜ σε ΜΨ, οι φαινολικές ενώσεις δεν επηρεάστηκαν. Επιπλέον, σύμφωνα με τους συγγραφείς, παράγοντες όπως το έδαφος και το κλίμα ενδέχεται να μην επηρεάζουν τις φαινολικές ενώσεις στα δείγματα που μελετήθηκαν. Μια πιο πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η ολική περιεκτικότητα σε φαινολικά και φλαβονοειδή καθώς και η δραστηριότητα δέσμευσης ριζών αυξήθηκε κατά 1,27-2,40 φορές στην πολυανθική ΓΜ, μετά από αυθόρμητη ζύμωση ή ζύμωση με ενοφθαλμισμό *Lactococcus lactis* και *Lactobacillus rhamnosus* [48].

Συμπερασματικά, η χημική σύνθεση της ΓΜ και του ΜΨ ποικίλλει πολύ ανάλογα με τη βοτανική προέλευση. Οι μεγάλες διακυμάνσεις τόσο στη σύνθεση όσο και στη συγκέντρωση των συστατικών μεταξύ της ΓΜ και του ΜΨ θα μπορούσαν να αποδοθούν σε πιθανή προ-πέψη των κόκκων γύρης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης της γύρης σε ΜΨ. Επιπλέον, βιταμίνες, αμινοξέα και άλλα θρεπτικά συστατικά μπορεί να παράγονται από το μικροβίωμα του ΜΨ. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η συντήρηση του ΜΨ δεν οφείλεται σε απλή «ενσίρωση» (οι λακτοβάκιλοι πχ είναι γνωστό ότι παράγουν αντιμικροβιακές ενώσεις [80]), αλλά θα πρέπει να διεξαχθούν περισσότερες μελέτες σχετικά στο μέλλον.

Η δειγματοληψία είναι πολύ σημαντική, ειδικά όταν λαμβάνονται δείγματα από προϊόντα που διατίθενται στο εμπόριο και όχι απευθείας από την κυψέλη. Οι συνθήκες αποθήκευσης μπορεί να επιδεινώσουν την ποιότητα του δείγματος. Περαιτέρω συγκριτικές μελέτες, χρησιμοποιώντας δείγματα ΓΜ και ΜΨ που λαμβάνονται από την ίδια κυψέλη συγκεκριμένη στιγμή, με γνώση της ακριβούς ηλικίας του ΜΨ, θα μπορούσαν να αποδείξουν με σαφήνεια σε ποιο βαθμό το ΜΨ είναι διατροφικά πιο ενισχυμένο από τη ΓΜ.

A.3. ΤΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ ΤΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ

Έχει προταθεί ότι οι μέλισσες εξελίχθηκαν από σαρκοφάγες σφήκες, κατά τη διάρκεια της Μέσης έως Ύστερης Κρητιδικής περιόδου, αποκτώντας ένα εξειδικευμένο μικροβίωμα στο έντερό τους ικανό να αφομοιώνει τη γύρη, το οποίο τους επέτρεψε να τρέφονται με αυτή [134]. Αυτές οι προγονικές βακτηριακές κοινότητες δεν αποτελούν πλέον μέρος του μικροβιώματος του εντέρου της *Apis mellifera* [135]. Οι ενήλικες εργάτριες *A. mellifera* της σύγχρονης εποχής φιλοξενούν ένα χαρακτηριστικό εντερικό μικροβίωμα που απαρτίζεται από εννέα διαφορετικούς βακτηριακούς φυλότυπους, που αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 95% της συνολικής βακτηριακής ποικιλότητας στο έντερό τους. Αυτά τα ευρήματα έχουν αναφερθεί σε αρκετές μελέτες, αναλύοντας δείγματα που αποκτήθηκαν από διαφορετικά περιβάλλοντα, ηπειρους και γονότυπους ξενιστών [135,136,137,138].

Το ΜΨ, η κύρια πηγή τροφής του γόνου, στερείται βακτηριακών φυλότυπων που υπάρχουν συνήθως στο μικροβίωμα των ενηλίκων εργατριών μελισσών [139]. Οι Saraiva et al. [79], αξιολόγησαν την ποικιλομορφία και τη δομή των κοινοτήτων των βακτηρίων και των αρχαίων στο έντερο αφρικανοποιημένων μελισσών και στο ΜΨ. Παρατήρησαν ότι μόνο το 7% των ταξινομικών κατηγοριών σε επίπεδο είδους ήταν κοινά μεταξύ του εντέρου της μέλισσας και του ΜΨ.

Η κατάσταση της υγείας των μεμονωμένων μελισσών και της αποικίας στο σύνολό της εξαρτάται από τη συμβιωτική τους σχέση με το μικροβίωμα του εντέρου [140,141,142]. Το μικροβίωμα του εντέρου εμπλέκεται στην πέψη της γύρης, στο μεταβολισμό των υδατανθράκων και στην ανοσολογική απόκριση [143,144].

Από αυτή την άποψη, οι Rokop et al. [145], χρησιμοποίησαν καλλιέργειες και μοριακή ταξινόμηση (αλληλούχηση του 16S rRNA γονιδίου) για να χαρακτηρίσουν τις κοινότητες των λακτοβακίλλων (LAB) που υπάρχουν σε διαφορετικά περιβάλλοντα της κυψέλης. Στη διαδικασία, εντόπισαν αλληλεπιδράσεις μεταξύ βακτηριακών ειδών (*Fructobacillus* spp. και *Lactobacillaceae*) που δεν ανήκουν στο μικροβίωμα των μελισσών και ειδών που είναι χαρακτηριστικά του μικροβιώματος της μέλισσας. Και τα δυο γένη *Fructobacillus* spp. και *Lactobacillaceae* αποικίζουν τα κελιά του γόνου, το ΜΨ και το νέκταρ και μπορεί να διευκολύνουν τον αποικισμό από βακτήρια του μικροβιώματος της μέλισσας. Οι δοκιμές συν-καλλιέργειας έχουν δείξει ότι αυτά τα βακτήρια προάγουν την ανάπτυξη των βακτηριακών ειδών που είναι ειδικά για τη μέλισσα. Είναι ενδιαφέρον ότι οι *Fructobacillus* spp. υποβοήθησαν την ανάπτυξη του φυλότυπου Firm-5 του μικροβιώματος της μέλισσας *in vitro*. Ο μεταβολικός χαρακτηρισμός του *Fructobacillus*, με δοκιμές χρήσης υδατανθράκων, αποκάλυψε ότι αυτό το στέλεχος είναι ικανό να χρησιμοποιεί απλά σάκχαρα όπως φρουκτόζη και γλυκόζη καθώς και τη σύνθετους φυτικούς υδατανθράκες όπως η λιγνίνη.

Οι Manirajan et al. [146], διερεύνησαν την αφθονία των βακτηρίων, την ποικιλομορφία και τη δομή των βακτηριακών κοινοτήτων στη γύρη σημύδας, σίκαλης, κράμβης και φθινοπωρινού κρόκου. Τα πρωτεοβακτήρια ήταν το πιο άφθονο φύλο σε όλα τα είδη ΓΜ, ακολουθούμενα από τα Actinobacteria, Acidobacteria και Firmicutes. Σύμφωνα με αυτή τη μελέτη, οι μικροβιακές κοινότητες των φυτικών ειδών που επικονιάζονται από έντομα ήταν πιο όμοιες μεταξύ τους σε σύγκριση με τα είδη που επικονιάζονται από τον άνεμο, υποδηλώνοντας ότι τα έντομα επικονιαστές επηρεάζουν αυτές τις μικροβιακές κοινότητες. Οι Ushio et al. [147], υπέθεσαν ότι μέρος της μικροβιακής κοινότητας στην επιφάνεια ενός λουλουδιού μεταφέρεται εκεί από τις επιφάνειες του σώματος των εντόμων και ότι αυτή η κοινότητα μπορεί να παρέχει πληροφορίες για τον εντοπισμό πιθανών εντόμων επικονιαστών αυτού του φυτού. Προκειμένου να ελεγχθεί αυτή η υπόθεση, εργαστηριακά πειράματα έδειξαν ότι η σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας σε μια επιφάνεια λουλουδιών άλλαξε πράγματι μετά την επαφή με ένα έντομο, υποδηλώνοντας ότι τα μικρόβια μεταφέρονται από το έντομο στο λουλούδι.

Η Gilliam ανέλυσε δείγματα γύρης λουλουδιών, ΓΜ και ΜΨ διαφορετικής ηλικίας, όλα προερχόμενα από το ίδιο είδος φυτού και έδειξε ότι οι αλλαγές στη βιοχημική και μικροβιολογική σύνθεση της γύρης των λουλουδιών ξεκινούν μόλις τη συλλέξει η μέλισσα [45]. Επιπλέον, η Gilliam ανέφερε ότι τα κυρίαρχα μικρόβια στη γύρη και στο ΜΨ ήταν μύκητες (55% των συνολικών απομονωμένων στελεχών από γύρη και 85% των συνολικών απομονώσεων από ΜΨ). Τα βακτήρια μετρήθηκαν έως και 49% στη γύρη λουλουδιών, μειώθηκαν στο 28% στη ΓΜ και αποτελούσαν μόνο το 4% της μικροχλωρίδας του ΜΨ. Το γένος *Bacillus* αντιπροσώπευε το 2% των μικροβίων στη γύρη λουλουδιών, το 20% των μικροβίων στη ΓΜ και το 11% των μικροβίων στο ΜΨ. Ο *Bacillus subtilis*, ένα είδος *Bacillus* που σχετίζεται με τη γύρη των λουλουδιών, ήταν πιο άφθονος στη ΓΜ και στο έως μιας εβδομάδας ΜΨ [148]. Όσον αφορά τους μύκητες, τα Penicillia, Mucorales και Aspergilli ήταν τα πιο άφθονα taxa.

Οι Vasquez και Olofsson [80] ερεύντησαν την παρουσία γαλακτικών βακτηρίων LABs, που είχαν απομονωθεί προηγουμένως από στομάχι μελισσών, σε δείγματα ΜΨ, ηλικίας δύο εβδομάδων και δύο μηνών. Η κοινότητα των LAB που ανιχνεύθηκε περιελάμβανε δώδεκα είδη που ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* [80,138]. Τα περισσότερα από αυτά τα είδη ήταν βιώσιμα στη ΓΜ και στο ΜΨ ηλικίας δύο εβδομάδων αλλά όχι σε μεγαλύτερης ηλικίας δείγματα ΜΨ. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι οι μέλισσες ενοφθαλμίζουν τα LAB στη γύρη μαζί με το νέκταρ που αναροφούν από τον πρόλοβό τους. Τα LABs θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως καλλιέργεια εκκίνησης για τη ζύμωση της γύρης. Επιπλέον, οι αντιμικροβιακές ενώσεις που παράγονται από τους λακτοβακίλλους θα μπορούσαν να συντηρήσουν το ΜΨ και να προστατεύσουν τις μέλισσες από ασθένειες [80].

Οι Mattila et al. [149], αξιολόγησαν τη βακτηριακή ποικιλότητα σε δείγματα εντέρου μελισσών και ΜΨ. Τα *Succinivibrio*, *Oenococcus*, *Paralactobacillus* και *Bifidobacterium* ήταν τα κυρίαρχα γένη που βρέθηκαν στα δείγματα του εντέρου της μέλισσας και αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 67% των βακτηριακών κοινοτήτων. Δύο βακτηριακά φύλα (Proteobacteria και Firmicutes) εντοπίστηκαν σε δείγματα ΜΨ, ενώ τα πιο άφθονα γένη ήταν τα *Oenococcus*, ακολουθούμενα από *Paralactobacillus*, *Shimazuella* και *Saccharibacter*. Από τα 18 είδη που εντοπίστηκαν στο ΜΨ, τα 17 ήταν προαιρετικά ή

υποχρεωτικά αναερόβια. Αυτά τα είδη περιελάμβαναν πολλούς λακτοβακίλους όπως *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Bifidobacterium* καθώς και *Enterobacteria* (*Enterobacter*, *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella* και *Serratia*). Οι συγγραφείς πρότειναν ότι το ΜΨ αποτελείται από διαφορετικά στρώματα και μικροπεριβάλλοντα σε σχέση με την τάση οξυγόνου, κάτι που μπορεί να επιτρέψει την ανάπτυξη διαφορετικών βακτηρίων, από αερόβια έως αυστηρά αναερόβια.

Οι Anderson et al. [83], πραγματοποίησαν προσδιορισμούς συμπεριφοράς, μετρήσεις βακτηρίων, μικροσκοπία και πυροαλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA για την αποσαφήνιση της δομής των βακτηριακών κοινοτήτων σε δείγματα ΓΜ και ΜΨ. Διαπίστωσαν ότι η γύρη που συλλέχθηκε πρόσφατα περιείχε λίγα βακτήρια και αυτοί οι αριθμοί μειώθηκαν στην αποθηκευμένη γύρη μετά από 96 ώρες. Ένα μικρό υποσύνολο βακτηρίων υπήρχε τόσο στη γύρη που συλλέχθηκε πρόσφατα όσο και στην αποθηκευμένη γύρη ανεξάρτητα από την εποχή, υποδεικνύοντας συσχετίσεις με βακτήρια που υπάρχουν στην κυψέλη. Οι βακτηριακές κοινότητες του ΜΨ ήταν πολύ διαφορετικές από εκείνες που βρέθηκαν στο έντερο της μέλισσας ή εκείνες που βρέθηκαν στην επιφάνεια του σώματος των μελισσών που αναζητούν τροφή. Τα βακτήρια του μικροβιώματος του εντέρου της μέλισσας βρέθηκαν σε μεγαλύτερη σχετική αφθονία στη γύρη που συλλέχθηκε πρόσφατα συγκριτικά με την αποθηκευμένη. Τα δείγματα ΜΨ είχαν τριπλάσιο αριθμό μοναδικών βακτηριακών αλληλουχιών σε σύγκριση με τη φρέσκοσυλλεγμένη γύρη, μεταξύ των οποίων απομονώθηκαν τα *Bradyrhizobiaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Rhodobacterales*, *Pseudomonadales*, *Bacteroidetes* και πολλές ομάδες *Actinobacteria*. Τουλάχιστον δύο ανθεκτικά στα οξέα και οσμόφιλα μικρόβια, ο *Lactobacillus kunkeei* και το *Parasaccharibacter apium*, ήταν παρόντα σε σχετικά υψηλή αφθονία στο ΜΨ. Σε αυτή τη μελέτη οι Anderson et al. εφάρμοσαν διάφορες μεθόδους για να αποδείξουν ότι δεν λαμβάνει χώρα καμία μετατροπή ή πρόπεψη θρεπτικών συστατικών από μικρόβια κατά τη μετατροπή της ΓΜ σε ΜΨ, προτείνοντας ότι η προσθήκη μελιού, νέκταρος, εκκρίσεων μελισσών και οι αντιμικροβιακές ενώσεις της ίδιας της γύρης θα μπορούσαν να συντηρήσουν το ΜΨ.

Σε μια μελέτη των Asama et al. [150], οι λακτοβάκιλοι ήταν το κυρίαρχο γένος τόσο σε δείγματα ΜΨ (83,9%) όσο και ΓΜ (74,6%) από την Ιαπωνία, ακολουθούμενο από *Burkholderia* (2,1%) στο ΜΨ και *Glucanobacter* (3,4%) και *Paenibacillus* (2,1%) σε δείγματα ΓΜ. Ο *Lactobacillus kunkeei* ήταν το πιο άφθονο είδος όλων των *Lactobacillus* spp, (99,5% στο ΜΨ και 98,6% στη ΓΜ) καθώς και στο μέλι, τον βασιλικό πολτό και τον πρόλοβο των μελισσών.

Οι Donkersley et al. [151], χρησιμοποίησαν Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς (NGS, Illumina MiSeq) και μετουσιωτική βαθμιδωτή ηλεκτροφόρηση πηκτώματος (DGGE), με στόχο την αξιολόγηση της μικροβιακής ποικιλότητας δειγμάτων ΜΨ από τη Βορειοδυτική Αγγλία. Η ανάλυση αποκάλυψε 24 βακτηριακά φύλα, με τα *Proteobacteria* να είναι η πιο κυρίαρχη ομάδα. Όλα τα δείγματα ΜΨ περιελάμβαναν κατά μέσο όρο 13 βακτηριακά φύλα, με τα πιο άφθονα τα *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, α-*Proteobacteria*, β-*Proteobacteria* και γ-*Proteobacteria*. Τα *Enterobacteriaceae* ήταν η πιο άφθονη οικογένεια που βρέθηκε στο ΜΨ. Σε κάθε δείγμα ΜΨ βρέθηκαν 96 βακτηριακά γένη κατά μέσο όρο και τα πέντε πιο κοινά γένη ήταν τα *Pseudomonas* (32,4%), *Arsenophonus* (13,0%), *Lactobacillus* (8,2%), *Erwinia* (7,7%) και *Acinetobacter* (5,2%). Έντεκα γένη βρέθηκαν σε όλα τα δείγματα, συμπεριλαμβανομένων των *Pseudomonas*, *Arsenophonus*, *Orbus*, *Lactobacillus*, *Erwinia* και *Acinetobacter*, υποδηλώνοντας ότι αυτά τα βακτηριακά γένη μπορεί να είναι μέλη του βασικού, «πυρηνικού» μικροβιώματος του ΜΨ. Αυτή η μελέτη συσχέτισε επίσης τη βακτηριακή ποικιλομορφία που παρατηρήθηκε στο ΜΨ με περιβαλλοντικούς παράγοντες, αποδεικνύοντας ότι η αλλαγή χρήσης γης μπορεί να έχει έμμεση επιζήμια επίδραση στο μικροβίωμα του ΜΨ.

Οι Di Cagno et al. [152], ερεύνησαν τη δομή των κοινοτήτων των λακτοβακίλων στη γύρη λουλουδιών κισσού (ΓΛ), ΓΜ, ΜΨ και στο έντερο της μέλισσας. Έδειξαν ότι η υψηλή μικροβιακή ποικιλομορφία στη ΓΛ και στη φρέσκοσυλλεγμένη ΓΜ μειώθηκε σημαντικά στο ΜΨ. Τα περισσότερα είδη λακτοβακίλων εξαφανίστηκαν κατά την ωρίμανση του ΜΨ και ιδίως σε μακροχρόνια αποθηκευμένο ΜΨ. Ο *Lactobacillus kunkeei* και ο *Fructobacillus fructosus* ήταν τα κυρίαρχα είδη που ήταν επίσης άφθονα και στον πρόλοβο των μελισσών. Οι συγγραφείς προσπάθησαν να μιμηθούν την ζύμωση του ΜΨ εμβολιάζοντας τη ΓΜ με επιλεγμένα στελέχη *L. kunkeei* και *Hanseniaspora unarum* AN8Y27B. Τεκμηρίωσαν

μια αύξηση στην πεπτικότητα καθώς και στη βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών ουσιών και των βιοδραστικών ενώσεων που απαντώνται φυσικά στη ΓΜ. Η ζυμωμένη με τα παραπάνω στελεχη ΓΜ περιείχε υψηλότερες συγκεντρώσεις πεπτιδίων, ελεύθερων αμινοξέων και ελεύθερων φαινολικών. Επιπλέον, έδειξε υψηλότερη *in vitro* πεπτικότητα πρωτεΐνης σε σύγκριση με την αυθόρμητα ζυμωμένη ΓΜ. Αυτή η μελέτη τόνισε τη στενή σχέση μεταξύ βακτηρίων γαλακτικού οξέος και ζυμομυκήτων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης της ΓΜ.

Τέλος, οι Disayathanoowat et al. [153], διερεύνησαν και συνέκριναν τις κοινότητες βακτηρίων και μυκήτων σε ΓΜ και ΜΨ δύο ειδών μελισσών, της *Apis mellifera* και της *Apis cerana*. Σε αυτή τη μελέτη, η ΓΜ συλλέχθηκε απευθείας από τα πόδια της μέλισσας. Δείγματα ΜΨ συλλέχθηκαν μετά από 48 και 72 ώρες από σεσημασμένα κελιά της κηρήθρας. Το DNA εξήχθη από τα δείγματα και στη συνέχεια, η περιοχή V3-V4 του γονιδίου 16S rRNA καθώς και η μυκητιακή περιοχή ITS1-ITS2 ενισχύθηκαν και αλληλουχήθηκαν χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα Illumina MiSeq. Η ανάλυση έδειξε σημαντική διαφορά στον μέσο αριθμό των βακτηριακών και μυκητιακών αλληλουχιών στο ΜΨ μεταξύ των δύο ειδών μελισσών. Αν και τα δύο είδη χρησιμοποίησαν διαφορετικές πηγές λουλουδιών, εμφάνισαν παρόμοιες βασικές μικροβιακές κοινότητες, παρατηρήθηκε όμως διαφορά στην αφθονία κάθε κοινότητας. Η πιο άφθονη βακτηριακή ομάδα σε όλα τα δείγματα ήταν τα Proteobacteria (92,12%), ακολουθούμενα από έναν μικρό πληθυσμό Firmicutes (6,66%). Στη ΓΜ και από τα δύο είδη μελισσών, τα Enterobacteriaceae ήταν πιο άφθονα. Ωστόσο, ο αριθμός των βακτηρίων μειώθηκε σημαντικά στο ΜΨ ηλικίας 72 ωρών. Αρχικά, το *Escherichia-Shiga* ήταν το πιο άφθονο βακτηριακό γένος, αλλά στη συνέχεια η αναλογία του μειώθηκε σε λιγότερο από το 10% των συνολικών βακτηρίων (Operating Taxonomic Units -OTUs) σε όλα τα δείγματα ΜΨ. Παρόμοιο μοτίβο παρατηρήθηκε για τα *Pseudomonas* και *Paracoccus*. Στη γύρη που συλλέχθηκε από την *A. cerana*, τα γένη *Rosenbergeilla* και *Buttiauxella* ήταν πιο άφθονα ενώ στη γύρη που συλλέχθηκε από την *A. mellifera* κυρίαρχα ήταν το *Paracoccus* και τα βακτήρια του μικροβιώματος του εντέρου της μέλισσας *Bifidobacterium* και *Gilliamella*. Κυρίαρχες μυκητιακές ομάδες ήταν τα Ascomycota (93,55%), ακολουθούμενα από τα Basidiomycota (5,65%). Το *Cladosporium* που ανήκει στα Ascomycota ήταν το πιο άφθονο γένος (52,20%). Μόνο ένα γένος ζυμομύκητα Basidiomycetes, το *Rhodosporidium*, αντιπροσώπευε το 2,65% της συνολικής μικροβιακής κοινότητας. Σε αυτή τη μελέτη αποδείχθηκε ότι καθώς το pH μειώνεται στο ΜΨ, το ίδιο συμβαίνει με τους βακτηριακούς πληθυσμούς ενώ οι πληθυσμοί των μυκήτων παραμένουν σταθεροί και το *Cladosporium* παρέμεινε το κυρίαρχο μυκητιακό γένος. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, αυτός ο συγκεκριμένος νηματώδης μύκητας θα μπορούσε να βοηθήσει στη συντήρηση της γύρης απελευθερώνοντας οργανικά οξέα, μαζί με άλλους νηματοειδείς μύκητες, που θα μπορούσαν να αναστείλουν τόσο τα βακτήρια που βρίσκονται εκεί ευκαιριακά όσο και την ανάπτυξη παθογόνων.

A.4. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο πρώτος στόχος της έρευνας που διεξήχθη στο πλαίσιο αυτής της διδακτορικής διατριβής ήταν η τεκμηρίωση της βιοδραστικότητας του ελληνικού ΜΨ. Το ΜΨ μέχρι πρόσφατα ήταν παντελώς άγνωστο στον Έλληνα καταναλωτή αλλά και τον Έλληνα μελισσοκόμο. Με δεδομένη την πλούσια σε βιοποικιλότητα ελληνική χλωρίδα από την οποία προέρχεται, την υψηλή θρεπτική του αξία και την περιεκτικότητά του σε βιοενεργές ουσίες, η διατριβή αυτή έθεσε τους παρακάτω στόχους:

I. Αξιολόγηση της βιοδραστικότητας του ελληνικού ΜΨ

- Διερεύνηση της αντιβακτηριακής και αντιοξειδωτικής του δράσης και του πιθανού συσχετισμού τους με τη βοτανολογική προέλευση των δειγμάτων
- Εκτίμηση της ικανότητας του ΜΨ να εμποδίζει την δημιουργία ή να εκριζώνει βιοϋμένες
- Αξιολόγηση της αντι-ιικής δράσης του ΜΨ

- II. Διερεύνηση του μικροβιώματος του ΜΨ και συγκεκριμένα των μικροοργανισμών που το απαρτίζουν σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης, της βιοσυνθετικής του ικανότητας και της αντιμικροβιακής του δράσης
- III. Διερεύνηση της δυνατότητας να χρησιμοποιηθούν τυχόν αλλαγές στη σύνθεση των μικροβιακών κοινοτήτων που απαρτίζουν το ΜΨ ως διαγνωστικός/προγνωστικός δείκτης για ασθένειες των μελισσών όπως η Νοζέμωση
- IV. Τεχνητή ζύμωση της γύρης με καλλιεργήσιμους αυτόχθονες μικροοργανισμούς του ΜΨ κι εκτίμηση της αντιβακτηριακής και αντι-ιικής δράσης της τεχνητά ζυμωμένης γύρης
- V. Επίδραση της τεχνητά ζυμωμένης γύρης στη βιωσιμότητα εργαστηριακά εκτρεφόμενων μελισσών

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ Α

1. Stagos, D.; Soulitsiotis, N.; Tsadila, C.; Papaeconomou, S.; Arvanitis, C.; Ntontos, A.; Karkanta, F.; Adamou-Androulaki, S.; Petrotos, K.; Spandidos, D.A.; et al. Antibacterial and antioxidant activity of different types of honey derived from Mount Olympus in Greece. *Int. J. Mol. Med.* 2018, 42, 726–734.
2. Kačániová, M.; Vuković, N.; Bobková, A.; Fikselová, M.; Rovná, K.; Haščík, P.; Čuboň, J.; Hleba, L.; Bobko, M. Antimicrobial and antiradical activity of Slovakian honeydew honey samples. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 2012, 1, 354–368.
3. Tsavea, E.; Mossialos, D. Antibacterial activity of honeys produced in Mount Olympus area against nosocomial and foodborne pathogens is mainly attributed to hydrogen peroxide and proteinaceous compounds. *J. Apic. Res.* 2019, 58, 756–763.
4. Anand, S.; Deighton, M.; Livanos, G.; Pang, E.C.K.; Mantri, N. Agastache honey has superior antifungal activity in comparison with important commercial honeys. *Sci. Rep.* 2019, 9, 18197.
5. Nolan, V.C.; Harrison, J.; Cox, J.A.G. Dissecting the Antimicrobial Composition of Honey. *Antibiotics* 2019, 8, 251.
6. Hadagali, M.D.; Chua, L.S. The anti-inflammatory and wound healing properties of honey. *Eur. Food Res. Technol.* 2014, 239, 1003–1014.
7. Afrin, S.; Haneefa, S.M.; Fernandez-Cabezudo, M.J.; Giampieri, F.; al-Ramadi, B.K.; Battino, M. Therapeutic and preventive properties of honey and its bioactive compounds in cancer: An evidence-based review. *Nutr. Res. Rev.* 2019, 33, 50–76.
8. Ahmed, S.; Othman, N.H. Honey as a Potential Natural Anticancer Agent: A Review of Its Mechanisms. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2013, 2013, 829070.
9. Waheed, M.; Hussain, M.B.; Javed, A.; Mushtaq, Z.; Hassan, S.; Shariati, M.A.; Khan, M.U.; Majeed, M.; Nigam, M.; Mishra, A.P.; et al. Honey and cancer: A mechanistic review. *Clin. Nutr.* 2019, 38, 2499–2503.
10. Ahmed, S.; Sulaiman, S.A.; Othman, N.H. Oral Administration of Tualang and Manuka Honeys Modulates Breast Cancer Progression in Sprague-Dawley Rats Model. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2017, 2017, 5904361.
11. Tsiapara, A.; Jaakkola, M.; Chinou, I.; Graikou, K.; Tolonen, T.; Virtanen, V.; Moutsatsou, P. Bioactivity of Greek honey extracts on breast cancer (MCF7), prostate cancer (PC3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells: Profile analysis of extracts. *Food Chem.* 2009, 116, 702–708.
12. Flamm, G.; Glinsmann, W.; Kritchevsky, D.; Prosky, L.; Roberfroid, M. Inulin and oligofructose as dietary fiber: A review of the evidence. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2001, 41, 353–362.
13. Belorkar, S.A.; Gupta, A.K. Oligosaccharides: A boon from nature's desk. *AMB Express* 2016, 6, 82.
14. Jan Mei, S.; Mohd Nordin, M.S.; Norrakiah, A.S. Fructooligosaccharides in honey and effects of honey on growth of *Bifidobacterium longum* BB 536. *Int. Food Res. J.* 2010, 17, 557–561.
15. Simone-Finstrom, M.; Spivak, M. Propolis and bee health: The natural history and significance of resin use by honey bees*. *Apidologie* 2010, 41, 295–311.

16. Siheri, W.; Alenezi, S.; Tusiimire, J.; Watson, D.G. The chemical and biological properties of propolis. In *Bee Products—Chemical and Biological Properties*; Alvarez-Suarez, J.M., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2017; pp. 137–178.
17. Viuda-Martos, M.; Ruiz-Navajas, Y.; Fernández-López, J.; Pérez-Alvarez, J.A. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J. Food Sci.* 2008, 73, R117–R124.
18. Crailsheim, K. Interadult feeding of jelly in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *J. Comp. Physiol. B* 1991, 161, 55–60.
19. Fratini, F.; Cilia, G.; Mancini, S.; Felicioli, A. Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. *Microbiol. Res.* 2016, 192, 130–141.
20. Fontana, R.; Mendes, M.A.; Souza, B.M.d.; Konno, K.; César, L.I.M.M.; Malaspina, O.; Palma, M.S. Jelleines: A family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides* 2004, 25, 919–928.
21. Li, J.K.; Feng, M.; Zhang, L.; Zhang, Z.H.; Pan, Y.H. Proteomics analysis of major royal jelly protein changes under different storage conditions. *J. Proteome Res.* 2008, 7, 3339–3353.
22. Alreshoodi, F.; Sultanbawa, Y. Antimicrobial Activity of Royal Jelly. *Anti-Infect. Agents* 2015, 13
23. El-Seedi, Hesham, Aida Abd El-Wahed, Nermeen Yosri, Syed Ghulam Musharraf, Lei Chen, Moustafa Moustafa, Xiaobo Zou, Saleh Al-Mousawi, Zhiming Guo, Alfi Khatib, and et al. 2020. "Antimicrobial Properties of *Apis mellifera*'s Bee Venom" *Toxins* 12, no. 7: 451. <https://doi.org/10.3390/toxins12070451>
24. Park, H.J.; Lee, S.H.; Son, D.J.; Oh, K.W.; Kim, K.H.; Song, H.S.; Kim, G.J.; Oh, G.T.; Yoon, D.Y.; Hong, J.T. Antiarthritic effect of bee venom: Inhibition of inflammation mediator generation by suppression of NF-kappaB through interaction with the p50 subunit. *Arthritis Rheum.* 2004, 50, 3504–3515.
25. Choi, M.S.; Park, S.; Choi, T.; Lee, G.; Haam, K.K.; Hong, M.C.; Min, B.I.; Bae, H. Bee venom ameliorates ovalbumin induced allergic asthma via modulating CD4+CD25+ regulatory T cells in mice. *Cytokine* 2013, 61, 256–265.
26. Alvarez-Fischer, D.; Noelker, C.; Vulinović, F.; Grünwald, A.; Chevarin, C.; Klein, C.; Oertel, W.H.; Hirsch, E.C.; Michel, P.P.; Hartmann, A. Bee venom and its component apamin as neuroprotective agents in a Parkinson disease mouse model. *PLoS ONE* 2013, 8, e61700.
27. Aufschnaiter, A.; Kohler, V.; Khalifa, S.; Abd El-Wahed, A.; Du, M.; El-Seedi, H.; Büttner, S. Apitoxin and Its Components against Cancer, Neurodegeneration and Rheumatoid Arthritis: Limitations and Possibilities. *Toxins* 2020, 12, 66
28. Akbari, R.; Hakemi-Vala, M.; Pashaie, F.; Bevalian, P.; Hashemi, A.; Pooshang Bagheri, K. Highly Synergistic Effects of Melittin with Conventional Antibiotics Against Multidrug-Resistant Isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Drug Resist.* 2019, 25, 193–202.
29. Boutrin, M.C.; Foster, H.A.; Pentreath, V.W. The effects of bee (*Apis mellifera*) venom phospholipase A2 on *Trypanosoma brucei brucei* and enterobacteria. *Exp. Parasitol.* 2008, 119, 246–251.
30. Jeong, J.K.; Moon, M.H.; Bae, B.C.; Lee, Y.J.; Seol, J.W.; Park, S.Y. Bee venom phospholipase A2 prevents prion peptide induced-cell death in neuronal cells. *Int. J. Mol. Med.* 2011, 28, 867–873. [
31. Fratini, F.; Cilia, G.; Turchi, B.; Felicioli, A. Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2016, 9, 839–843.
32. Pawel Pohl, Anna Dzimitrowicz, Krzysztof Greda, Piotr Jamroz, Anna Lesniewicz, Anna Szymczycha-Madeja, Maja Welna, Element analysis of bee-collected pollen and bee bread by atomic and mass spectrometry – Methodological development in addition to environmental and nutritional aspects, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 128, 2020, 115922, ISSN 0165-9936, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115922>.
33. Isidorov, V.; Isidorova, A.; Szczepaniak, L.; Lazarek, U. Gas chromatographic–mass spectrometric investigation of the chemical composition of beebread. *Food Chem.* 2009, 115, 1056–1063.
34. Bakour, M.; Fernandes, A.; Barros, L.; Soković, M.; Ferreira, I.; Badiaa, L. Bee bread as a functional product: Chemical composition and bioactive properties. *LWT* 2019, 109.
35. Mărgăoan, R.; Stranț, M.; Varadi, A.; Topal, E.; Yücel, B.; Cornea-Cipcigan, M.; Campos, M.G.; Vodnar, D.C. Bee Collected Pollen and Bee Bread: Bioactive Constituents and Health Benefits. *Antioxidants* 2019, 8, 568.

36. Kostić, A.Ž.; Milinčić, D.D.; Barać, M.B.; Ali Shariati, M.; Tešić, Ž.L.; Pešić, M.B. The Application of Pollen as a Functional Food and Feed Ingredient-The Present and Perspectives. *Biomolecules* 2020, 10, 84.
37. Abdelnour, S.A.; Abd El-Hack, M.E.; Alagawany, M.; Farag, M.R.; Elnesr, S.S. Beneficial impacts of bee pollen in animal production, reproduction and health. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2019, 103, 477–484.
38. Komosinska-Vassev, K.; Olczyk, P.; Kaźmierczak, J.; Mencner, L.; Olczyk, K. Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2015, 2015, 297425.
39. Kieliszek, M.; Piwowarek, K.; Kot, A.; Błażej, S.; Chlebowska-Śmigiel, A.; Wolska, I. Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 2018, 71, 170–180.
40. Volkan Aylanc, Soraia I. Falcão, Miguel Vilas-Boas, Bee pollen and bee bread nutritional potential: Chemical composition and macronutrient digestibility under in vitro gastrointestinal system, *Food Chemistry*, Volume 413, 2023, 135597, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135597>.
41. Brodschneider, R.; Crailsheim, K. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 2010, 41, 278–294.
42. Schmickl, T.; Crailsheim, K. How honeybees (*Apis mellifera* L.) change their broodcare behaviour in response to non-foraging conditions and poor pollen conditions. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 2002, 51, 415–425.
43. Schmickl, T.; Crailsheim, K. Cannibalism and early capping: Strategy of honeybee colonies in times of experimental pollen shortages. *J. Comp. Physiol. A Sens. Neural Behav. Physiol.* 2001, 187, 541–547.
44. Wille, H.; Willemse, C.; Kilchenmann, V.; Imdorf, A.; Bühlmann, G. Pollenernte und Massenwechsel von drei *Apis mellifera*-Völkern auf demselben Bienenstand in zwei aufeinanderfolgenden Jahren. *Revue Suisse de Zoologie* 1985, 92, 897–914.
45. Gilliam, M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997, 155, 1–10.
46. Graikou, K.; Kapeta, S.; Aligiannis, N.; Sotiroudis, G.; Chondrogianni, N.; Gonos, E.; Chinou, I. Chinou I: Chemical analysis of Greek pollen-antioxidant, antimicrobial and proteasome activation. *Chem. Cent. J.* 2011, 5, 33.
47. Morais, M.; Moreira, L.; Feás, X.; Estevinho, L.M. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food Chem. Toxicol.* 2011, 49, 1096–1101.
48. Kaškonienė, V.; Adaškevičiūtė, V.; Kaškonas, P.; Mickienė, R.; Maruška, A. Antimicrobial and antioxidant activities of natural and fermented bee pollen. *Food Biosci.* 2020, 34, 100532.
49. Kaškonienė, V.; Venskutonis, R.; Čeksteryte, V. Antibacterial Activity of Honey and Beebread of Different Origin Against *S. aureus* and *S. epidermidis*. *Food Technol. Biotechnol.* 2007, 45, 201–208.
50. Abouda, Z.; Zerdani, I.; Kalalou, I.; Faid, M.; Ahami, M.T. The Antibacterial Activity of Moroccan Bee Bread and Bee-Pollen (Fresh and Dried) against Pathogenic Bacteria. *Res. J. Microbiol.* 2011, 6, 376–384.
51. White, J.W., Jr.; Subers, M.H.; Schepartz, A.I. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochim. Biophys. Acta* 1963, 73, 57–70.
52. Bucekova, M.; Buriova, M.; Pekarik, L.; Majtan, V.; Majtan, J. Phytochemicals-mediated production of hydrogen peroxide is crucial for high antibacterial activity of honeydew honey. *Sci. Rep.* 2018, 8, 9061.
53. Sano, O.; Kunikata, T.; Kohno, K.; Iwaki, K.; Ikeda, M.; Kurimoto, M. Characterization of royal jelly proteins in both Africanized and European honeybees (*Apis mellifera*) by two-dimensional gel electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 15–20.
54. Johnston, M.; McBride, M.; Dahiya, D.; Owusu-Apenten, R.K.; Nigam, P.S. Antibacterial activity of Manuka honey and its components: An overview. *AIMS Microbiol.* 2018.
55. Park, H.G.; Kim, B.Y.; Park, M.J.; Deng, Y.; Choi, Y.S.; Lee, K.S.; Jin, B.R. Antibacterial activity of major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *J. Asia Pac. Entomol.* 2019, 22, 737–741.
56. Chua, L.S.; Lee, J.Y.; Chan, G.F. Characterization of the Proteins in Honey. *Anal. Lett.* 2015, 48, 697–709.
57. Kwakman, P.H.S.; Velde, A.A.t.; de Boer, L.; Speijer, D.; Christina Vandenbroucke-Grauls, M.J.; Zaat, S.A.J. How honey kills bacteria. *FASEB J.* 2010, 24, 2576–2582.

58. Burger, E.A. Evidence of the Existence of a Large Amount of Cationic Antimicrobial Peptides in Propolis, with a Strong Physical/Electrostatic Mechanism of Action (Detergent-like), and their Possible Promising Effects in the Treatment of COVID-19 by means of Propolis Extract Inhalation. *Authorea* 2020. under review
59. Fujiwara, S.; Imai, J.; Fujiwara, M.; Yaeshima, T.; Kawashima, T.; Kobayashi, K. A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *J. Biol. Chem.* 1990, 265, 11333–11337.
60. Schuh, C.M.A.P.; Aguayo, S.; Zavala, G.; Khoury, M. Exosome-like vesicles in *Apis mellifera* bee pollen, honey and royal jelly contribute to their antibacterial and pro-regenerative activity. *J. Exp. Biol.* 2019, 222, jeb208702.
61. Romanelli, A.; Moggio, L.; Montella, R.C.; Campiglia, P.; Iannaccone, M.; Capuano, F.; Pedone, C.; Capparelli, R. Peptides from Royal Jelly: Studies on the antimicrobial activity of jelleins, jelleins analogs and synergy with temporins. *J. Pept. Sci.* 2011, 17, 348–352.
62. Cushnie, T.P.; Lamb, A.J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J. Antimicrob Agents* 2011, 38, 99–107.
63. Daglia, M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2012, 23, 174–181.
64. Balkanska, R.; Marghitas, L.-A.; Pavel, C. Antioxidant Activity and Total Polyphenol Content of Royal Jelly from Bulgaria. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2017, 6, 578–585.
65. Cornara, L.; Biagi, M.; Xiao, J.; Burlando, B. Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. *Front. Pharm.* 2017, 8, 412.
66. Yang, Y.C.; Chou, W.M.; Widowati, D.A.; Lin, I.P.; Peng, C.C. 10-hydroxy-2-decenoic acid of royal jelly exhibits bactericide and anti-inflammatory activity in human colon cancer cells. *BMC Complement. Altern. Med.* 2018, 18, 202.
67. Desbois, A.P.; Smith, V.J. Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 85, 1629–1642.
68. Yoon, B.K.; Jackman, J.A.; Valle-González, E.R.; Cho, N.J. Antibacterial Free Fatty Acids and Monoglycerides: Biological Activities, Experimental Testing, and Therapeutic Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 1114.
69. Lee, I.K.; Hwang, B.S.; Kim, D.W.; Kim, J.Y.; Woo, E.E.; Lee, Y.J.; Choi, H.J.; Yun, B.S. Characterization of Neuraminidase Inhibitors in Korean Papaver rhoeas Bee Pollen Contributing to Anti-Influenza Activities In Vitro. *Planta Med.* 2016, 82, 524–529.
70. Nogueira, C.; Iglesias, A.; Sanchez, X.; Estevinho, L. Commercial Bee Pollen with Different Geographical Origins: A Comprehensive Approach. *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13, 11173–11187.
71. Urcan, A.; Marghitas, L.; Dezmirean, D.; Bobis, O.; Bonta, V.; Mureşan, C.; Mărgăoan, R. Chemical Composition and Biological Activities of Beebread—Review. *Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Cluj-Napoca Anim. Sci. Biotechnol.* 2017, 74, 6.
72. Campos, M.; Frigerio, C.; Lopes, J.; Bogdanov, S. What is the future of Bee-Pollen? *J. ApiProduct ApiMedical Sci.* 2010, 2, 131–144.
73. Velásquez, P.; Rodríguez, K.; Retamal, M.A.; Giordano, A.; Valenzuela, L.M.; Montenegro, G. Relation between composition, antioxidant and antibacterial activities and botanical origin of multifloral bee pollen. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 2017, 90, 306–314.
74. Mărgăoan, R.; Marghitas, L.; Dezmirean, D.; Francisc, D.; Bunea, A.; Socaci, S.; Bobis, O. Predominant and Secondary Pollen Botanical Origins Influence the Carotenoid and Fatty Acid Profile in Fresh Honeybee-Collected Pollen. *J. Agric. Food Chem.* 2014.
75. Fan, T.-F.; Park, S.; Shi, Q.; Zhang, X.; Liu, Q.; Song, Y.; Chin, H.; Ibrahim, M.S.B.; Mokrzecka, N.; Yang, Y.; et al. Transformation of hard pollen into soft matter. *Nat. Commun.* 2020, 11, 1449.
76. Roulston, T.H.; Cane, J.H. Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant. Syst. Evol.* 2000, 222, 187–209.
77. Hagedorn, H.H.; Moeller, F.E. Effect of the Age of Pollen Used in Pollen Supplements on Their Nutritive Value for the Honeybee. I. Effect on Thoracic Weight, Development of Hypopharyngeal Glands, and Brood Rearing. *J. Apic. Res.* 1968, 7, 89–95.

78. Cremonese, T.M.; De Jong, D.; Bitondi, M. Quantification of Hemolymph Proteins as a Fast Method for Testing Protein Diets for Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 1998, 91, 1284–1289.
79. Saraiva, M.A.; Zemolin, A.P.; Franco, J.L.; Boldo, J.T.; Stefenon, V.M.; Triplett, E.W.; de Oliveira Camargo, F.A.; Roesch, L.F. Relationship between honeybee nutrition and their microbial communities. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2015, 107, 921–933.
80. Vásquez, A.; Olofsson, T.C. The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *J. Apic. Res.* 2009, 48, 189–195.
81. Degrandi-Hoffman, G.; Chen, Y.; Rivera, R.; Carroll, M.; Chambers, M.; Hidalgo, G.; de Jong, E.W. Honey bee colonies provided with natural forage have lower pathogen loads and higher overwinter survival than those fed protein supplements. *Apidologie* 2015, 47.
82. Dharampal, P.S.; Carlson, C.; Currie, C.R.; Steffan, S.A. Pollen-borne microbes shape bee fitness. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2019, 286, 20182894.
83. Anderson, K.E.; Carroll, M.J.; Sheehan, T.; Lanan, M.C.; Mott, B.M.; Maes, P.; Corby-Harris, V. Hive-stored pollen of honey bees: Many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. *Mol. Ecol.* 2014, 23, 5904–5917.
84. Nicolson, S.W.; Da Silva Das Neves, S.; Human, H.; Pirk, C.W.W. Digestibility and nutritional value of fresh and stored pollen for honey bees (*Apis mellifera scutellata*). *J. Insect Physiol.* 2018, 107, 302–308.
85. Carroll, M.J.; Brown, N.; Goodall, C.; Downs, A.M.; Sheenan, T.H.; Anderson, K.E. Honey bees preferentially consume freshly-stored pollen. *PLoS ONE* 2017, 12, e0175933.
86. Beutler, R.; Opfinger, E. Pollenernährung und Nosemabefall der Honigbiene (*Apis Mellifica*). *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie* 1950, 32, 383–421.
87. Steffan, S.; Dharampal, P.; Danforth, B.; Gaines-Day, H.; Takizawa, Y.; Chikaraishi, Y. Omnivory in Bees: Elevated Trophic Positions among All Major Bee Families. *Am. Nat.* 2019, 194.
88. Herbert, E.W.; Shimanuki, H. Chemical Composition and Nutritive Value of Bee-Collected and Bee-Stored Pollen. *Apidologie* 1978, 9, 33–40.
89. Kaplan, M.; Karaoglu, Ö.; Eroglu, N.; Silici, S. Fatty Acid and Proximate Composition of Bee Bread. *Food Technol. Biotechnol.* 2016, 54, 497–504.
90. Fuenmayor, C.; Zuluaga-Domínguez, C.; Díaz-Moreno, A.; Quicazán, M.; Cosio, S.; Mannino, S. Evaluation of the physicochemical and functional properties of Colombian bee pollen. *Rev. MVZ Córdoba* 2014, 19, 4003–4014.
91. Zuluaga, C.M.; Serrato, J.; Quicazán, M. Chemical, nutritional and bioactive characterization of Colombian bee-bread. *Chem. Eng. Trans.* 2015, 43, 175–180.
92. Nagai, T.; Nagashima, T.; Myoda, T.; Inoue, R. Preparation and functional properties of extracts from bee bread. *Nahrung* 2004, 48, 226–229.
93. Barene, I.; Daberte, I.; Siksnas, S. Investigation of bee bread and development of its dosage forms. *Medicinos Teorija ir Praktika* 2014, 21, 16–22.
94. Salazar-González, C.; Díaz-Moreno, C. The nutritional and bioactive aptitude of bee pollen for a solid-state fermentation process. *J. Apic. Res.* 2016, 55, 161–175.
95. Anđelković, B.; Jevtić, G.; Mladenović, M.; Marković, J.; Petrović, M.; Nedić, N. Quality of pollen and honey bee bread collected in spring. *J. Hyg. Eng. Des.* 2012, 1, 275–277.
96. Estevinho, L.; Rodrigues, S.; Pereira, A.; Sanchez, X. Portuguese bee pollen: Palynological study, nutritional and microbiological evaluation. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2011, 47, 429–435.
97. Campos, M.G.R.; Bogdanov, S.; De Almeida-Muradian, L.B.; Szczesna, T.; Mancebo, Y.; Frigerio, C.; Ferreira, F. Pollen composition and standardisation of analytical methods. *J. Apic. Res.* 2008, 47, 154–161.
98. Szczesna, T. Long-chain fatty acids composition of honeybee-collected pollen. *J. Apic. Sci.* 2006, 50, 65–79.
99. Manning, R. Fatty acids in pollen: A review of their importance for honey bees. *Bee World* 2015, 82, 60–75.
100. Von Schacky, C.; Harris, W.S. Cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids. *Cardiovasc. Res.* 2007, 73, 310–315.]

101. Simopoulos, A.P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.* 1991, 54, 438–463.
102. Tapiero, H.; Ba, G.N.; Couvreur, P.; Tew, K.D. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomed. Pharm.* 2002, 56, 215–222.
103. Arruda, V.; Pereira, A.; Freitas, A.; Barth, O.; Almeida-Muradian, L. Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition. *J. Food Compos. Anal.* 2013, 29, 100–105.
104. Farag, S.; El-Rayes, T. Effect of Bee-pollen Supplementation on Performance, Carcass Traits and Blood Parameters of Broiler Chickens. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 2016, 11, 168–177.
105. Haydak, M.H.; Vivino, A.E. The Changes in the Thiamine, Riboflavin, Niacin and Pantothenic Acid Content in the Food of Female Honeybees during Growth with a Note on the Vitamin K Activity of Royal Jelly and Beebread. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 1950, 43, 361–367.
106. Gilliam, M. Microbiology of pollen and bee bread: The yeasts. *Apidologie* 1979, 10, 43–53.
107. Hryniewicka, M.; Karpinska, A.; Kijewska, M.; Turkowicz, M.; Karpinska, J. LC/MS/MS analysis of α -tocopherol and coenzyme Q 10 content in lyophilized royal jelly, beebread and drone homogenate: LC/MS/MS analysis of some bee-products. *J. Mass Spectrom.* 2016, 51.
108. Siemieniuk, E.; Skrzydlewska, E. Coenzyme Q10: Its biosynthesis and biological significance in animal organisms and in humans. *Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online)* 2005, 59, 150–159.
109. Foote, H.L. Possible use of microorganisms in synthetic bee bread production. *Am. Bee J.* 1957, 97, 476–478.
110. Haydak, M.H. Pollen—Pollen substitutes—Beebread. *Am. Bee J.* 1958, 98, 145–146.
111. Vanderplanck, M.; Moerman, R.; Rasmont, P.; Lognay, G.; Wathélet, B.; Ruddy, W.; Michez, D. How Does Pollen Chemistry Impact Development and Feeding Behaviour of Polylectic Bees? *PLoS ONE* 2014, 9, e86209.
112. Ostlund, R.E., Jr.; Racette, S.B.; Stenson, W.F. Inhibition of cholesterol absorption by phytosterol-replete wheat germ compared with phytosterol-depleted wheat germ. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003, 77, 1385–1389.
113. Kritchevsky, D.; Chen, S. Phytosterols-health benefits and potential concerns: A review. *Nutr. Res.* 2005, 25, 413–428.
114. Bradford, P.G.; Awad, A.B. Phytosterols as anticancer compounds. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007, 51, 161–170.
115. Zuluaga, C.; Martínez, A.; Fernández, J.; López-Baldó, J.; Quiles, A.; Rodrigo, D. Effect of High Pressure Processing on Carotenoid and Phenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and microbial counts of bee-pollen paste and bee-pollen-based beverage. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2016, 37.
116. Markiewicz-Żukowska, R.; Naliwajko, S.; Bartosiuk, E.; Moskwa, J.; Isidorov, V.; Soroczyńska, J.; Borawska, M. Chemical composition and antioxidant activity of beebread, and its influence on the glioblastoma cell line (U87MG). *J. Apic. Sci.* 2013, 57.
117. Sobral, F.; Calhelha, R.C.; Barros, L.; Duenas, M.; Tomas, A.; Santos-Buelga, C.; Vilas-Boas, M.; Ferreira, I.C. Flavonoid Composition and Antitumor Activity of Bee Bread Collected in Northeast Portugal. *Molecules* 2017, 22, 248.
118. Sharma, A.; Kaur, M.; Katnoria, J.K.; Nagpal, A.K. Polyphenols in Food: Cancer Prevention and Apoptosis Induction. *Curr. Med. Chem.* 2018, 25, 4740–4757.
119. Forato Anhe, F.; Desjardins, Y.; Pilon, G.; Dudonné, S.; Genovese, M.; Lajolo, F.; Marette, A. Polyphenols and type 2 diabetes: A prospective review. *PharmaNutrition* 2013, 1, 105–114.
120. Silveira, A.C.; Dias, J.P.; Santos, V.M.; Oliveira, P.F.; Alves, M.G.; Rato, L.; Silva, B.M. The Action of Polyphenols in Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease: A Common Agent for Overlapping Pathologies. *Curr. Neuropharmacol.* 2019, 17, 590–613.
121. Cheng, Y.C.; Sheen, J.M.; Hu, W.L.; Hung, Y.C. Polyphenols and Oxidative Stress in Atherosclerosis-Related Ischemic Heart Disease and Stroke. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017, 2017, 8526438.
122. Goszcz, K.; Duthie, G.G.; Stewart, D.; Leslie, S.J.; Megson, I.L. Bioactive polyphenols and cardiovascular disease: Chemical antagonists, pharmacological agents or xenobiotics that drive an adaptive response? *Br. J. Pharm.* 2017, 174, 1209–1225.

123. Khan, H.; Sureda, A.; Belwal, T.; Çetinkaya, S.; Süntar, İ.; Tejada, S.; Devkota, H.P.; Ullah, H.; Aschner, M. Polyphenols in the treatment of autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 2019, **18**, 647–657.
124. Hügel, H.; Jackson, N. Polyphenols for the prevention and treatment of dementia diseases. *Neural Regen. Res.* 2015, **10**.
125. Rzepecka-Stojko, A.; Stojko, J.; Kurek-Górecka, A.; Górecki, M.; Kabała-Dzik, A.; Kubina, R.; Moździerz, A.; Buszman, E. Polyphenols from Bee Pollen: Structure, Absorption, Metabolism and Biological Activity. *Molecules* 2015, **20**, 21732–21749.
126. Bridi, R.; Atala, E.; Pizarro, P.N.; Montenegro, G. Honeybee Pollen Load: Phenolic Composition and Antimicrobial Activity and Antioxidant Capacity. *J. Nat. Prod.* 2019, **82**, 559–565.
127. Kędzia, B. Chemical composition and adaptogenic activity of honeybee collected pollen. Part I. Chemical Composition. *Postępy Fitoterapii* 2008, **1**, 47–58.
128. Almaraz, N.; Campos, M.; Ávila-Reyes, J.; Naranjo-Jiménez, N.; Herrera-Corral, J.; Gonzalez, L. Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen of different botanical origin. *Interciencia* 2004, **29**, 574–578.
129. Sarić, A.; Balog, T.; Sobocanec, S.; Kusić, B.; Sverko, V.; Rusak, G.; Likić, S.; Bubalo, D.; Pinto, B.; Reali, D.; et al. Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. rich bee pollen. *Food Chem. Toxicol.* 2009, **47**, 547–554.
130. Almaraz, N.; Campos, M.; Ávila-Reyes, J.; Naranjo-Jiménez, N.; Corral, J.; Gonzalez, L. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, *Leguminosae*). *J. Food Compos. Anal.* 2007, **20**, 119–124.
131. Serra Bonvehí, J.; Soliva Torrentó, M.; Centelles Lorente, E. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *J. Agric. Food Chem.* 2001, **49**, 1848–1853.
132. Tavdizhvili, D.; Khutsidze, T.; Pkhakadze, M.; Vanidze, M.; Kalandia, A. Flavonoids in Georgian Bee Bread and Bee Pollen. *J. Chem. Chem. Eng.* 2014, **8**, 676–681.
133. Urcan, A.; Criste, A.; Dezmirean, D.; Mărgăoan, R.; Caeiro, A.; Campos, M. Similarity of Data from Bee Bread with the Same Taxa Collected in India and Romania. *Molecules* 2018, **23**, 2491.
134. Cardinal, S.; Danforth, B.N. Bees diversified in the age of eudicots. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2013, **280**, 20122686.
135. Martinson, V.G.; Danforth, B.N.; Minckley, R.L.; Rueppell, O.; Tingek, S.; Moran, N.A. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Mol. Ecol.* 2011, **20**, 619–628.
136. Jeyaprakash, A.; Hoy, M.A.; Allsopp, M.H. Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. *J. Invertebr. Pathol.* 2003, **84**, 96–103.
137. Cox-Foster, D.L.; Conlan, S.; Holmes, E.C.; Palacios, G.; Evans, J.D.; Moran, N.A.; Quan, P.L.; Briese, T.; Hornig, M.; Geiser, D.M.; et al. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 2007, **318**, 283–287.
138. Olofsson, T.C.; Vásquez, A. Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Curr. Microbiol.* 2008, **57**, 356–363.
139. Martinson, V.G.; Moy, J.; Moran, N.A. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Appl. Env. Microbiol.* 2012, **78**, 2830–2840.
140. Kwong, W.K.; Moran, N.A. Gut microbial communities of social bees. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016, **14**, 374–384.
141. Ribière, C.; Hegarty, C.; Stephenson, H.; Whelan, P.; O'Toole, P.W. Gut and Whole-Body Microbiota of the Honey Bee Separate Thriving and Non-thriving Hives. *Microb. Ecol.* 2019, **78**, 195–205.
142. Engel, P.; Kwong, W.K.; McFrederick, Q.; Anderson, K.E.; Barribeau, S.M.; Chandler, J.A.; Cornman, R.S.; Dainat, J.; De Miranda, J.R.; Doublet, V.; et al. The Bee Microbiome: Impact on Bee Health and Model for Evolution and Ecology of Host-Microbe Interactions. *mBio* 2016, **7**, e01451-15.
143. Vásquez, A.; Forsgren, E.; Fries, I.; Paxton, R.J.; Flaberg, E.; Szekely, L.; Olofsson, T.C. Symbionts as major modulators of insect health: Lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS ONE* 2012, **7**, e33188.

144. Killer, J.; Dubná, S.; Sedláček, I.; Švec, P. *Lactobacillus apis* sp. nov., from the stomach of honeybees (*Apis mellifera*), having an in vitro inhibitory effect on the causative agents of American and European foulbrood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014, **64**, 152–157.
145. Rokop, Z.P.; Horton, M.A.; Newton, I.L.G. Interactions between Cooccurring Lactic Acid Bacteria in Honey Bee Hives. *Appl. Env. Microbiol.* 2015, **81**, 7261–7270.
146. Ambika Manirajan, B.; Ratering, S.; Rusch, V.; Schwiertz, A.; Geissler-Plaum, R.; Cardinale, M.; Schnell, S. Bacterial microbiota associated with flower pollen is influenced by pollination type, and shows a high degree of diversity and species-specificity. *Environ. Microbiol.* 2016, **18**, 5161–5174.
147. Ushio, M.; Yamasaki, E.; Takasu, H.; Nagano, A.J.; Fujinaga, S.; Honjo, M.N.; Ikemoto, M.; Sakai, S.; Kudoh, H. Microbial communities on flower surfaces act as signatures of pollinator visitation. *Sci. Rep.* 2015, **5**, 8695.
148. Gilliam, M. Microbiology of pollen and bee bread: The genus bacillus. *Apidologie* 1979, **10**, 269–274.
149. Mattila, H.R.; Rios, D.; Walker-Sperling, V.E.; Roeselers, G.; Newton, I.L.G. Characterization of the active microbiotas associated with honey bees reveals healthier and broader communities when colonies are genetically diverse. *PLoS ONE* 2012, **7**, e32962.
150. Asama, T.; Arima, T.H.; Gomi, T.; Keishi, T.; Tani, H.; Kimura, Y.; Tatefuji, T.; Hashimoto, K. *Lactobacillus kunkeei* YB38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults. *J. Appl. Microbiol.* 2015, **119**, 818–826.
151. Donkersley, P.; Rhodes, G.; Pickup, R.; Jones, K.; Wilson, K. Bacterial communities associated with honeybee food stores are correlated with land use. *Ecol. Evol.* 2018, **8**, 4743–4756.
152. Di Cagno, R.; Filannino, P.; Cantatore, V.; Gobbetti, M. Novel solid-state fermentation of bee-collected pollen emulating the natural fermentation process of bee bread. *Food Microbiol.* 2019, **82**, 218–230.
153. Disayathanoowat, T.; Li, H.; Supapimon, N.; Suwannarach, N.; Lumyong, S.; Chantawannakul, P.; Jun, G. Microorganisms Different Dynamics of Bacterial and Fungal Communities in Hive-Stored Bee Bread and Their Possible Roles: A Case Study from Two Commercial Honey Bees in China. *Microorganisms* 2020, **8**, 264.
154. Jelena Ćirić, Nils Haneklaus, Sara Rajić, Tatjana Baltić, Ivana Branković Lazić, Vesna Đorđević, Chemical composition of bee bread (perga), a functional food: A review, *Journal of Trace Elements and Minerals*, Volume 2, 2022, 100038, ISSN 2773-0506, <https://doi.org/10.1016/j.jtemin.2022.100038>
155. Didaras NA, Karatasou K, Dimitriou TG, Amoutzias GD, Mossialos D. Antimicrobial Activity of Bee-Collected Pollen and Beebread: State of the Art and Future Perspectives. *Antibiotics*. 2020; **9**(11):811. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110811>
156. Didaras NA, Kafantaris I, Dimitriou TG, Mitsagga C, Karatasou K, Giavasis I, Stagos D, Amoutzias GD, Hatjina F, Mossialos D. Biological Properties of Bee Bread Collected from Apiaries Located across Greece. *Antibiotics*. 2021; **10**(5):555. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050555>

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β. ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ, ΤΗΣ ΓΥΡΗΣ ΤΩΝ ΜΕΛΙΣΣΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΤΑ ΖΥΜΩΜΕΝΗΣ ΓΥΡΗΣ

Β1. ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ – ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΕΚΡΙΖΩΣΗ ΒΙΟΪΜΕΝΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Β.1.1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Λαμβάνοντας υπόψη διάφορες δημοσιευμένες μελέτες, το ΜΨ έχει τουλάχιστον ίση θρεπτική αξία και βιοδραστικότητα με τη ΓΜ [1]. Θεωρείται λειτουργικό τρόφιμο με σημαντικά οφέλη για την υγεία με θεραπευτικές εφαρμογές παρόμοιες με της γύρης [2,3,4] και μάλιστα θεωρείται περισσότερο βιοδραστικό, χορηγούμενο σε μικρότερες δόσεις ή για μικρότερο χρονικό διάστημα [4]. Ωστόσο παραμένει το λιγότερο μελετημένο μελισσοκομικό προϊόν όσον αφορά τις βιολογικές του ιδιότητες.

Οι σχετικές μελέτες είναι σπάνιες και σε αυτές διαπιστώνεται μεγάλη διακύμανση των αντιμικροβιακών και αντιοξειδωτικών του ιδιοτήτων [1,5-9]. Η μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων αποδίδεται στη διαφορετική βοτανική και γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων καθώς και τις διαφορές όσον αφορά τις μεθόδους εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν.

Μια άλλη πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι οι περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες για την αντιμικροβιακή δράση του ΜΨ αναφέρονται σε λίγα δείγματα [1], με εξαίρεση την πολύ πρόσφατη μελέτη, από τους Pelka et al [5], στο πολωνικό ΜΨ. Προκειμένου να συσχετιστούν οι βιολογικές ιδιότητες με τη βοτανική προέλευση, απαιτείται επαρκής αριθμός δειγμάτων που να αντιπροσωπεύει τόσο τη βοτανική ποικιλότητα όσο και τη γεωγραφική κατανομή.

Η αντιμικροβιακή δράση του ΜΨ αποδίδεται κυρίως σε μεταβολίτες φυτικής προέλευσης. Στη βιβλιογραφία τεκμηριώνεται η αντιμικροβιακή δράση τέτοιων μεταβολιτών οι οποίοι είτε έχουν απομονωθεί από διάφορες πηγές είτε έχουν συντεθεί (πίνακας 2). Εκτός από τους μεταβολίτες φυτικής προέλευσης δεν μπορεί να αποκλειστεί και η συμβολή του μικροβιώματος του ΜΨ στη βιοδραστικότητά του.

Στο πλαίσιο αυτής της διατριβής αξιολογήθηκαν για πρώτη φορά οι αντιβακτηριακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες δειγμάτων ΜΨ, που συλλέχθηκαν από διάφορα μέρη της Ελλάδας και επιχειρήθηκε η συσχέτισή τους με τη βοτανική τους προέλευση. Η δειγματοληψία σχεδιάστηκε ώστε να περιλαμβάνει τοποθεσίες με διαφορετικά κλιματικά χαρακτηριστικά όπως η νοτιοανατολική Κρήτη, όπου το κλίμα είναι ξηροθερμικό και κυριαρχούν τα φρυγανικά οικοσυστήματα αλλά και η Κοζάνη και η Άρτα, όπου το κλίμα είναι πιο υγρό και ψυχρό. Οι κλιματικές διαφορές επηρεάζουν σημαντικά τις φυτικές κοινότητες από τις οποίες προέρχεται η γύρη που συλλέγουν οι μέλισσες [22,23]. Θα πρέπει εδώ να επισημάνουμε ότι η ελληνική χλωρίδα χαρακτηρίζεται από υψηλή βιοποικιλότητα, καθώς περιλαμβάνει 5.885 είδη και 2.000 υποείδη, που αντιπροσωπεύουν 6.760 taxa. Από αυτά, 1.061 είδη, 411 υποείδη και 31 ποικιλίες είναι ενδημικά, συνολικά 1.442 taxa [24].

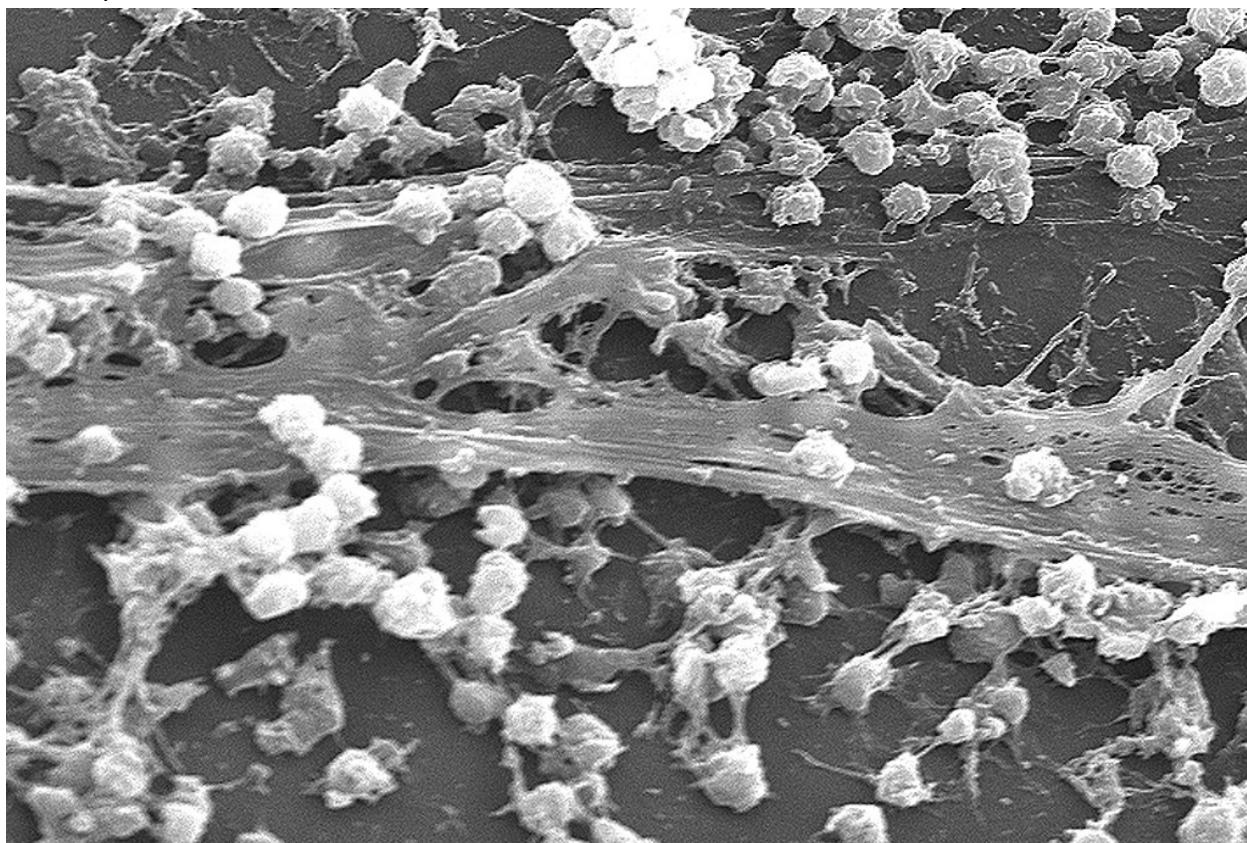
Μετρήθηκε η συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά (TPC) και η συνολική περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή (TFC) των δειγμάτων και αξιολογήθηκε η αντιοξειδωτική δράση με τις δοκιμές DPPH και ABTS•+. Η αντιβακτηριακή δράση ελέγχθηκε έναντι ενός παθογόνου που προκαλεί τροφολοιμώξεις (*S. Typhimurium*), έναντι δύο σημαντικών νοσοκομειακών παθογόνων (*P. aeruginosa* και *K. pneumoniae*) και κατά του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *S. aureus*.

Πίνακας 2. Μεταβολίτες με αντιμικροβιακή δράση που έχουν απομονωθεί από ΓΜ και τρόπος δράσης τους

ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	ΑΛΛΕΣ ΟΥΣΙΕΣ	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ
Γλυκοσίδες κερκετίνης	Βλάβη στο κυτταρικό τοίχωμα και στη μεμβράνη, επηρεάζεται η μεταφορά ουσιών και η κινητικότητα [10]. Επίδραση στη δημιουργία βιοϋμένων από ζύμες και μύκητες [11].	Φερουλικό οξύ	Βλάβη στη κυτταρική μεμβράνη, μεταβολή της επιφανειακής υδροφοβικότητας [19].
Γλυκοσίδες καμφερόλης	Επίδραση στη δημιουργία βιοϋμένων από ζύμες και μύκητες [11] Μείωση ενεργότητας της τοποϊσομεράσης IV [12]	Γαλλικό οξύ	Βλάβη στη κυτταρική μεμβράνη, μεταβολή της επιφανειακής υδροφοβικότητας [19].
Μυρικετίνη	Καταστέλλει την DnaB ελικάση της <i>E. coli</i> [13].	Εστέρες του καφεϊκού οξέος	Καταστέλλει την βακτηριακή ανάπτυξη λόγω αναστολής της αντιμετώπισης του οξειδωτικού stress [20].
Λουτεολίνη	Επιδρά στις βακτηριακές μεμβράνες, και στη δημιουργία βιοϋμένων [14]	p-κουμαρικό οξύ	Καταστρέφει την βακτηριακή μεμβράνη και δεσμεύεται στο βακτηριακό DNA [21].
Απιγενίνη	Αποσταθεροποιεί το κυτταρικό τοίχωμα [15,16]		
Γκαλαγκίνη	Συσσωμάτωση βακτηριακών κυττάρων [17]. Προκαλεί βλάβη στην βακτηριακή μεμβράνη και οδηγεί σε απώλεια καλίου [18]		

Επιπλέον διερευνήθηκε η αναστολή δημιουργίας και η εκρίζωση βιοϋμένων παθογόνων βακτηρίων. Τα βακτήρια κατά την εξάπλωσή τους μπορεί να υπάρχουν είτε σε πλαγκτονική μορφή (ελεύθερα κινούμενα) είτε προσκολλημένα σε στερεές επιφάνειες δημιουργώντας δομές, τους βιοϋμένες που αποτελούνται από ένα πλέγμα εξωπολυακσαχαριτών και DNA εντός των οποίων περιέχονται μικροαποικίες βακτηρίων. Η δημιουργία των βιοϋμένων παρατηρείται τόσο σε αβιοτικές επιφάνειες στο περιβάλλον όσο και σε ζωντανούς οργανισμούς. Οι βιοϋμένες προστατεύουν τα παθογόνα βακτήρια έναντι των αντιβιοτικών και αντισηπτικών καθιστώντας δυσχερέστερη την αντιμετώπισή τους [25].

Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε η δυνατότητα δειγμάτων ΜΨ τόσο να αναστέλουν τη δημιουργία βιοϋμένων παθογόνων όσο και να συμβάλλουν στην εκρίζωσή τους. Η μελέτη αφορούσε τα βακτήρια *S. aureus* και *Acinetobacter baumannii*, τα οποία συμπεριλαμβάνονται στα παθογόνα ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Enterobacter* sp.), λόγω της ανθεκτικότητας που εμφανίζουν σε αντιβιοτικά [26]



Φωτογραφία 4. Βιοϋμένας *S. aureus* σε καθετήρα Image credit: CDC/ Rodney M. Donlan, Ph.D.; Janice Carr (PHIL #7488), 2005. Obtained from the CDC Public Health Image Library Πηγή Wikimedia Commons

Ο *S. aureus* είναι ένα δυνητικά παθογόνο βακτήριο που σχετίζεται τόσο με τοπικές όσο και με συστηματικές λοιμώξεις (ενδοκαρδίτιδες, οστεομυελίτιδες, βακτηριαιμία κ.α.) στον άνθρωπο και στα ζώα [27]. Ενοχοποιείται επίσης για τροφοδηλητηριάσεις λόγω της εντεροτοξίνης που παράγει όταν ο πληθυσμός του είναι αυξημένος ($>10^5$ CFUs/gr) σε τρόφιμα [28]. Ο βιοϋμένας που σχηματίζει αποτελείται από πολυσακχαρίτες (poly-N-acetylglucosamine), νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες. Η δημιουργία βιοϋμένων από το συγκεκριμένο παθογόνο το προστατεύει τόσο από τα αντιβιοτικά όσο και από το ανοσοποιητικό σύστημα των ασθενών που προσβάλλει [27].

Το *Acinetobacter baumannii* είναι ένα ευκαιριακό νοσοκομειακό παθογόνο που εμπλέκεται σε λοιμώξεις του αναπνευστικού και σε λοιμώξεις σε σημεία καθετηριασμού όπου εγκαθίσταται και δημιουργεί βιοϋμένες, ιδίως σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς ή ασθενείς με χρόνια νοσήματα. Βρίσκεται στο περιβάλλον και σε ιατρικό εξοπλισμό. Η αντιμετώπιση του συγκεκριμένου παθογόνου είναι δυσχερής τόσο λόγω των βιοϋμένων που δημιουργεί όσο και λόγω της εμφάνισης ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών του [29].

Η εύρεση νέων αντιμικροβιακών παραγόντων που αναστέλλουν τη δημιουργία βιοϋμένων ή επιδρούν σε αυτούς και τους εκριζώνουν είναι κομβικής σημασίας για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων.

Αξίζει να τονιστεί ότι στα δείγματα ΜΨ που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές δεν έγινε καμία χημική επεξεργασία και χρησιμοποιήθηκαν με τη μορφή υδατικών εναιωρημάτων έτσι ώστε να ελεγχθεί η βιοδραστικότητα του προϊόντος στη μορφή που αυτό καταναλώνεται.

B.1.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Συνολικά 18 διαφορετικά δείγματα ΜΨ συλλέχθηκαν από διάφορες τοποθεσίες της Ελλάδας (Πίνακας 2). Κατά τη μελισσοκομική περίοδο 2019 συγκομίστηκαν 17 δείγματα. Το δείγμα 2 συλλέχθηκε ένα χρόνο νωρίτερα (2018) και το πλαίσιο αποθηκεύτηκε σε κενή κυψέλη, σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι να εξαχθεί από αυτό το ΜΨ μαζί με τα άλλα δείγματα το 2019.



Φωτογραφία 5. Δειγματοληψία μελισσόψωμου από την κηρήθρα. Φωτογραφία Νίκος Ασούτης Διδάρας

Σε κάθε δείγμα δόθηκε ένας μοναδικός αριθμός αναφοράς και καταγράφηκαν επίσης λεπτομέρειες σχετικά με τη γεωγραφική θέση, τις πιθανές βοτανικές πηγές και την ημερομηνία συγκομιδής. Το ΜΨ λήφθηκε απευθείας από τις κηρήθρες χρησιμοποιώντας πλαστικούς σωλήνες ίσης διαμέτρου με τα κελιά στα οποία ήταν αποθηκευμένο. Στη συνέχεια κάθε δείγμα εξήχθη από το σωλήνα χρησιμοποιώντας ένα έμβολο. Όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε αποστειρωμένα πλαστικά δοχεία στους -20°C. Οι μελισσοκόμοι παρέιχαν προκαταρκτικά δεδομένα για τη βοτανική πηγή κάθε δείγματος ΜΨ, με βάση τη διαθέσιμη χλωρίδα κατά την περίοδο της συγκομιδής στη θέση του μελισσοκομείου.

Πίνακας 3. Δείγματα ΜΨ, βοτανική και γεωγραφική προέλευση, εποχή και έτος δειγματοληψίας

Αριθμός δείγματος	Βοτανική προέλευση	Γεωγραφική περιοχή	Εποχή – Έτος
1	Πολυανθικό	Σωτηρίτσα, Λάρισα	Άνοιξη 2019
2	Πολυανθικό	Θεσσαλία	2018
	51,5% κισσός, <i>Hedera helix</i>		
3	Πολυανθικό	Πήλιο, Μαγνησία	Άνοιξη 2019
4	Πολυανθικό	Αγιά, Λάρισα	Άνοιξη 2019
5	Πολυανθικό	Πήλιο, Μαγνησία	Φθινόπωρο 2019
	52,4% κισσός, <i>Hedera helix</i>		
6	Πολυανθικό	Κόζιακας, Θεσσαλία	Άνοιξη 2019
7	Πολυανθικό	Τύλισος, Ηράκλειο	Άνοιξη 2019
8	Πολυανθικό	Κοζάνη	Άνοιξη 2019
9	Πολυανθικό	Μελιδόνι, Ρέθυμνο	Άνοιξη 2019
10	Πολυανθικό	Άρτα	Άνοιξη 2019
11	Πολυανθικό	Χανιά	Άνοιξη 2019
	54,8% Μποράντζα, <i>Borago</i> spp.		
12	πολυανθικό	Σωτηρίτσα, Λάρισα	Άνοιξη 2019
13	Μονοανθικό Λαδανιά	Σωτηρίτσα, Λάρισα	Άνοιξη 2019
	78,5% <i>Cistus</i> spp		
14	Πολυανθικό	Λασιίθι	Άνοιξη 2019
15	Πολυανθικό	Εύβοια	Καλοκαίρι 2019
16	Πολυανθικό	Αρκαδία, Πελοπόννησος	Καλοκαίρι 2019
17	Πολυανθικό	Χαλκιδική	Καλοκαίρι 2019
18	Μονοανθικό Καστανιά	Όρος Άθως	Καλοκαίρι 2019
	99,8% <i>Castanea sativa</i>		

ΠΑΛΥΝΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η παλυνολογική ανάλυση διεξήχθη από τα εργαστήρια CheMa (Κόρινθος, Ελλάδα) ως εξής: Ποσότητα 5-10 mg από κάθε δείγμα εναιωρήθηκε σε 1 ml απιονισμένου νερού χρησιμοποιώντας αναμικτήρα στροβιλισμού. Από κάθε εναιώρημα 0,5 ml απλώθηκε σε μια περιοχή 22x22 mm μιας αντικειμενοφόρου πλάκας μικροσκοπίου και αφέθηκε να στεγνώσει στους 39°C. Μετά από προθέρμανση μιας πλάκας κάλυψης μια σταγόνα γλυκερίνης μεταφέρθηκε σε αυτήν. Αυτό κρατά τη γύρη στη θέση του, ενώ η καλυπτρίδα τοποθετείται πάνω στο αποξηραμένο ίζημα. Οι κόκκοι γύρης ταυτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας οπτικό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 400x. Για τον προσδιορισμό της προέλευσης της γύρης χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες βάσεις δεδομένων: άτλας γύρης (διαθέσιμος στο pollenatlas.net), βάση δεδομένων pollen-wiki και βιβλιοθήκη γύρης των εργαστηρίων CheMa.

Πραγματοποιήθηκε παλυνολογική ανάλυση και στα 18 δείγματα προκειμένου να διερευνηθεί εάν υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ της αντιοξειδωτικής δράσης, της αντιμικροβιακής δράσης και της βοτανικής προέλευσης. Ο Πίνακας 2 δείχνει την περιεκτικότητα σε κόκκους γύρης (%) για κάθε δείγμα.

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ (TPC)

Η ολική περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες (TPC) των δειγμάτων ΜΨ προσδιορίστηκε σύμφωνα με ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο της μεθόδου Folin-Ciocalteu [30]. Συγκεκριμένα, ζυγίστηκε μια ποσότητα (0,02 g) από κάθε δείγμα ΜΨ και διαλύθηκε σε 1 ml απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια 20 μl από κάθε δείγμα ΜΨ προστέθηκαν σε ένα σωλήνα που περιείχε 1 ml απιονισμένου νερού. Ακολούθως, 100 μl αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu προστέθηκαν στο μείγμα και ο σωλήνας αφέθηκε να παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά. Στη συνέχεια, 280 μl διαλύματος ανθρακικού νατρίου 25% w/v και 600 μl απιονισμένου νερού προστέθηκαν στο μείγμα. Μετά από 1 ώρα επώασης σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι, η απορρόφηση μετρήθηκε στα 765 nm έναντι ενός τυφλού που περιείχε αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και μόνο απιονισμένο νερό. Οι μετρήσεις διεξήχθησαν σε φασματοφωτόμετρο Spectro UV-12, MRC, Holon, Israel. Η TPC προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας μια τυπική καμπύλη αναφοράς με μεταβλητές συγκεντρώσεις (25-500 μg/ml) γαλλικού οξέος. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAEs)/g δειγματος χρησιμοποιώντας την τυπική καμπύλη (απορρόφηση έναντι συγκέντρωσης) που παρασκευάζεται από καθαρό γαλλικό οξύ. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και τουλάχιστον σε 2 ξεχωριστά πειράματα.

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ (TFC)

Οι μετρήσεις έγιναν στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα συνολικά φλαβονοειδή προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας τη χρωματομετρική μέθοδο χλωριούχου αργιλίου, όπως περιγράφεται από τους Hassan et al [31], με ορισμένες τροποποιήσεις. Κάθε δείγμα (0,2 g) εκχυλίστηκε με 5 ml αιθανόλης 80%. Τα δείγματα αναμίχθηκαν για περίπου 1 λεπτό και αφέθηκαν όλη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από φυγοκέντρηση στα 4000 X g για 10 λεπτά, το υπερκείμενο συλλέχθηκε και διηθήθηκε με απλό διηθητικό χαρτί και τα διαφανή διηθήματα (εκχυλίσματα ΜΨ) αποθηκεύτηκαν σε σφραγισμένους γυάλινους σωλήνες για περαιτέρω ανάλυση. Η συνολική περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας μια καμπύλη αναφοράς με τυπικές συγκεντρώσεις (5-100 μg/ml) κερκετίνης. Για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης 100 mg κερκετίνης διαλύθηκαν σε 100 ml (1 mg/ml) αιθανόλης 80% και στη συνέχεια από αυτό το μητρικό διάλυμα παρασκευάστηκαν αραιωμένα πρότυπα διαλύματα. Από κάθε αραιωμένο πρότυπο διάλυμα 0,5 ml μεταφέρθηκαν σε γυάλινους σωλήνες με προσθήκη 1,5 ml 95% αιθανόλης, 0,1 ml 10% $AlCl_3$, 0,1 ml 1M οξικού καλίου και 2,8 ml απεσταγμένου νερού. Για το τυφλό δείγμα 0,5 ml αιθανόλης 80% μεταφέρθηκε σε γυάλινο σωλήνα με 1,5 ml αιθανόλης 95%, 0,1 ml οξικού καλίου 1 M και 2,9 ml απεσταγμένου νερού. Τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά πριν μετρηθεί η απορρόφηση κάθε δειγματος στα 415 nm (φασματοφωτόμετρο MRC Spectro UV-12 Holon, Israel). Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για τη μέτρηση των εκχυλισμάτων ΜΨ, με αντικατάσταση 0,5 ml των προτύπων διαλυμάτων με 0,5 ml κάθε διηθήματος δειγματος, μετά από κατάλληλη αραιώση (1/10 αραιώση) των εκχυλισμάτων (διηθημάτων) με 80% αιθανόλη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mg ισοδυνάμου κερκετίνης (QE)/g dw εκχυλίσματος χρησιμοποιώντας την τυπική καμπύλη (απορρόφηση έναντι συγκέντρωσης) που παρασκευάζεται από κερκετίνη. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΜΕ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ DPPH

Η δραστηριότητα των δειγμάτων ΜΨ όσον αφορά την εξουδετέρωση ριζών 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυλ (DPPH) αξιολογήθηκε όπως έχει ήδη περιγραφεί [32]. Συγκεκριμένα, μια ποσότητα (0,2 g) από κάθε δείγμα ΒΒ ζυγίστηκε και αραιώθηκε σε 1 ml μεθανόλης. 50 μl από κάθε δείγμα ΜΨ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μετά από αραιώση σε μεθανόλη διαλύθηκε σε 900 μl μεθανόλης και μετά από ανάμιξη προστέθηκαν 50 μl πρόσφατα παρασκευασμένου μεθανολικού διαλύματος ρίζας DPPH (100 μM).

Τα περιεχόμενα αναμίχθηκαν έντονα, επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 20 λεπτά και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 517 nm. Οι μετρήσεις διεξήχθησαν σε φωτόμετρο mrc spectro υν-12 Holon, Israel. Σε κάθε πείραμα, το υπό εξέταση δείγμα διαλυμένο μόνο σε μεθανόλη χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό και η ρίζα DPPH μόνο σε μεθανόλη χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Το ποσοστό της ικανότητας καθαρισμού ριζών (RSC) των δειγμάτων που δοκιμάστηκαν υπολογίστηκε σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση: $RSC (\%) = [(A_{control} - A_{sample})/A_{control}] \times 100$, όπου $A_{control}$ και A_{sample} είναι οι τιμές απορρόφησης του μάρτυρα και τα ελεγμένα δείγματα, αντίστοιχα. Επιπλέον, προκειμένου να συγκριθεί η αποτελεσματικότητα εξουδετέρωσης ριζών των δειγμάτων, η τιμή IC_{50} που δείχνει τη συγκέντρωση που προκάλεσε εξουδετέρωση 50% της ρίζας DPPH υπολογίστηκε από τη γραφική παράσταση του ποσοστού της RSC έναντι της συγκέντρωσης του δείγματος. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και τουλάχιστον σε 2 ξεχωριστά πειράματα.

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΜΕ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ ΚΑΤΙΟΝΤΩΝ ΡΙΖΩΝ ABTS•+

Η ικανότητα εξουδετέρωσης ελεύθερων ριζών από τα δείγματα του ΜΨ προσδιορίστηκε με τη δοκιμασία 2,2'-αζινο-δισ(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ) (ABTS•+) όπως έχει περιγραφεί από τους Cano et al με ορισμένες τροποποιήσεις [33]. Για τη δοκιμή ABTS, μια ποσότητα (0,2 g) από κάθε δείγμα ΜΨ ζυγίστηκε και διαλύθηκε σε 1 ml απεσταγμένο νερό. Η διάλυση της ρίζας ABTS•+ προετοιμάστηκε με ανάμειξη 2 mM ABTS με 30 μ M H_2O_2 και 6 μ M ενζύμου υπεροξειδάσης (horseradish peroxidase, HRP) διαλυμένη σε 50 mM PBS (pH 7,5). Αμέσως, μετά την προσθήκη του ενζύμου HRP, τα υλικά αναμίχθηκαν έντονα, επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι και η αντίδραση παρακολουθήθηκε με φωτομετρήσεις στα 730 nm μέχρι να επιτευχθεί σταθερή απορρόφηση. Στη συνέχεια, 10 μ l διαφορετικών συγκεντρώσεων δείγματος αραιωμένα σε απεσταγμένο νερό προστέθηκαν στο μίγμα της αντίδρασης και μετρήθηκε η μείωση της απορρόφησης στα 730 nm. Σε κάθε πείραμα, το ελεγμένο δείγμα μόνο του που περιείχε 1 mM ABTS και 30 μ M H_2O_2 σε 50 mM PBS (pH 7,5) χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό, ενώ το σχηματισμένο ριζικό διάλυμα ABTS•+ μόνο με 10 μ l H_2O χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Το ποσοστό RSC και οι τιμές IC_{50} προσδιορίστηκαν όπως περιγράφεται παραπάνω για τη μέθοδο DPPH. Όλα οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και τουλάχιστον σε 2 ξεχωριστά πειράματα.

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Η αντιβακτηριακή δράση διαφορετικών τύπων ΜΨ δοκιμάστηκε έναντι του στελέχους 1552 του *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) που είναι ανθεκτικό στη μεθικιλίνη (MRSA), του στελέχους 1773 της *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) που έχει ανθεκτικότητα σε καρβαπενέμες, της *Salmonella enterica* sub. *Typhimurium* (*S. typhimurium*) και της *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*). Όλα τα κλινικά στελέχη ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν με τυπικές εργαστηριακές μεθόδους (με ευγενική παραχώρηση από τον Καθ. Σπύρο Πουρνάρα, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα). Τα βακτήρια καλλιεργούνταν σε ζωμό Mueller-Hinton (Lab M, Bury, UK) ή Mueller-Hinton agar (Lab M) στους 37°C.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΜΨ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ (MIC) - ΜΕΤΡΗΣΗ ΞΗΡΟΥ ΒΑΡΟΥΣ

Από κάθε δείγμα ΜΨ 0,5 gr διαλύθηκαν σε αποστειρωμένο dH₂O σε τελικό όγκο 2 ml, για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, με περιστασιακό στροβιλισμό και συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν σε 10.000Xg για 7 λεπτά. Λήφθηκε η υδατική φάση, διηθήθηκε μέσω φίλτρου σύριγγας 0,22 μm και χρησιμοποιήθηκε για διαδοχικές αραιώσεις σε ζωμό Mueller-Hinton. Η συγκέντρωση ΜΨ κυμαινόταν από 25 έως 0,39% w/v.

Υπολογισμός ξηρού βάρους: 0,1 mg από κάθε δείγμα ΜΨ διαλύθηκε σε 0,7 ml dH₂O για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με περιστασιακό στροβιλισμό. Φυγοκεντρήθηκε στα 10.000Xg για 7 λεπτά. Η υδατική φάση διηθήθηκε μέσω φίλτρου σύριγγας 0,22 μm, ζυγίστηκε, ξηράνθηκε για 24 ώρες στους 90° C και ζυγίστηκε ξανά για τον υπολογισμό του ξηρού βάρους.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ (MIC)

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) των δειγμάτων ΜΨ προσδιορίστηκε σε στείρες πλάκες μικροτιτλοδότησης πολυστυρενίου 96 φρεατίων (Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Γερμανία) χρησιμοποιώντας φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό, όπως περιγράφηκε προηγουμένως [32] με ορισμένες τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν φρέσκες βακτηριακές καλλιέργειες (επώαση περίπου 15 ώρες στους 37° C σε ζωμό Mueller-Hinton) που προσαρμόστηκαν σε 0,5 McFarland (~1,5x10⁸ CFUs/ml). Περίπου 5x10⁴ CFUs σε 10 μl ζωμό Mueller-Hinton προστέθηκαν σε 190 μl από κάθε αραιώση (από σειρά δυαδικών αραιώσεων) του δείγματος ΜΨ (η συγκέντρωση του ΜΨ κυμαινόταν από 50 έως 0,39% w/v) σε ζωμό Mueller-Hinton. Τα φρεάτια θετικού μάρτυρα περιείχαν μόνο ζωμό Mueller-Hinton εμβολιασμένο με βακτήρια. Τα φρεάτια αρνητικού μάρτυρα περιείχαν αραιώσεις ΜΨ σε ζωμό Mueller-Hinton χωρίς βακτήρια. Η οπτική πυκνότητα (OD) προσδιορίστηκε στα 630 nm χρησιμοποιώντας τη συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκων EL x808 Absorbance (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) ακριβώς πριν από την επώαση (t=0) και μετά από 24 ώρες επώασης (t=24) στους 37° C. Η OD από κάθε πηγάδι αρνητικού μάρτυρα ΜΨ σε t=24 αφαιρέθηκε από την OD του αντίστοιχου πηγαδιού (ίδιας αραιώσης) του δείγματος ΜΨ που περιέχει τα βακτήρια σε t=24.

Η αναστολή ανάπτυξης σε κάθε αραιώση ΜΨ προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τον τύπο: % αναστολή = 1 - (OD φρεατίου δοκιμής δείγματος - OD του αντίστοιχου αρνητικού φρεατίου) x100. Η τιμή MIC προσδιορίστηκε ως η χαμηλότερη συγκέντρωση ΜΨ που έχει ως αποτέλεσμα 100% αναστολή βακτηριακής ανάπτυξης.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΟΥ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ (MBC)

Η ελάχιστη βακτηριοκτόνη συγκέντρωση (MBC) είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση του ΜΨ που θα μπορούσε να σκοτώσει τα παθογόνα βακτήρια. Η MBC προσδιορίστηκε με μεταφορά μιας μικρής ποσότητας δείγματος που περιέχεται σε κάθε φρεάτιο των πλακών μικροτιτλοδότησης (στις οποίες έγιναν οι δοκιμές προσδιορισμού της MIC) σε πλάκες άγαρ Mueller-Hinton χρησιμοποιώντας έναν αντιγραφέα μικροπλάκας (BoeckelScientific, Pennsylvania, USA). Οι πλάκες επώαστηκαν στους 37° C για 24 ώρες. Η τιμή MBC προσδιορίστηκε ως η χαμηλότερη συγκέντρωση ΜΨ στην οποία δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών [34].

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD ($n=3$). Για τη στατιστική ανάλυση, εφαρμόστηκε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA). Όλες οι αναλύσεις συσχέτισης έγιναν χρησιμοποιώντας την ανάλυση συσχέτισης Spearman. Οι τιμές $P<0,05$ θεωρήθηκαν ότι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο SPSS έκδοσης 13.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΜΨ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥΣ ΜΕ ΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗ-Κ

Προκειμένου να παρασκευαστούν τα πρωτεϊνικά κλάσματα, 500 mg από κάθε δείγμα διαλύθηκαν σε στείρο απιονισμένο νερό (dH_2O) μέχρι τελικού όγκου 1,5 ml. Τα δείγματα παρέμειναν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με περιστασιακή ανάδευση. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά σε 10.000 $\times$ g και το υπερκείμενο υδατικό κλάσμα συλλέχθηκε. Κατόπιν προστέθηκε στερεό θειικό αμμώνιο $(NH_4)_2SO_4$ (AnalaR, BDH Chemicals Ltd., Poole, Αγγλία) σταδιακά μέχρι τελικής συγκέντρωσης 60% w/v. Τα δείγματα αναδεύτηκαν απαλά και αφέθηκαν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για εξισορρόπηση, κατόπιν τοποθετήθηκαν για 10 λεπτά στους $-20^\circ C$ και φυγοκεντρήθηκαν για 30 λεπτά σε 11.000 $\times$ g. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε στις δοκιμές διάχυσης σε άγαρ για τη διερεύνηση της αντιβακτηριακής δράσης τους. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1 ml στείρου dH_2O [35,36]. Επί πλέον τα πρωτεϊνικά κλάσματα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με 150 $\mu g/ml$ πρωτεϊνάσης-Κ (Blirt, Πολωνία) για 24 ώρες στους $37^\circ C$ στις 210 rpm, και στη συνέχεια, δοκιμάστηκαν για την εκδήλωση αντιβακτηριακής δράσης.

ΔΟΚΙΜΗ ΔΙΑΧΥΣΗΣ ΣΕ ΑΓΑΡ

Τα πρωτεϊνικά κλάσματα των δειγμάτων ΜΨ πριν και μετά την επεξεργασία τους με πρωτεϊνάση-Κ δοκιμάστηκαν για την εκδήλωση αντιβακτηριακής δράσης έναντι του *S. aureus*. Επιπλέον δοκιμάστηκε και το υπερκείμενο από κάθε δείγμα ΜΨ μετά την καθίζηση των πρωτεϊνών. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η διάχυση σε άγαρ. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα Mueller-Hinton agar (Lab M, Bury, UK), σε καθένα από τα οποία είχαν επιστρωθεί 100 μl φρέσκιας υγρής καλλιέργειας *S. aureus* ($OD_{600\text{ nm}}=0,13$, περίπου $1,5 \times 10^8$ CFU/ml), που είχε προετοιμαστεί όπως περιγράφεται πιο πάνω. Στα τρυβλία ανοίχτηκαν με άσηπτο τρόπο φρεάτια διαμέτρου 6 mm και σε καθένα αυτά τοποθετήθηκαν 100 μl δείγματος. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους $37^\circ C$ για περίπου 24 ώρες και συνέχεια κατόπιν παρατήρησης διαπιστώθηκε η ύπαρξη ή όχι ζώνη αναστολής της ανάπτυξης του *S. aureus* η διάμετρος της οποίας μετρήθηκε περιλαμβάνοντας και τη διάμετρο του φρεατίου.

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΚΡΙΖΩΣΗ ΒΙΟΪΜΕΝΩΝ - ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Η επίδραση διαφορετικών δειγμάτων ΜΨ στην αναστολή δημιουργίας και στην εκρίζωση βιοϊμμένων, δοκιμάστηκε έναντι του στελέχους 1552 του *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) που είναι ανθεκτικό στη μεθικυλλίνη και στελέχους του *Acinetobacter baumannii*. Τα βακτήρια αναπτύχθηκαν σε ζωμό Mueller-Hinton (Lab M, Bury, UK) στους $37^\circ C$ για περίπου 15 ώρες. Στη συνέχεια, μέρος της βακτηριακής καλλιέργειας αραιώθηκε μέχρι θολρότητας 0,5 McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ CFU/ml) και τελικά σε κάθε φρεάτιο της μικροπλάκας δοκιμής προστέθηκαν περίπου 5×10^4 CFUs.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ ΓΙΑ ΤΙΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΚΡΙΖΩΣΗΣ ΒΙΟΪΜΕΝΩΝ

Από κάθε δείγμα ΜΨ 0,5 gr διαλύθηκαν σε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό σε τελικό όγκο 2 ml για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με περιστασιακό στροβιλισμό. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε σε 10.000Xg για 7 λεπτά. Η υδατική φάση διηθήθηκε μέσω φίλτρου σύριγγας 0,22 μm και χρησιμοποιήθηκε για διαδοχικές αραιώσεις.

ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΒΙΟΪΜΕΝΑ

Η δοκιμή εφαρμόστηκε όπως έχει ήδη περιγραφεί από τους Tsavea et al με ορισμένες τροποποιήσεις [37] Συγκεκριμένα για τη δοκιμή χρησιμοποιήθηκαν στείρες πλάκες μικροτιτλοδότησης πολυστυρενίου 96 φρεατίων (Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Γερμανία).

Σε κάθε ξεχωριστή σειρά φρεατίων τοποθετήθηκαν 100μl ανά φρεάτιο από την αντίστοιχη διαδοχική αραιώση του ΜΨ, 90 μl ζωμού Mueller-Hinton (Lab M, Bury, UK) και 10μl βακτηριακής καλλιέργειας που περιείχε περίπου 5×10^4 CFUs και είχε προετοιμαστεί όπως αναφέρεται στην προηγούμενη παράγραφο. Στον ζωμό Mueller-Hinton είχε προστεθεί 2% γλυκόζη (SERVA, Heidelberg, GmbH). Χρησιμοποιήθηκε αρνητικός μάρτυρας χωρίς προσθήκη παθογόνου βακτηρίου αλλά και θετικός μάρτυρας χωρίς προσθήκη δείγματος ΜΨ ώστε να υπάρχει η δυνατότητα σύγκρισης του θετικού μάρτυρα με τα δείγματά μας όσον αφορά την αναστολή δημιουργίας βιοϊμένα.

Οι πλάκες μικροτιτλοδότησης επώαστηκαν στους 37 °C για 24 ώρες επιτρέποντας το σχηματισμό βιοϊμένα. Μετά από 24 ώρες μετρήθηκε η απορρόφηση στα 600 nm χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών (PerkinElmer Multimode plate reader, EnSpire manager, USA). Η υγρή φάση απομακρύνθηκε και οι πλάκες πλύθηκαν τρεις φορές με ορό φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος pH:7 (PBS). Τα προσκολλημένα κύτταρα σταθεροποιήθηκαν με μεθανόλη και ξηράνθηκαν στον αέρα στους 37°C για 20 λεπτά. Ο βιοϊμένας που είχε σχηματιστεί χρωματίστηκε με 0,4 % w/v κρυσταλλικό ιώδες για 15 λεπτά. Η χρωστική αφαιρέθηκε και τα φρεάτια ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Μετά από ξήρανση στον αέρα, προστέθηκε 30% v/v οξικό οξύ για 15 λεπτά, και στη συνέχεια η απορρόφηση μετρήθηκε στα 570 nm χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών (PerkinElmer Multimode plate reader, EnSpire manager, USA).

Οι μέσες μετρήσεις οπτικής πυκνότητας του θετικού μάρτυρα και κάθε συγκέντρωσης ΜΨ διορθώθηκαν αρχικά αφαιρώντας την οπτική πυκνότητα του αρνητικού μάρτυρα για τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Στη συνέχεια οι μετρήσεις στα 570 nm διαιρέθηκαν με τις μετρήσεις στα 600 nm για να κανονικοποιηθούν τα δεδομένα.

Κατά συνέπεια, η διαφορά μεταξύ του κανονικοποιημένου μέσου όρου της ομάδας θετικού μάρτυρα και του κανονικοποιημένου μέσου όρου των διαφορετικών συγκεντρώσεων ΜΨ υπολογίστηκε και παρουσιάστηκε ως ποσοστό αναστολής δημιουργίας βιοϊμένα. Πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρεις μετρήσεις ανά δείγμα την ίδια χρονική στιγμή.

ΔΟΚΙΜΗ ΕΚΡΙΖΩΣΗΣ ΒΙΟΪΜΕΝΩΝ

Για τη δοκιμή χρησιμοποιήθηκαν στείρες πλάκες μικροτιτλοδότησης πολυστυρενίου 96 φρεατίων (Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Γερμανία). Σε κάθε φρεάτιο τοποθετήθηκαν 190 μl ζωμού Mueller-Hinton (Lab M, Bury, UK) στον οποίο είχε προστεθεί 2% γλυκόζη (SERVA, Heidelberg, GmbH), και 10μl βακτηριακής καλλιέργειας που περιείχε περίπου 5×10^4 CFUs και είχε προετοιμαστεί όπως αναφέρεται σε προηγούμενη παράγραφο. Χρησιμοποιήθηκε αρνητικός μάρτυρας χωρίς προσθήκη παθογόνου βακτηρίου.

Οι πλάκες μικροτιτλοδότησης επώαστηκαν στους 37 °C για 24 ώρες, επιτρέποντας το σχηματισμό βιοϋμένα. Μετά από 24ωρη επώαση στους 37 °C χρησιμοποιήθηκε συσκευή ανάγνωσης πλακών (PerkinElmer Multimode plate reader, EnSpire manager, USA) για τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 600 nm. Τα πλαγκτονικά κύτταρα μαζί με το υπερκείμενο υγρό αφαιρέθηκαν. Σε κάθε ξεχωριστή σειρά φρεατίων τοποθετήθηκαν 200μl ανά φρεάτιο από την αντίστοιχη διαδοχική αραιώση του δείγματος ΜΨ και επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37 °C.

Χρησιμοποιήθηκε θετικός μάρτυρας χωρίς προσθήκη δείγματος ΜΨ, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα σύγκρισης του θετικού μάρτυρα με τα δείγματά μας όσον αφορά την αναστολή δημιουργίας βιοϋμένα. Μετά την επώαση η υγρή φάση απομακρύνθηκε και οι πλάκες πλύθηκαν τρεις φορές με ορό φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος pH:7 (PBS). Τα προσκολλημένα κύτταρα σταθεροποιήθηκαν με μεθανόλη και ξηράνθηκαν στους 37°C για περίπου 20 λεπτά. Ο σχηματισμένος βιοϋμένας χρωματίστηκε με 0,4% w/v κρυσταλλικό ιώδες για 15 λεπτά. Η χρωστική αφαιρέθηκε και τα φρεάτια ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Μετά από ξήρανση στον αέρα, προστέθηκε 30% w/v οξικό οξύ για 15 λεπτά, και στη συνέχεια η απορρόφηση μετρήθηκε στα 570 nm χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκων (PerkinElmer Multimode plate reader, EnSpire manager, USA).

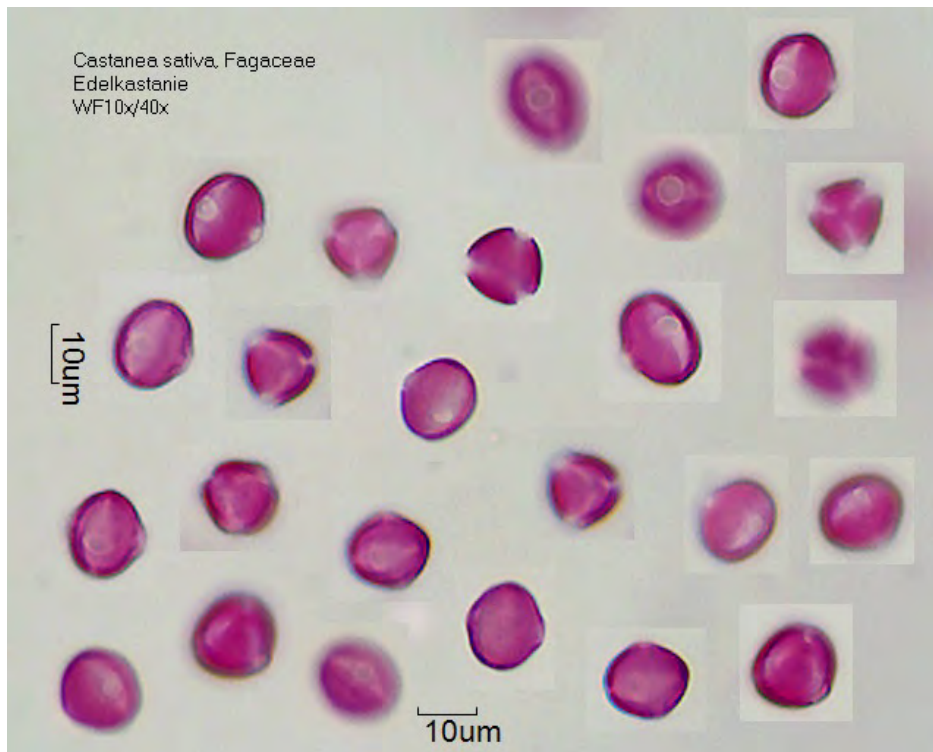
Οι μέσες μετρήσεις οπτικής πυκνότητας του θετικού μάρτυρα και κάθε συγκέντρωσης ΜΨ διορθώθηκαν αρχικά αφαιρώντας την οπτική πυκνότητα του αρνητικού μάρτυρα για τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Στη συνέχεια οι μετρήσεις στα 570 nm διαιρέθηκαν με τις μετρήσεις στα 600 nm για να κανονικοποιηθούν τα δεδομένα. Κατά συνέπεια, η διαφορά μεταξύ του κανονικοποιημένου μέσου όρου της ομάδας θετικού μάρτυρα και του κανονικοποιημένου μέσου όρου των διαφορετικών συγκεντρώσεων ΜΨ υπολογίστηκε και παρουσιάστηκε ως ποσοστό εκρίζωσης του βιοϋμένα. Πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρεις μετρήσεις ανά δείγμα την ίδια χρονική στιγμή.

B.1.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΠΑΛΥΝΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η παλυνολογική ανάλυση (Πίνακας 4) έδειξε ότι τα δείγματα 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16 και 17 είναι πολυανθικά. Τα δείγματα 2 και 5 περιέχουν 51,5% και 52,4% αντίστοιχα γύρη από κισσό (*Hedera helix*). Το δείγμα 8 περιέχει κατά 67% γύρη από είδη της οικογένειας *Brassicaceae*. Το δείγμα 11 περιέχει κατά 54,8% γύρη από είδη Μποράγκο (*Borago* spp.). Το δείγμα 13 περιέχει κατά 78,5% γυρεόκοκκους λαδανιάς (*Cistus* spp) και το δείγμα 18 που προέρχεται από τον Άθω περιέχει κατά 99,8% γύρη καστανιάς (*Castanea sativa*). Τα δύο αυτά δείγματα μπορούν να θεωρηθούν ως μονοανθικά.

Η παλυνολογική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε για τον συσχετισμό της βοτανικής προέλευσης με την αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική βιοδραστικότητα.



Εικόνα 1 Γυρεόκοκκοι *Castanea sativa*, Stebler Th., *Castanea sativa*, In: Pollen-Wiki (03. Dez. 2023) https://pollen.tstebler.ch/MediaWiki/index.php?title=Castanea_sativa



Εικόνα 2. Άνθη καστανιάς Πηγή: <http://melistalagma.blogspot.com/>

Πίνακας 4. Παλυνολογική ανάλυση δειγμάτων ΜΨ

δείγμα 1		δείγμα 2		δείγμα 3		δείγμα 4		δείγμα 5		δείγμα 6	
Taxa	% γυρεό- κοκκοί	Taxa	% γυρεό- κοκκοί	Taxa	% γυρεό- κοκκοί	Taxa	% γυρεό- κοκκοί	taxa	% γυρεό- κοκκοί	taxa	% γυρεό- κοκκοί
<i>Prunus sp</i>	42,2%	<i>Hederahelix</i>	51,5%	<i>Hypericum sp</i>	21,8%	<i>Brassicaceae family</i>	28,7%	<i>Hedera helix</i>	52,4%	<i>Salix sp</i>	32,2%
<i>Erica sp.</i>	17,7%	<i>Cupressus sp</i>	24,3%	<i>Salix sp</i>	14,4%	<i>Prunus sp</i>	20,4%	<i>Cupressus sp</i>	17,5%	<i>Hypericum sp</i>	22,4%
<i>Verbascum sp</i>	8,8%	<i>Eucalyptus sp</i>	11,6%	<i>Anthyllis hermaniae</i>	11,5%	<i>Salix sp</i>	11,6%	<i>Heliotropium europeum</i>	8,0%	<i>Brassicaceae family</i>	14,8%
Άγνωστο	8,3%	Άγνωστο	3,5%	<i>Brassicaceae family</i>	10,8%	<i>Begonia sp</i>	10,3%	<i>Trifolium repens</i>	6,3%	<i>Trifolium repens</i> 20	8,4%
<i>Castanea sativa</i>	4,3%	<i>Trifolium repens</i>	2,9%	<i>Bupleurum fruticosum</i>	8,1%	Άγνωστο	8,6%	<i>Amaranthaceae family</i>	6,1%	<i>Verbascum sp</i>	5,9%
<i>Bupleurum fruticosum</i>	3,8%	<i>Bupleurum fruticosum</i>	2,0%	<i>Verbascum sp</i>	5,4%	<i>Hypericum sp</i>	6,3%	<i>Anthyllis hermaniae</i>	5,3%	<i>Prunus sp</i>	4,1%
<i>Teucrium sp</i>	3,7%	<i>Heliotropium europeum</i>	1,6%	Άγνωστο	5,1%	<i>Teucrium sp</i>	4,6%	Άγνωστο	4,2%	<i>Pyrus sp</i>	3,9%
<i>Hypericum sp</i>	3,4%	<i>Prunus sp</i>	1,5%	<i>Robinia Pseudoacacia</i>	4,5%	<i>Erica sp.</i>	2,8%	<i>Rubus sp</i>	0,2%	Άγνωστο	3,8%
<i>Heliotropium europeum</i>	3,1%	<i>Hypericum sp</i>	1,2%	<i>Prunus sp</i>	4,1%	<i>Verbascum sp</i>	2,8%	<i>Brassicaceae family</i>	0,1%	<i>Robinia pseudoacacia</i>	2,4%
<i>Allium sp</i>	2,3%	<i>Thymus capitatus</i>	0,1%	<i>Heliotropium europeum</i>	3,9%	<i>Calicotome sp</i>	1,4%		100,0%	<i>Olea europea</i>	1,8%
<i>Calicotome sp</i>	1,1%			<i>Erica sp.</i>	2,6%	<i>Robinia pseudoacacia</i>	1,0%			<i>Sonchus sp</i>	0,4%
<i>Salix sp</i>	0,7%			<i>Phacelia tanacetifolia</i>	2,6%	<i>Phacelia tanacetifolia</i>	0,6%				
<i>Taraxacum officinale</i>	0,5%			<i>Castanea sativa</i>	1,9%	<i>Inula viscosa</i>	0,4%				
				<i>Calicotome sp</i>	1,5%	<i>Trifolium repens</i>	0,3%				
				<i>Trifolium repens</i> 20	0,9%	<i>Chrysanthemum sp</i>	0,1%				
				<i>Centaurea solstitialis</i>	0,8%						

δείγμα 7		δείγμα 8		δείγμα 9		δείγμα 10		δείγμα 11		δείγμα 12	
Taxa	% γυρεό- κοκκοί	Taxa	% γυρεό- κοκκοί	Taxa	% γυρεό- κοκκοί	Taxa	% γυρεό- κοκκοί	taxa	% γυρεό- κοκκοί	taxa	% γυρεό- κοκκοί
<i>Asteracea type</i>	24,5%	<i>Brassicaceae family</i>	67,2%	<i>Trifolium repens</i>	27,4%	<i>Erica sp.</i>	41,6%	<i>Borago spp</i>	54,8%	<i>Cistus</i>	32,6%
<i>Castanea sativa</i>	20,3%	<i>Prunus sp</i>	11,0%	<i>Cistus sp</i>	19,2%	<i>Anthyllis hermaniae</i>	21,9%	<i>Amarantha-ceae family</i>	9,4%	<i>Erica sp.</i>	23,8%
<i>Daucus carota</i>	12,1%	<i>Quercus sp</i>	4,9%	<i>Hypericum sp</i>	18,5%	<i>Hypericum sp</i>	8,7%	<i>Olea europea</i>	4,3%	<i>Allium sp</i>	14,1%
<i>Hypericum sp</i>	12,1%	<i>Hypericum sp</i>	4,9%	<i>Verbascum sp</i>	7,7%	<i>Robinia pseudoacacia</i>	5,9%	<i>Sonchus sp</i>	4,1%	<i>Salix sp</i>	4,7%
<i>Calicotome sp</i>	7,3%	Άγνωστο	4,1%	<i>Prunus sp</i>	6,5%	<i>Verbascum sp</i>	5,8%	<i>Calicotome sp</i>	4,0%	<i>Trifolium repens</i>	2,5%
<i>Salix sp</i>	6,3%	<i>Anthyllis hermaniae</i>	3,4%	<i>Asteracea (Compositae)</i>	4,1%	<i>Salix sp</i>	5,0%	<i>Cistus</i>	3,7%	<i>Hypericum sp</i>	3,4%
<i>Prunus sp</i>	4,2%	<i>Salix sp</i>	1,6%	<i>Allium sp</i>	4,0%	Άγνωστο	3,1%	<i>Verbascum sp</i>	3,0%	<i>Verbascum sp</i>	3,0%
<i>Quercus sp</i>	3,9%	<i>Begonia sp</i>	1,6%	<i>Begonia sp</i>	2,8%	<i>Olea europea</i>	1,6%	<i>Daucus carota</i>	3,0%	<i>Teucrium sp</i>	2,5%
<i>Robinia pseudoacacia</i>	2,7%	<i>Sonchus sp</i>	0,8%	<i>Brassicaceae family</i>	2,6%	<i>Prunus sp</i>	1,5%	<i>Hypericum sp</i>	2,9%	Άγνωστο	2,2%
<i>Begonia sp</i>	2,1%	<i>Robinia pseudoacacia</i>	0,3%	<i>Robinia pseudoacacia</i>	2,5%	<i>Quercus sp</i>	1,5%	Άγνωστο	2,2%	<i>Begonia sp</i>	2,0%
<i>Brassicaceae family</i>	1,0%			Άγνωστο	2,2%	<i>Phlomis sp</i>	1,1%	<i>Trifolium repens</i>	2,3%	<i>Anthyllis hermaniae</i>	1,9%
<i>Anthyllis hermaniae</i>	1,0%			<i>Hedera Helix</i>	1,0%	<i>Brassicaceae family</i>	1,1%	<i>Prunus sp</i>	1,8%	<i>Campanula sp</i>	1,4%
<i>Vitex agnus-castus</i>	0,7%			<i>Amaranthaceae family</i>	1,0%	<i>Hedera helix</i>	0,7%	<i>Castanea sativa</i>	1,7%	<i>Brassicaceae family</i>	0,9%
<i>Olea europea</i>	0,6%			<i>Anthyllis hermaniae</i>	0,5%	<i>Citrus sp</i>	0,3%	<i>Carduus pycnocephalus (Γαϊδουράγκαθο)</i>	1,6%	<i>Rubus sp</i>	0,6%
<i>Teucrium sp</i>	0,6%			<i>Acacia sp</i>	0,1%			<i>Brassicaceae family</i>	0,8%	<i>Citrus sp</i>	0,6%

<i>Trifolium repens</i>	0,3%							<i>Hedera helix</i>	0,3%	<i>Vitex agnus-castus</i>	0,6%
<i>Campanula sp</i>	0,3%							<i>Citrus sp</i>	0,2%	<i>Ballota sp</i>	0,5%
								<i>Anthyllis hermaniae</i>	0,1%	<i>Thymus capitatus</i>	0,5%
										<i>Heliotropium europeum</i>	0,5%
										<i>Pistacia sp</i>	0,5%
										<i>Olea europea</i>	0,3%
										<i>Calicotome sp</i>	0,2%
										<i>Phlomis sp</i>	0,2%
										<i>Prunus sp</i>	0,2%
										<i>Urtica sp</i>	0,2%
										<i>Paliurus sp</i>	0,2%
										<i>Sonchus sp</i>	0,2%
δείγμα 13		δείγμα 14		δείγμα 15		δείγμα 16		δείγμα 17		δείγμα 18	
taxa	% γυρεό- κοκκοί	Taxa	% γυρεό- κοκκοί	taxa	% γυρεό- κοκκοί	Taxa	% γυρεό- κοκκοί	taxa	% γυρεό- κοκκοί	taxa	% γυρεό- κοκκοί
<i>Cistus spp</i>	78,5%	<i>Hypericum spp</i>	23,5%	<i>Echium sp</i>	34,5%	<i>Borago spp</i>	16,2%	<i>Brassicaceae family</i>	20,3%	<i>Castanea sativa</i> (Καστανιά)	99,8%
<i>Allium spp</i>	13,5%	<i>Cistus spp</i>	23,3%	<i>Vitex agnus-castus</i>	28,0%	<i>Prunus spp</i>	14,1%	<i>Verbascum sp</i>	14,5%	Άγνωστο	0,1%
<i>Anthyllis hermaniae</i>	2,3%	<i>Verbascum sp</i>	16,6%	<i>Teucrium sp</i>	10,6%	<i>Trifolium repens</i>	14,1%	<i>Teucrium sp</i>	14,3%	<i>Apiaceae sp</i>	0,1%
<i>Trifolium repens 20</i>	2,1%	<i>Castanea sativa</i>	13,7%	<i>Salix sp</i>	8,2%	Άγνωστο	7,8%	<i>Castanea sativa</i>	14,1%		
<i>Erica sp.</i>	1,2%	<i>Robinia Pseudoacacia</i>	6,6%	<i>Hypericum sp</i>	4,6%	<i>Salix sp</i>	7,4%	<i>Salix sp</i>	10,4%		
<i>Verbascum undulatum</i>	0,9%	<i>Allium sp</i>	5,5%	<i>Allium sp</i>	3,5%	<i>Inula viscoza</i>	5,5%	<i>Vitex agnus-castus</i>	6,0%		
Άγνωστο	0,6%	<i>Salix sp</i>	4,8%	<i>Anthyllis montana</i>	2,2%	<i>Verbascum sp</i>	5,9%	<i>Ballota sp</i>	5,6%		

<i>Taraxacum officinale</i>	0,6%	<i>Begonia sp</i>	2,9%	<i>Verbascum sp</i>	2,0%	<i>Brassicaceae family</i>	5,0%	<i>Tribulus terrestris</i>	4,8%		
<i>Fagonia cretica</i>	0,3%	Άγνωστα	1,4%	Άγνωστο	1,7%	<i>Vicia sp</i>	2,0%	<i>Pyrus sp</i>	3,7%		
		<i>Myrtus sp</i>	1,2%	<i>Asteracea (Compositae)</i>	1,5%	<i>Fagonia cretica</i>	4,9%	<i>Apiaceae sp</i>	3,7%		
		<i>Sonchus sp</i>	0,2%	<i>Cistus sp</i>	1,2%	<i>Amaranthaceae family</i>	4,8%	Άγνωστο	2,5%		
		<i>Phacelia tanacetifolia (Φακελωτή)</i>	0,2%	<i>Brassicaceae family</i>	1,0%	<i>Hypericum sp</i>	3,6%	<i>Olea europea</i>	0,1%		
		<i>Brassicaceae family</i>	0,1%	<i>Olea europea</i>	0,8%	<i>Hedera helix</i>	3,0%		100,0%		
						<i>Castanea sativa</i>	2,1%				
						<i>Cistus sp</i>	1,5%				
						<i>Erica sp.</i>	1,4%				
						<i>Sonchus sp</i>	0,5%				
						<i>Robinia pseudoacacia</i>	0,3%				

ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ

Για πρώτη φορά μελετήθηκε με τη χρήση *in vitro* τεχνικών η αντιβακτηριακή και αντιοξειδωτική δράση του ελληνικού ΜΨ (Πίνακας 5 και 6).

Πίνακας 5. Τιμές MIC και MBC εκφρασμένες σε mg/ml

Δείγμα	<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. enterica sub.</i> Typhimurium		<i>K. pneumoniae</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
1	22.6	45.2	45.2	45.2	90.4	>90.4	90.4	>90.4
2	22.6	45.2	22.6	22.6	22.6	45.2	11.3	22.6
3	48	48	24	24	12	24	24	24
4	9.9	19.8	19.8	19.8	9.9	9.9	9.9	9.9
5	23.5	23.5	23.5	23.5	23.5	23.5	23.5	23.5
6	45.6	45.6	45.6	45.6	45.6	91.2	45.6	>91.2
7	10.4	20.8	41.6	41.6	20.8	20.8	20.8	41.6
8	21.9	21.9	43.8	43.8	21.9	21.9	43.8	43.8
9	4.4	4.4	17.6	35.2	8.8	8.8	17.6	17.6
10	9.4	9.4	18.8	18.8	9.4	9.4	37.6	75.2
11	10.2	10.2	40.8	40.8	40.8	40.8	40.8	40.8
12	5	5	40	40	10	10	40	40
13	4.1	4.1	65.6	65.6	16.4	16.4	32.8	32.8
14	3.9	3.9	15.6	15.6	7.8	7.8	15.6	15.6
15	5.2	5.2	20.8	20.8	20.8	41.6	20.8	20.8
16	11.3	11.3	22.6	22.6	45.2	90.4	45.2	>90.4
17	23.3	23.3	46.6	46.6	46.6	93.2	46.6	>93.2
18	11	11	22	44	22	88	44	>88

MIC: ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση, MBC: ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση. Οι τιμές είναι εκφρασμένες σε ξηρό βάρος δείγματος.

Δεκαοκτώ δείγματα ΜΨ δοκιμάστηκαν έναντι ενός παθογόνου των τροφίμων όπως η *S. Typhimurium*, έναντι δύο σημαντικών νοσοκομειακών παθογόνων (*P. aeruginosa* και *K. pneumoniae*) και κατά του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *S. aureus*, ο οποίος εκτός από αιτία σοβαρών λοιμώξεων, θεωρείται επίσης μικροβιολογικός δείκτης υγιεινής κατά την επεξεργασία τροφίμων, σύμφωνα με τη νομοθεσία της ΕΕ (Κανονισμός της Επιτροπής ΕΚ 2073/2005). Ο *S. aureus* σε αυξημένους πληθυσμούς παράγει ανθεκτική στη θερμότητα εντεροτοξίνη που συχνά εμπλέκεται σε τροφικές δηλητηριάσεις [38,39]. Επιπλέον, η *P. aeruginosa* αποτελεί δείκτη ασφάλειας στην αξιολόγηση κινδύνου του πόσιμου νερού, καθώς και των καλλυντικών και των βρώσιμων φαρμακευτικών προϊόντων [40].

Όλα τα δείγματα ΜΨ έδειξαν βακτηριοστατική δράση έναντι όλων των παθογόνων βακτηρίων που δοκιμάστηκαν (Πίνακας 5). Στα περισσότερες περιπτώσεις, οι τιμές MIC και MBC ήταν πανομοιότυπες, υποδεικνύοντας ότι το ΜΨ ασκεί κυρίως βακτηριοκτόνο δράση έναντι των παθογόνων. Συγκεκριμένα, όλα τα δείγματα ασκούν βακτηριοκτόνο δράση, εκτός από το δείγμα 1 έναντι της *S. Typhimurium* και των δειγμάτων 1, 6, 16, 17, 18 κατά της *Klebsiella pneumoniae* (Πίνακας 5). Η αντιμικροβιακή δράση του ΜΨ εξαρτάται από τη συγκέντρωση και εμφανίζει διακυμάνσεις ανάλογα με το δείγμα. Γενικά, ο *S. aureus* ήταν το πιο ευαίσθητο παθογόνο. Ωστόσο, υπήρχαν δείγματα, όπως το δείγμα 3, που έδειξαν υψηλότερη δράση έναντι άλλων παθογόνων ή επέδειξαν την ίδια αντιβακτηριακή δράση ανεξάρτητα από το παθογόνο, όπως στην περίπτωση του δείγματος 5.

Οι τιμές MIC και MBC είναι ίδιες σε 14 από τα 18 δείγματα που δοκιμάστηκαν έναντι του *S. aureus*, σε 16 από τα 18 που δοκιμάστηκαν έναντι της *P. aeruginosa*, σε 10 από τα 18 που δοκιμάστηκαν έναντι του *S. Typhimurium* και σε 10 από τα 18 που δοκιμάστηκαν έναντι της *K. pneumoniae*. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η αντιβακτηριακή δράση του ΜΨ οφείλεται πιθανώς σε ενώσεις που προκαλούν μη αναστρέψιμη βλάβη στα βακτηριακά κύτταρα. Ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλειστεί η ύπαρξη και βακτηριοστατικών ουσιών.

Έντεκα από τα 18 δείγματα εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές MIC έναντι του *S. aureus* σε σύγκριση με τα *Gram*- βακτήρια. Αυτό συμφωνεί με δεδομένα από προηγούμενες μελέτες [2,5], οι οποίες υποδηλώνουν επίσης ότι το ΜΨ παρουσιάζει υψηλότερη αντιβακτηριακή δράση έναντι των *Gram*+ βακτηρίων σε σύγκριση με τα *Gram*-. Σύμφωνα με αυτή την παρατήρηση, η χαμηλότερη τιμή MIC καταγράφηκε έναντι του *S. aureus* (δείγμα 14). Από όλα τα δείγματα, το δείγμα 14 δείχνει τις χαμηλότερες τιμές MIC και MBC έναντι του *S. aureus* (3,9 mg/ml), της *P. aeruginosa* (15,6 mg/ml) και της *S. Typhimurium* (7,8 mg/ml). Το δείγμα 4 δείχνει τις χαμηλότερες τιμές MIC και MBC (9,9 mg/ml) έναντι της *K. pneumoniae* σε σύγκριση με τα άλλα δείγματα.

Είναι ενδιαφέρον ότι υπάρχουν δείγματα που εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές MIC έναντι των *Gram*- βακτηρίων σε σύγκριση με τα *Gram*+. Το δείγμα 3 δείχνει υψηλότερες τιμές MIC και MBC έναντι του *S. aureus* (48 mg/ml και στις δύο περιπτώσεις) σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές έναντι άλλων βακτηρίων (24 mg/ml έναντι της *P. aeruginosa*, 12 mg/ml και 24 mg/ml αντίστοιχα έναντι της *S. Typhimurium* και της *K. pneumoniae*). Το δείγμα 5 δείχνει πανομοιότυπες τιμές MIC και MBC έναντι όλων των παθογόνων (23,5 mg/ml).

Είναι σαφές ότι η αντιμικροβιακή δράση εξαρτάται από το δείγμα (βοτανική και γεωγραφική προέλευση) και τα συστατικά του, καθώς και από το ελεγχόμενο παθογόνο.

Η αντιμικροβιακή δράση του ΜΨ αποδίδεται γενικά σε διάφορα φυτοχημικά, κυρίως σε πολυφαινόλες, λιπαρά οξέα και φυτοστερόλες [1]. Οι Pelka et al. [5] δεν ανέφεραν καμία συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες και της μικροβιακής δράσης του πολωνικού ΜΨ. Ομοίως, η παρούσα μελέτη δεν αναφέρει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ αντιβακτηριακής και αντιοξειδωτικής δράσης ή της συνολικής περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες ή φλαβονοειδή (Πίνακας 6). Ωστόσο, είναι εύλογο ότι συγκεκριμένα φυτοχημικά συμβάλλουν στη βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνο δράση που ασκεί το ΜΨ. Στο ΜΨ μπορεί να περιλαμβάνονται και μικροβιακοί μεταβολίτες με αντιμικροβιακή δράση όπως οργανικά οξέα, λιπαρά οξέα, ή πολυσακχαρίτες κ.α. .

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ

Ο Πίνακας 6 δείχνει τις τιμές IC₅₀ των αναλύσεων που αφορούν την εξουδετέρωση ριζών DPPH και ABTS•+ που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης διαφορετικών τύπων ΜΨ.

Όσον αφορά τη δοκιμασία DPPH, οι τιμές IC₅₀ κυμαίνονταν από 0,18 (δείγμα 18) έως 1,8 mg/ml (δείγμα 2). Εκτός από το δείγμα 18, παρατηρήθηκε ισχυρή ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών DPPH για τα δείγματα ΜΨ 9, 6, 7 και 3. Επιπλέον, τα δείγματα ΜΨ 4, 11, 16 και 17 έχουν δείξει παρόμοια ικανότητα εξουδετέρωσης ριζών DPPH. Αντίθετα, σχετικά ασθενής δραστηριότητα εξουδετέρωσης των ριζών DPPH παρατηρήθηκε για τα δείγματα 1, 2 και 5.

Στη δοκιμασία ABTS•+, οι τιμές IC₅₀ κυμαίνονταν από 0,38 (δείγμα 18) έως 1,80 mg/ml (δείγμα 2). Εκτός από το δείγμα 18, ισχυρή δραστηριότητα δέσμευσης ριζών ABTS•+ παρουσίασαν επίσης τα δείγματα 9, 6, 10 και 11. Αντίθετα, ασθενή δραστηριότητα εξουδετέρωσης ριζών ABTS•+ παρουσίασαν τα δείγματα 2, 5 και 13.

Η συνολική περιεκτικότητα σε πολυφαινόλικά (TPC) των δειγμάτων ΜΨ, όπως μετρήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, κυμαινόταν από 6,49 (δείγμα 12) έως 14,64 (δείγμα 18) mg (GAEs)/g δείγματος. Τα δείγματα ΜΨ 3, 7, 11 και 17 παρουσίασαν επίσης υψηλή ολική περιεκτικότητα σε πολυφαινόλικά (Πίνακας 6).

Οι τιμές που αφορούν την ολική περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή TFC των δειγμάτων που δοκιμάστηκαν, όπως μετρήθηκε με τη χρωματομετρική μέθοδο χλωριούχου αλουμινίου, κυμάνθηκε από 2,56 (δείγμα 10) έως 5,49 (δείγμα 3) mg (QE)/g δείγματος.

Πίνακας 6. Τιμές δοκιμών TPC, TFC, DPPH και ABTS^{•+} για τα δείγματα του ΜΨ

Δείγμα	TPC ^a	TFC ^b	DPPH ^c	ABTS ^{•+} d
1	9.56±0.02.	3.88±0.12	1.25±0,04	0.51±0.01
2	7.78±0.13	3.78±0.04	1.8±0.07	1.80±0.12
3	11.88±0.06	5.49±0.02	0.47±0.03	0.55±0.02
4	8.34±0.13	5.02±0.20	0.53±0.03	0.53±0.03
5	7.10±0.08	3.61±0.21	1.05±0.09	1.50±0.07
6	9.02±0.08	4.60±0,00	0.45±0.03	0.50±0.01
7	14.26±0.31	4.82±0.07	0.46±0.08	0.60±0.04
8	10.69±0.08	4.62±0.02	0.70±0.09	0.80±0.03
9	8.66±0.26	3.63±0.09	0.41±0.04	0.45±0.02
10	10.17±0.01	2.56±0.05	0.61±0.02	0.50±0.05
11	13.40±0.43	5.27±0.00	0.57±0.05	0.51±0.01
12	6.49±0.04	3.54±0.02	0.75±0.05	0.81±0.04
13	6.63±0.05	3.31±0.08	0.70±0.05	1.02±0.10
14	11.56±0.03	4.75±0.15	0.61±0.08	0.62±0.04
15	8.30±0.13	2.34±0.22	0.72±0.03	0.72±0.03
16	9.87±0.07	3.18±0.05	0.57±0.05	0.63±0.06
17	11.90±0.03	3.92±0.28	0.56±0.09	0.62±0.04
18	14.64±0.26	4.18±0.03	0.18±0.02	0.38±0.05

^a TPC: τιμές εκφρασμένες σε mg γαλλικού οξέως/g δείγματος.

^b TFC: τιμές εκφρασμένες σε mg κερκετίνης/g δείγματος.

^c Τιμές IC₅₀ (mg/ml) των δειγμάτων του ΜΨ όσον αφορά τη δοκιμή DPPH.

^d Τιμές IC₅₀ (mg/ml) των δειγμάτων του ΜΨ όσον αφορά τη δοκιμή ABTS^{•+}.

Όλες οι τιμές είναι μέσοι όροι τριών διαφορετικών δοκιμών και αναφέρεται η τυπική απόκλιση τους (± standard deviation (SD)). Οι τιμές είναι εκφρασμένες σε βάρος νωπού δείγματος χωρίς αποξήρανση.

Συνολικά, το ΜΨ έχει επιδείξει υψηλή αντιοξειδωτική δράση σε προηγούμενες μελέτες [2,3,4,41,42]. Τα δεδομένα μας έδειξαν ότι και τα δείγματα του ελληνικού ΜΨ ασκούν σημαντική αντιοξειδωτική δράση.

Το δείγμα 18, ένα μονοανθικό δείγμα ΜΨ καστανιάς (99,8% *Castanea sativa* από το Άγιο Όρος), εμφάνισε την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση μεταξύ όλων των δειγμάτων. Αυτή είναι η πρώτη φορά που αξιολογήθηκε ένα μονοανθικό δείγμα ΜΨ καστανιάς ως προς τις βιολογικές του ιδιότητες. Στις δοκιμές DPPH και ABTS^{•+}, οι τιμές IC₅₀ του δείγματος 18 ήταν 0,18 mg/ml και 0,38 mg/ml, αντίστοιχα. Αυτές οι τιμές το κατατάσσουν μεταξύ των πιο ισχυρών αντιοξειδωτικών τροφών [43]. Αυτό πιθανώς συνδέεται με την υψηλή περιεκτικότητα της γύρης που προέρχεται από την καστανιά σε φαινόλες, φλαβονοειδή και κυνourενικό οξύ, τα οποία ασκούν υψηλή αντιοξειδωτική δράση [44,45].

Επιπλέον, 16 από τα 18 δείγματα έδειξαν τιμές IC_{50} μικρότερες από 1 mg/ml όσον αφορά τη δοκιμή DPPH ή/και τη δοκιμή ABTS•+. Τα δείγματα 2 και 5 έδειξαν τιμές κοντά ή ελαφρώς πάνω από 1 mg/ml και στις δύο δοκιμές. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το ελληνικό ΜΨ θα μπορούσε να περιληφθεί στα λειτουργικά τρόφιμα που παρουσιάζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση.

Είναι άγνωστο σε ποιο βαθμό οι συνθήκες αποθήκευσης του ΜΨ καθώς και η ωριμότητα του κατά το χρόνο συλλογής του επηρεάζουν τις βιολογικές του ιδιότητες. Τα δείγματα 2 και 5 είναι αυτά που έδειξαν τη χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση μεταξύ των 18 δειγμάτων. Αυτά τα δύο δείγματα αποθηκεύτηκαν και συλλέχθηκαν με διαφορετικό τρόπο από τα άλλα δείγματα. Συγκεκριμένα όσον αφορά το δείγμα 2 η πλαισιοκηρήθρα που το περιείχε αποθηκεύτηκε για έξι μήνες πριν την εξαγωγή του, σε θερμοκρασία δωματίου εντός άδειας κυψέλης. Σε αντίθεση με τα άλλα δείγματα, τα οποία συλλέχθηκαν από πλαισιοκηρήθρες γεμάτες με ΜΨ κατά το τέλος της άνοιξης ώστε να έχουν ωριμάσει κατά το δυνατό, το δείγμα 5 συλλέχθηκε μόλις 11 ημέρες μετά την εισαγωγή μιας άδειας πλαισιοκηρήθρας στην κυψέλη, πιθανώς πολύ πριν την ωρίμανση του.

Η αντιοξειδωτική δράση του ελληνικού ΜΨ συσχετίζεται στατιστικά με τη συνολική περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες (Πίνακας 7). Το δείγμα 18, το οποίο παρουσίασε την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση στις δοκιμές μας, παρουσίασε και την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες ταυτόχρονα (Πίνακας 6).

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση στατιστικής συσχέτισης μεταξύ των τιμών των δοκιμών TPC, TFC, DPPH και ABTS •+. Η ανάλυση έδειξε σημαντική ισχυρή συσχέτιση ($r=0,719$, $P<0,01$) μεταξύ των τιμών που αφορούν την εξουδετέρωση ριζών DPPH και ABTS •+ (Πίνακας 7). Επιπλέον, η ανάλυση αποκάλυψε ότι υπήρχε μια σημαντική στατιστικά μέτρια συσχέτιση ($r=0,583$, $P<0,05$) μεταξύ των τιμών TPC και TFC και μια σημαντική μέτρια ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ των τιμών TPC και των τιμών IC_{50} των δοκιμών DPPH ή ABTS •+ ($r=-0,586$ και $r=-0,512$ αντίστοιχα με $P<0,05$). Παρόλο που δεν αποκαλύφθηκε συνολικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των τιμών TFC και των τιμών IC_{50} που προέκυψαν από τις δοκιμασίες εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών, όταν εξετάστηκαν οι τιμές TFC και DPPH ή ABTS •+ κάθε δείγματος ΜΨ ξεχωριστά, παρατηρήθηκε ότι ορισμένοι τύποι ΜΨ (π.χ., 3, 4 και 11) με υψηλό TFC επέδειξαν επίσης υψηλή αντιοξειδωτική δράση.

Πίνακας 7. Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης (r) υπολογίστηκαν από την ανάλυση συσχέτισης μεταξύ των τιμών των TPC, TFC, DPPH και ABTS•+ των δειγμάτων του ΜΨ

	TPC	TFC	DPPH	ABTS•+
TPC		0,583*	-0,586*	-0,512*
TFC			-0,444	-0,249
DPPH				0,719**

*Η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική με τιμές $P<0,05$

** Η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική με τιμές $P<0,01$

Πραγματοποιήθηκε επίσης στατιστική ανάλυση προκειμένου να αξιολογηθεί η συσχέτιση μεταξύ των τιμών TPC, TFC, DPPH και ABTS•+ με τις τιμές MIC και MBC έναντι των 4 παθογόνων. Η ανάλυση δεν αποκάλυψε σημαντική συσχέτιση συνολικά μεταξύ των προαναφερόμενων τιμών σε όλα τα δείγματα και τους ελεγμένους μικροοργανισμούς, αν και εμφανίστηκε ασθενής θετική συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες ή φλαβονοειδή και των τιμών MIC και MBC για τον *S.aureus* και τη *P.aeruginosa* (Πίνακας 8).

Πίνακας 8. Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης (r) υπολογίστηκαν από την ανάλυση συσχέτισης μεταξύ των τιμών των TPC, TFC, DPPH and ABTS^{•+} και των τιμών MIC και MBC έναντι των τεσσάρων παθογόνων

	<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. Typhymurium</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
TPC	0,211	0,149	0,196	0,348	0,180	-0,011	0,325	0,203
TFC	0,291	0,363	0,255	0,240	0,001	0,081	-0,112	0,084
DPPH	-0,033	0,013	0,057	-0,279	0,000	0,192	-0,224	0,049
ABTS ^{•+}	0,009	0,008	0,122	-0,249	0,156	0,229	-0,179	0,175

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση στατιστικής συσχέτισης προκειμένου να αξιολογηθεί η συσχέτιση μεταξύ των τιμών TPC, TFC, DPPH, ABTS^{•+}, MIC και MBC και των κύριων οικογενειών γύρης που υπάρχουν σε κάθε δείγμα ΜΨ (Πίνακας 9). Συμπεριλήφθηκαν μόνο οι κυρίαρχες (με ποσοστό >10%) οικογένειες γύρης. Επιπλέον, οικογένειες γύρης που ήταν παρούσες σε λιγότερα από 3 δείγματα αποκλείστηκαν από περαιτέρω ανάλυση.

Η ανάλυση συσχέτισης αποκάλυψε μια σημαντική ισχυρή συσχέτιση ($r=1,0$ και $P<0,01$) μεταξύ της συνολικής περιεκτικότητας σε φαινολικά TPC και της γύρης από την οικογένεια Fagaceae (καστανιές, βελανιδιές κ.α.). Όσον αφορά τις τιμές TFC δεν παρατηρήθηκε σημαντική θετική συσχέτιση, αν και αποκαλύφθηκε σημαντική αρνητική συσχέτιση ($r=-1,0$ και $P<0,01$) μεταξύ των τιμών TFC και της περιεκτικότητας σε γύρη από Ericaceae (ερεικοειδή). Όσον αφορά την ικανότητα εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών, αποκαλύφθηκε ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας σε γύρη από Ericaceae και Fagaceae και των τιμών DPPH ($r=-1,0$ και $P<0,01$) καθώς και μεταξύ της περιεκτικότητας σε γύρη Rosaceae (αμυγδαλιές, μηλιές, ροδακινιές, φράουλες κ.α.) και των τιμών ABTS^{•+} ($r=-1,0$ και $P<0,01$).

Όσον αφορά την αντιμικροβιακή δράση των δειγμάτων ΜΨ, παρατηρήθηκε σημαντική αρνητική ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των τιμών MIC και MBC έναντι του *S. aureus* και της περιεκτικότητας σε γύρη Brassicaceae (βρούβες, σινάπι, ελαιοκράμβη κ.α.) ($r=-0,90$ και $P=0,01$). Η περιεκτικότητα σε γύρη Ericaceae συσχετίστηκε επίσης σημαντικά αρνητικά ($r=-1,0$ και $P<0,01$) με τις τιμές MIC και MBC έναντι της *P. aeruginosa*. Επιπλέον η περιεκτικότητα σε γύρη από Fabaceae (ψυχανθή, φασόλια, τριφύλι, μηδική κ.α.) συσχετίζεται ισχυρά αρνητικά ($r=-0,893$ και $P<0,01$) με τις τιμές MIC έναντι της *P. aeruginosa*. Τέλος, σημαντική ισχυρή αρνητική συσχέτιση ($r=-0,857$, $P<0,05$) παρατηρήθηκε μεταξύ της περιεκτικότητας σε γύρη Fabaceae και των τιμών MIC έναντι της *S. Typhymurium*. (Πίνακας 9).



Φωτογραφία 6. *Erica arborea* Credit: Jean-Pol GRANDMONT Πηγή: Wikimedia Commons

Πίνακας 9. Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης (r) υπολογίστηκαν από την ανάλυση συσχέτισης μεταξύ των τιμών των TPC, TFC, της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας (τιμές IC₅₀ DPPH και ABTS•+) και της αντιμικροβιακής δραστηριότητας (τιμές MIC και MBC) σε σχέση με τις κυρίαρχες οικογένειες των γυρεόκοκκων για το σύνολο των δειγμάτων

Pollen Family	TPC	TFC	DPPH	ABTS	<i>S aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. Typhimurium</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
					MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Boraginaceae</i>	0.500	0.500	0.000	-0.500	-0.500	-0.500	0.500	0.500	-0.500	-	-0.500	-
<i>Brassicaceae</i>	-0.300	-0.200	0.800	0.500	-0.900*	-0.900*	-0.100	-0.100	-0.100	-0.500	-0.100	0.500
<i>Cistaceae</i>	-0.600	-0.800	0.800	1.000**	0.000	0.000	0.800	0.800	0.800	0.800	0.600	0.600
<i>Ericaceae</i>	0.500	-1.000**	-1.000**	-0.500	-0.500	-0.500	-1.000**	-1.000**	-	-	-	-
<i>Fabaceae</i>	-0.071	-0.321	0.000	-0.450	-0.536	-0.607	-0.893**	-0.536	-0.857*	-0.679	-0.393	-0.300
<i>Fagaceae</i>	1.000**	0.000	-1.000**	-0.949	0.400	0.200	0.200	0.400	0.400	0.400	0.400	-
<i>Guttiferae</i>	-0.300	-0.100	0.500	0.300	-0.200	-0.200	-0.300	-0.400	-0.300	-0.100	-0.100	-0.800
<i>Rosaceae</i>	-0.800	0.000	0.200	-1.000**	0.200	0.400	0.200	0.200	-0.500	-0.500	-0.500	-

*Ο συντελεστής συσχέτισης είναι στατιστικά σημαντικός με τιμή P<0.05

** Ο συντελεστής συσχέτισης είναι στατιστικά σημαντικός με τιμή P<0.01

Η παλυνολογική ανάλυση (Πίνακας 4) αποκάλυψε μια σύνθετη βοτανική προέλευση των δειγμάτων ΜΨ που δοκιμάστηκαν σε αυτή τη μελέτη. Η βοτανική προέλευση των δειγμάτων συσχετίστηκε στατιστικά με την ασκούμενη βιοδραστικότητα για πρώτη φορά (Πίνακας 9). Αποκαλύφθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας σε γύρη Ericaceae και Fagaceae και των τιμών DPPH, καθώς και μεταξύ της περιεκτικότητας σε γύρη Rosaceae και των τιμών ABTS.

Παρατηρήθηκε ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των τιμών MIC και MBC έναντι του *S. aureus* με την περιεκτικότητα σε γύρη από την οικογένεια Brassicaceae (-0,9). Η Ελλάδα φιλοξενεί περισσότερα από 350 είδη από την οικογένεια Brassicaceae. Αυτή η οικογένεια, γνωστή και ως οικογένεια της μουστάρδας, περιλαμβάνει φυτά που χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή ιατρική όπως π.χ η *Capsella bursa pastoris* [46], τα *Sinapis nigra* και *Sinapis alba* [47], μαζί με πιο κοινές αλλά υγιεινές τροφές όπως το λάχανο, το μπρόκολο και το κουνουπίδι. Brassicaceae και *Sinapis* spp. περιέχουν ουσίες που ασκούν αντικαρκινική και αντιμικροβιακή δράση [48-50]. Περιέχουν επίσης πολυφαινόλες, φλαβονοειδή, σαπωνίνες και τριτερπένια [51].

Η περιεκτικότητα σε γύρη Ericaceae συσχετίστηκε σημαντικά με τις τιμές MIC και MBC έναντι της *P. aeruginosa*. Στην Ελλάδα οι μέλισσες συλλέγουν νέκταρ και γύρη από είδη της οικογένειας αυτής και συγκεκριμένα από την *Erica arborea* (ανοιξιάτικο ρείκι), την *Erica manipuliflora* (φθινοπωρινό ρείκι) και την *Arbutus unedo* (κουμαριά). Η γύρη αυτών των φυτών περιέχει τανίνες, αλκαλοειδή, αρβουτίνη, καροτίνες, φλαβονοειδή, οργανικά οξέα και σαπωνίνες [52].

Η περιεκτικότητα σε γύρη Fabaceae συσχετίζεται αποκλειστικά με τις τιμές MIC έναντι της *P. aeruginosa*. Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας σε γύρη Fabaceae και των τιμών MIC ενάντια στην *S. Typhimurium*. Η οικογένεια Fabaceae περιλαμβάνει πολλά κτηνοτροφικά φυτά που επισκέπτονται οι μέλισσες όπως το *Spartium junceum*, *Robinia pseudacacia*, *Glycyrrhiza glabra* και *Ceratonia siliqua*.

Η αναγνωρισμένη βοτανική ποικιλομορφία του ελληνικού ΜΨ μπορεί επίσης να εξηγήσει τη διαφορετική αντιμικροβιακή δράση έναντι συγκεκριμένων παθογόνων που ασκείται από ορισμένα δείγματα.

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ

Η αντιμικροβιακή δράση του ΜΨ και της ΓΜ κατά κανόνα αποδίδεται κυρίως σε δευτερογενείς μεταβολίτες φυτικής προέλευσης όπως οι πολυφαινόλες και ειδικότερα τα φλαβονοειδή [1]. Δεν μπορεί όμως να αποκλειστεί η πιθανότητα, η αντιμικροβιακή δράση να οφείλεται και σε άλλες κατηγορίες ουσιών.

Στα πλαίσια αυτά διερευνήσαμε την αντιβακτηριακή δράση των πρωτεϊνικών κλασμάτων των δειγμάτων ΜΨ έναντι του *S. aureus*. Στον πίνακα 10 εμφανίζονται οι τιμές της ζώνης αναστολής όσον αφορά το πρωτεϊνικό κλάσμα κάθε δείγματος και το πρωτεϊνικό κλάσμα μετά από επεξεργασία με πρωτεϊνάση-K. Επίσης εμφανίζονται και οι τιμές της ζώνης αναστολής του υπερκειμένου μετά την καθίζηση των πρωτεϊνών για κάθε δείγμα.

Όσον αφορά τα δείγματα 2, 4, 5, 12, 13, 16 και 17 δεν ανιχνεύθηκε αντιβακτηριακή δράση. Τα συγκεκριμένα ευρήματα μπορεί να σχετίζονται είτε με την ευαισθησία της μεθόδου που χρησιμοποιήσαμε είτε με καταστροφή των αντιβακτηριακών ουσιών λόγω της επεξεργασίας των δειγμάτων.

Τα πρωτεϊνικά κλάσματα των δειγμάτων 1, 3, 9, 10 και 18 εμφανίζουν αντιβακτηριακή δράση η οποία χάνεται μετά από επεξεργασία τους με πρωτεϊνάση-K ενώ και στο υπερκείμενο δεν ανιχνεύεται αυτή η δράση. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα δείχνουν ότι και ουσίες πρωτεϊνικής προέλευσης συμβάλλουν στην αντιβακτηριακή δράση του ΜΨ.

Τα δείγματα 6, 7 και 11 εμφανίζουν την ίδια αντιβακτηριακή δράση (9 mm, 11 mm και 11mm αντίστοιχα) στο πρωτεϊνικό τους κλάσμα πριν και μετά την επεξεργασία με πρωτεϊνάση-K. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι στο πρωτεϊνικό κλάσμα υπάρχουν και ουσίες μη πρωτεϊνικές, πιθανά ενωμένες με πρωτεϊνικά τμήματα και σε αυτές οφείλεται στα συγκεκριμένα δείγματα η βιοδραστητικότητα που ανιχνεύουμε. Επιπλέον το δείγμα 11 εμφανίζει μειωμένη αντιβακτηριακή δράση και στο υπερκείμενο (7mm). Το συγκεκριμένο εύρημα μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αντιμικροβιακή δράση του υπερκειμένου, σε αυτό το δείγμα ΜΨ, οφείλεται είτε σε ουσίες μη πρωτεϊνικής φύσεως είτε σε ουσίες πρωτεϊνικής φύσεως που δεν κατακρημνίστηκαν.

Από αυτά τα αρχικά αποτελέσματα διαπιστώνουμε ότι η φύση των αντιβακτηριακών παράγοντων διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων του ΜΨ και φαίνεται ότι η αντιβακτηριακή δράση των δειγμάτων οφείλεται και σε πρωτεϊνικής φύσης ουσίες. Σε πρόσφατη μελέτη οι Pelka et al μετά από αλληλούχηση του γονιδιώματος δύο στελεχών βακίλων που απομονώθηκαν από ΜΨ, διαπίστωσαν ότι τα συγκεκριμένα στελέχη δυνητικά μπορούν να παράγουν αντιμικροβιακές ουσίες, μεταξύ αυτών και βακτηριοσίνες [53]. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας υποστηρίζουν τα ευρήματά μας για την ύπαρξη αντιμικροβιακών ουσιών πρωτεϊνικής φύσης στο ΜΨ. Εύλογα, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την απομόνωση, ταυτοποίηση και διερεύνηση της βιοδραστητικότητας των πρωτεϊνικής φύσεως αντιμικροβιακών παραγόντων του ΜΨ.

Πίνακας 10. Δοκιμές διάχυσης σε άγαρ έναντι του *S. aureus*. Χρησιμοποιήθηκαν πρωτεϊνικά κλάσματα δειγμάτων ΜΨ και πρωτεϊνικά κλάσματα επεξεργασμένα με πρωτεϊνάση-K. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και το υπερκείμενο μετά την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών

Δείγμα	Διάμετρος ζώνης αναστολής σε mm του πρωτεϊνικού κλάσματος	Διάμετρος ζώνης αναστολής σε mm του πρωτεϊνικού κλάσματος επεξεργασμένο με πρωτεϊνάση-K	Διάμετρος ζώνης αναστολής σε mm του υπερκειμένου
1	10	ΔΑ	ΔΑ
2	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ
3	13	ΔΑ	ΔΑ
4	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ
5	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ
6	9	9	ΔΑ
7	11	11	ΔΑ
8	10	10	ΔΑ
9	11	ΔΑ	ΔΑ
10	11	ΔΑ	ΔΑ
11	11	11	7
12	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ
13	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ
14	12	ΔΑ	ΔΑ
15	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ
16	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ
17	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ
18	10	ΔΑ	ΔΑ

Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας με νερό και πρωτεϊνάση-K για τον οποίο δεν ανιχνεύθηκε ζώνη αναστολής. ΔΑ: δεν ανιχνεύθηκε.

ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΚΡΙΖΩΣΗ ΒΙΟΪΜΕΝΩΝ

Για πρώτη φορά διερευνάται η ικανότητα του ΜΨ να αναστέλλει τη δημιουργία και να εκριζώνει βιοϋμένους. Στον πίνακα 11, αναφέρεται το ποσοστό αναστολής σχηματισμού βιοϋμένα σε καλλιέργειες *S. aureus* ανά δείγμα ΜΨ. Η αναστολή υπολογίστηκε σε συγκεντρώσεις ίσες με το μισό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) και το ένα τέταρτο της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) των δειγμάτων. Σε όλες τις περιπτώσεις τα μεγαλύτερα ποσοστά αναστολής απαντώνται στις συγκεντρώσεις των δειγμάτων που είναι ίσες με το μισό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) του δείγματος. Μεγαλύτερη αναστολή δημιουργίας βιοϋμένα εμφανίζει το δείγμα 15 με ποσοστό αναστολής 90,8% σε συγκέντρωση δείγματος 0,195 w/v.

Πίνακας 11. Ποσοστό αναστολής σχηματισμού βιοϋμένα σε καλλιέργειες *Staphylococcus aureus* ανά δείγμα ΜΨ. Η αναστολή υπολογίστηκε σε συγκεντρώσεις ίσες με το μισό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) και το ένα τέταρτο της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) των δειγμάτων

ΔΕΙΓΜΑ	MIC w/v	[MIC X 0,5] w/v	ΠΟΣΟΣΤΟ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ (MIC X 0,5)	[MIC X 0,25] w/v	ΠΟΣΟΣΤΟ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ (MIC X 0,25)
4	0,39%	0,195%	50,10 ± 0	0,0975%	18,70 ± 11,08
8	0,39%	0,195%	66,70 ± 9,81	0,0975%	-
9	0,78%	0,39%	79,30 ± 1,16	0,195%	76,90 ± 2,83
10	0,78%	0,39%	69,70 ± 7,9	0,195%	53,60 ± 4,09
11	1,56%	0,78%	56,50 ± 1,31	0,39%	50,70 ± 4,47
12	3,13%	1,56%	81,20 ± 6,65	0,78%	79,20 ± 1,37
15	0,39%	0,195%	90,80 ± 2,28	0,0975%	31,20 ± 1,15
18	0,39%	0,195%	43,40 ± 0	0,0975%	34,80 ± 0

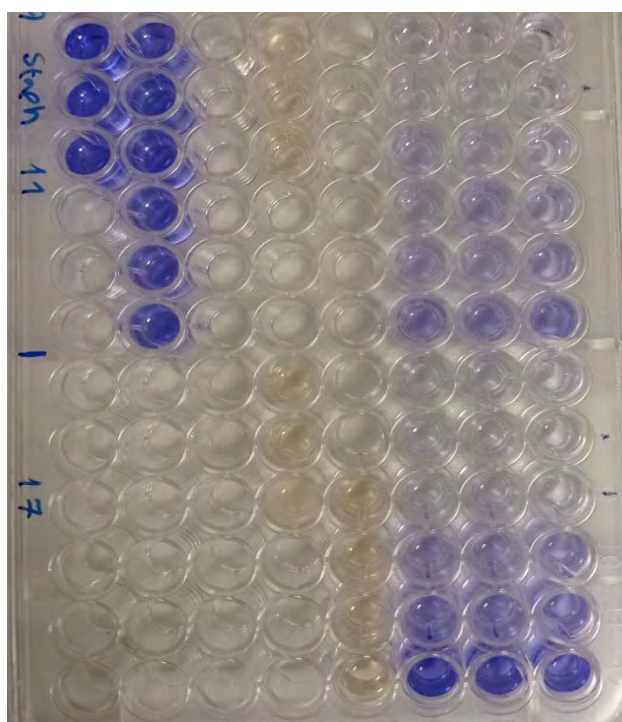
Πίνακας 12. Ποσοστό αναστολής σχηματισμού βιοϋμένα σε καλλιέργειες *Acinetobacter baumannii* ανά δείγμα ΜΨ. Η αναστολή υπολογίστηκε σε συγκεντρώσεις ίσες με το μισό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) και το ένα τέταρτο της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) των δειγμάτων

ΔΕΙΓΜΑ	MIC w/v	[MIC X 0,5] w/v	ΠΟΣΟΣΤΟ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ (MIC X 0,5)	[MIC X 0,25] w/v	ΠΟΣΟΣΤΟ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ (MIC X 0,25)
4	0,39%	0,195%	80,1 ± 18,55	0,0975%	69,7 ± 10,18
8	0,39%	0,195%	70,8 ± 2,35	0,0975%	52,8 ± 4,32
9	0,39%	0,195%	87,3 ± 5,16	0,0975%	-
10	1,56%	0,78%	84,5 ± 2,53	0,39%	54,6 ± 20,95
11	3,125%	1,56%	86,5 ± 3,98	0,78%	79 ± 8,66
12	1,56%	0,78%	83,5 ± 4,51	0,39%	82,6 ± 2,01
15	0,78%	0,39%	82,5 ± 6,05	0,195%	70,6 ± 5,4
18	0,78%	0,39%	84,5 ± 7,1	0,195%	31 ± 10,06

Ο πίνακας 12 μας δείχνει επίσης το ποσοστό αναστολής σχηματισμού βιοϋμένα σε καλλιέργειες *A. baumannii* ανά δείγμα ΜΨ. Η αναστολή και σε αυτή την περίπτωση υπολογίστηκε σε συγκεντρώσεις

ίσες με το μισό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) και το ένα τέταρτο της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) των δειγμάτων. Σε αυτή την περίπτωση καλύτερη αναστολή εμφανίζει το δείγμα 9 με 87,3% αναστολή σε συγκέντρωση (MIC X 0,5). Όπως περιμέναμε η αναστολή δημιουργίας βιοϋμένα εξαρτάται από τη συγκέντρωση του δείγματος ΜΨ και το ποσοστό αναστολής ανά δείγμα μεταβάλλεται και ανάλογα με το παθογόνο. Μεγαλύτερα ποσοστά αναστολής παρατηρούνται συνολικά έναντι του *Acinetobacter baumannii*.

Στη φωτογραφία 7 αποτυπώνεται μία δοκιμή αναστολής δημιουργίας βιοϋμένα έναντι του *S.aureus*. Αφορά τα δείγματα 11 και 18. Παρατηρούμε τη σταδιακή μεταβολή στην ένταση του χρώματος λόγω του χρωματισμού του βιοϋμένα με κρυσταλλικό ιώδες. Η πλάκα είναι νοητά χωρισμένη σε δύο τμήματα, το πάνω μισό αφορά το δείγμα 11 και το κάτω μισό το δείγμα 18. Για κάθε δείγμα οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βρίσκονται στο πάνω μέρος. Όσο προχωράμε προς τις μικρότερες συγκεντρώσεις αυξάνεται η ένταση του χρωματισμού λόγω μικρότερης αναστολής όσον αφορά τη δημιουργία βιοϋμένα. Τα έντονα χρωματισμένα φρεάτια πάνω αριστερά στη φωτογραφία αφορούν τον θετικό μάρτυρα.



Φωτογραφία 7. Δοκιμή αναστολής δημιουργίας βιοϋμένα έναντι του *S. aureus* Φωτογραφία: Νίκος Ασούτης Διδάρας

Ο πίνακας 13 εμφανίζει τα ποσοστά εκκρίωσης βιοϋμένα σε καλλιέργεια *S. aureus* που προκαλείται από διαφορετικά δείγματα ΜΨ και σε διάφορες συγκεντρώσεις αυτών. Τα καλύτερα ποσοστά εκκρίωσης παρατηρούνται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες της MIC. Το δείγμα 9 σε συγκέντρωση διπλάσια της MIC εμφανίζει το καλύτερο ποσοστό εκκρίωσης 84,1%. Επισημαίνεται ότι το δείγμα αυτό είχε τη δεύτερη καλύτερη τιμή MIC έναντι του *S. aureus* και τη δεύτερη καλύτερη τιμή MIC έναντι της *P. aeruginosa* (πίνακας 5). Αντίστοιχα ο πίνακας 14 εμφανίζει τα ποσοστά εκκρίωσης βιοϋμένα σε καλλιέργεια *Acinetobacter baumannii*. Η εκκρίωση σε ικανοποιητικά ποσοστά (36,8-58,6%) σε αυτή την περίπτωση επιτυγχάνεται σε υψηλές συγκεντρώσεις (25% και 12,5% w/v), πολλαπλάσιες των τιμών MIC των δειγμάτων. Αξίζει να αναφερθεί ότι το δείγμα 18 (μονοανθική κασταριά) που εμφανίζει την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση (πίνακας 6) δεν εμφάνισε αντίστοιχα καλά ποσοστά αναστολής ή εκκρίωσης βιοϋμένων.

Παρατηρούμε ότι έναντι του *Acinetobacter baumannii* για την εκρίζωση του βιοϋμένα απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις ΜΨ σε σύγκριση με αυτές που απαιτούνται για την εκρίζωση του βιοϋμένα έναντι του *Staphylococcus aureus*.

Πίνακας 13. Ποσοστό εκρίζωσης (%) βιοϋμένα σε καλλιέργεια *S. aureus* που προκαλείται από διαφορετικές συγκεντρώσεις ΜΨ

ΕΚΡΙΖΩΣΗ ΒΙΟΪΜΕΝΑ %								
ΔΕΙΓΜΑ	MIC w/v	6,25% w/v	3,125% w/v	1,56% w/v	0,78% w/v	0,39% w/v	0,195% w/v	0,097% w/v
4	0,39%	-	-	61,4±8,07	42,0±10,58	-	-	-
8	0,39%	-	41,2±8,87	38,1±13,72	37,7±8,14	34,7±9,34	-	-
9	0,78%	-	-	84,1±6,25	75,8±7,45	67,1±24,19	-	-
10	0,78%	-	67,7±6,73	57,2±4,89	38,2±11,81	22,8±1,62	-	-
11	1,56%	-	75,0±3,32	68,9±5,31	68,7±2,21	64,1±3,3	-	-
12	3,125%	64,8±3,42	55,1±3,53	41,5±10,88	35,3±12,96	22,0±6,16	13,9±10,99	-
15	0,39%	-	-	50,3±0,14	46,7±4,48	45,8±4,21	43,2±8,21	22,5±3,13
18	0,39%	-	-	-	56,8±9,55	39,1±8,46	35,1±12,19	16,2±7,34

Πίνακας 14. Ποσοστό εκρίζωσης βιοϋμένα (%) σε καλλιέργεια *A. baumannii* που προκαλείται από διαφορετικές συγκεντρώσεις ΜΨ

ΕΚΡΙΖΩΣΗ ΒΙΟΪΜΕΝΑ %									
ΔΕΙΓΜΑ	MIC w/v	25% w/v	12,5% w/v	6,25% w/v	3,125% w/v	1,56% w/v	0,78% w/v	0,39% w/v	0,195% w/v
4	0,39%	44,2±7,84	35,2±4,14	27±0	18±0	-	-	-	-
8	0,39%	36,8±0,84	35,5±1,45	10±0	5,7±0	-	-	-	-
9	0,39%	-	56,3±14,94	9,9±0	-	-	-	-	-
10	1,56%	42,4±1,73	40,4±7,04	33,2±0,96	14,3±0	-	-	-	-
11	3,125%	58,6±3,17	55,4±9,59	50±5,75	47,9±0,1	47,6±0	39,3±3,22	36,4±7,47	27,3±3,71
12	1,56%	56,3±8,87	53,1±5,26	48,3±0,51	47,6±12,94	36,2±13,75	33,1±0,14	33,0±2,13	12,8±9,52
15	0,78%	-	-	-	43,2±0,73	41,2±0,56	33,2±6,22	32,6±9,33	29,3±1,65
18	0,78%	43,2±3,87	37,9±17,45	-	-	-	-	-	-

Τα αποτελέσματά μας, δείχνουν ότι όλα τα δείγματα ΜΨ αναστέλλουν ή εκρίζουν τους βιοϋμένες που δημιουργήσαν τα βακτήρια, με ορισμένα δείγματα να επιτυγχάνουν πραγματικά υψηλά ποσοστά αναστολής ή εκρίζωσης. Αν και ο ακριβής βιολογικός μηχανισμός με τον οποίο δρα το ΜΨ πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω, είναι πολύ πιθανό ότι επιδρά στην έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην ρύθμιση και δημιουργία των βιοϋμένων ή και στη λύση τους. Ένζυμα που παράγει το μικροβίωμα του ΜΨ ή που απελευθερώνονται κατά τη λύση των παθογόνων βακτηρίων πιθανόν συνεργούν στην εκρίζωση. Περαιτέρω διερεύνηση θα διευκρινίσει το μοριακό μηχανισμό δράσης και θα αναδείξει τους υπεύθυνους παράγοντες με τελικό στόχο την θεραπευτική αξιοποίησή τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β2. ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΥΡΗΣ ΤΩΝ ΜΕΛΙΣΣΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΤΑ ΖΥΜΩΜΕΝΗΣ ΓΥΡΗΣ ΤΩΝ ΜΕΛΙΣΣΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ- ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΤΑ ΖΥΜΩΜΕΝΗΣ ΓΥΡΗΣ ΣΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΡΓΑΤΡΙΩΝ ΜΕΛΙΣΣΩΝ (*Apis mellifera*)

Β.2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στο κεφάλαιο Β1 παρουσιάστηκε η αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση του ΜΨ. Αναφέρθηκε ήδη εκτενώς ότι οι δράσεις αυτές αποδίδονται κυρίως σε μεταβολίτες βοτανικής προέλευσης, όπως οι πολυφαινόλες, χωρίς να αποκλείεται και η μικροβιακή προέλευση κάποιων εξ αυτών. Στο προηγούμενο κεφάλαιο δείξαμε επίσης τη συμβολή πρωτεϊνικής φύσεως ουσιών που σχετίζονται με την αντιμικροβιακή δράση του ΜΨ. Η προέλευση αυτών των πρωτεϊνικής φύσεως ουσιών είναι άγνωστη. Θα μπορούσαν να έχουν προστεθεί από τις μέλισσες, να είναι φυτικής προέλευσης ή να είναι προϊόντα του μικροβιακού μεταβολισμού [1]. Το μικροβίωμα έχει τη δυνατότητα να παράγει αντιμικροβιακές ουσίες κατά τη ζύμωση του ΜΨ, πρωτεϊνικής ή άλλης φύσεως [1,54].

Ελάχιστες μελέτες έχουν γίνει προς την κατεύθυνση διερεύνησης της συμβολής του μικροβιώματος του ΜΨ στην αντιμικροβιακή του δράση [55, 56]). Οι Kaškonienė et al [55] παρατήρησαν βελτίωση όσον αφορά τις αντιβακτηριακές δράσεις της φυσικής και της παστεριωμένης πολυανθικής γύρης μελισσών μετά από τη ζύμωση της. Τα προϊόντα που παρήχθησαν δοκιμάστηκαν μετά από εκχύλιση σε μεθανόλη. Με σκοπό την ελεγχόμενη ζύμωση, η ΓΜ πρώτα παστεριώθηκε και εν συνεχεία ενοφθαλμίστηκε με τα βακτήρια *Lactococcus lactis* και *Lactobacillus rhamnosus*. Σε αυτή τη μελέτη οι ερευνητές πρόσθεσαν στη γύρη περίπου 10% μέλι και περίπου 50% αποστειρωμένο απιονισμένο νερό συνολικά. Επίσης χρησιμοποίησαν βακτήρια που είχαν απομονωθεί από ζυμωμένα προϊόντα σταριού, γνωστά για την ικανότητα τους να παράγουν βακτηριοσίνες. Επεξεργάστηκαν το προϊόν πριν τη ζύμωση παστεριώνοντάς το σκοτώνοντας με αυτό τον τρόπο τις βλαστικές μορφές των μικροβίων. Ο σκοπός της παστερίωσης ήταν να οδηγήσει κατά το δυνατό σε ελεγχόμενη ζύμωση αν και είναι γνωστή η ύπαρξη αρκετών σπορογόνων βακτηρίων στο ΜΨ κυρίως βακίλων [57,58], που μπορούν και επιβιώνουν από μια τέτοια διαδικασία.

Στη δικιά μας μελέτη χρησιμοποιήσαμε τη διπλή παστερίωση με ένα ενδιάμεσο στάδιο επώασης με αποτέλεσμα την εξάλειψη των σπορογόνων βακτηρίων. Η ενυδάτωση της γύρης συνολικά ήταν στο 20% και χρησιμοποιήθηκαν στελέχη απιλακτοβακίλων, φρουκτοβακίλων, βακίλων και ζυμών που απομονώθηκαν από δείγματα ΜΨ ώστε να προσομοιάσουμε κατά το δυνατό τις φυσικές συνθήκες. Τα δείγματά μας δοκιμάστηκαν μετά από εναιώρησή τους σε νερό.

Οι Di Cagno et al [56] επικεντρώθηκαν κυρίως στην πεπτικότητα και τη βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών ουσιών και των βιοδραστικών ενώσεων του ζυμωμένου προϊόντος. Χρησιμοποίησαν στελέχη *Lactobacillus kunkeei* και τη ζύμη των φυτών *Hanseniaspora uvarum* AN8Y27B με σκοπό τη μίμηση της αυθόρμητης ζύμωσης του ΜΨ. Η χρήση των συγκεκριμένων στελεχών αύξησε την πεπτικότητα και τη βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών ουσιών και των βιοδραστικών ενώσεων στο ζυμωμένο προϊόν. Το ΜΨ θεωρείται πιο βιοδραστικό από τη γύρη όσον αφορά την αντιμικροβιακή και την αντιοξειδωτική του δράση. Έχει επίσης καλύτερη πεπτικότητα και θρεπτική αξία σε σχέση με τη ΓΜ [1,5,55].

Λαμβάνοντας αυτά τα χαρακτηριστικά υπόψη, θελήσαμε να συγκρίνουμε την επίδραση της ζύμωσης της γύρης στη διάρκεια ζωής των μελισσών σε εργαστηριακό επίπεδο, τροφοδοτώντας τις με ΓΜ και τεχνητά ζυμωμένη ΓΜ με τη χρήση μικροβιακών στελεχών που έχουν απομονωθεί από το ΜΨ.

Από το 2006 που έγινε η πρώτη αναφορά στο σύνδρομο κατάρρευσης των μελισσών οι ετήσιες απώλειες μελισσοσμηνών παγκόσμια έχουν αυξηθεί σε ανησυχητικό βαθμό. Οι μελισσοκόμοι των ΗΠΑ έχασαν το 50,8% των αποικιών τους το χειμώνα 2020–21, το υψηλότερο ετήσιο ποσοστό απωλειών μέχρι σήμερα. Κατά τη διάρκεια του επόμενου έτους, 2021–2022, οι μελισσοκόμοι έχασαν το 39,0% των αποικιών τους, που είναι κοντά στον μέσο όρο των ετήσιων ποσοστών απωλειών που είχαν δημοσιευθεί προηγουμένως (40,9%) [59].

Τα αίτια αυτών των απωλειών είναι πολλά και πιστεύεται ότι δρουν συνδυαστικά διάφοροι παράγοντες όπως παράσιτα, παθογόνα, φυτοφάρμακα, διατροφικές ελλείψεις, κλιματική κρίση, προβλήματα οικοτόπων κ.α.[59]. Πρόσφατη έρευνα [60] έδειξε ότι η διάρκεια ζωής των μελισσών που εκτρέφονται στο εργαστήριο έχει μειωθεί κατά 50% τα τελευταία 70 χρόνια. Όταν οι ερευνητές μοντελοποίησαν τα δεδομένα για το νέο προσδόκιμο ζωής των μελισσών τα αποτελέσματα συμβάδιζαν με τις απώλειες που παρατηρούνται και στο πεδίο [60]. Η συγκεκριμένη έρευνα είναι η πρώτη που υποδεικνύει ότι πιθανόν υπεισέρχονται και γενετικοί παράγοντες στις απώλειες των μελισσοσμηνών. Ανεξάρτητα από την αιτία, τα μέσα που έχουμε για να περιορίσουμε αυτές τις απώλειες είναι συγκεκριμένα και στρέφονται κυρίως στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος των μελισσών. Η γύρη (με τη μορφή του ΜΨ) που προέρχεται από όσο το δυνατό διαφορετικά είδη φυτών είναι κρίσιμης σημασίας για ένα ισχυρό ανοσοποιητικό σύστημα και ένα υγιές μικροβίωμα της μέλισσας. Στο πλαίσιο αυτής της διατριβής διερευνήθηκε η επίδραση της ΓΜ και της τεχνητά ζυμωμένης ΓΜ στη διάρκεια ζωής των εργατριών μελισσών (*Apis mellifera*) σε εργαστηριακές συνθήκες και από όσο γνωρίζουμε είναι η πρώτη φορά που επιχειρείται αυτή η σύγκριση.

Πρέπει να επισημάνουμε ότι ακόμη και ένα μικρό ποσοστό αύξησης της διάρκειας ζωής των εργατριών μελισσών μιας κυψέλης έχει πολλαπλάσιο αποτέλεσμα στην αύξηση του πληθυσμού της και κατά συνέπεια στην παραγωγικότητά της, στην αντιμετώπιση στρεσογόνων παραγόντων και τελικά στην επιβίωσή της.

B.2.2. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

ΔΙΠΛΗ ΠΑΣΤΕΡΙΩΣΗ ΤΗΣ ΓΜ – ΤΕΧΝΗΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΤΗΣ ΓΜ

Πολυανθική ΓΜ συλλέχτηκε στη Θεσσαλία την άνοιξη του 2022 (δείγμα AF1). Ο μελισσοκόμος που την συνέλλεξε μας παρείχε δεδομένα για τη βοτανική πηγή του δείγματος, με βάση τη διαθέσιμη χλωρίδα κατά την περίοδο της συγκομιδής στη θέση του μελισσοκομείου με ανθοφορίες φυτών από τις οικογένειες *Brassicaceae*, *Ranunculaceae*, *Papaveraceae* και *Cistaceae*.

Η διαδικασία διπλής παστερίωσης πραγματοποιήθηκε ως εξής: Το δείγμα AF1 παστεριώθηκε στους 65°C για 40 λεπτά σε υδατόλουτρο. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 11,5 gr δείγματος AF1 που αναμίχθηκαν με 1 ml ζυμού (NB3) που συνίσταται από: Nutrient Broth (Biolab, Zrt. 1141 Bp. On u. 43, Hungary), με προσθήκη 0,5 % εκχυλίσματος ζύμης (Neogen, Heywood, UK) και 0,5 % γλυκόζη (SERVA, Heidelberg, GmbH), σε κλειστό αποστειρωμένο σωλήνα των 50 ml. Μετά την παστερίωση ο σωλήνας επωάστηκε στους 33°C για 48 ώρες επιτρέποντας στα σπορογόνα βακτήρια να αναπτυχθούν. Η δεύτερη παστερίωση (65°C για 40 λεπτά) έλαβε χώρα μετά από τις 48 ώρες επώαση. Στο τέλος της δεύτερης παστερίωσης, η τιτλοδότηση του παστεριομένου προϊόντος (με επώαση σε PCA στους 37°C για 5 ημέρες) έδειξε <10 CFUs/gr.

-Δείγμα AF46D (αρνητικός μάρτυρας): 1,3 ml ζυμού NB3 αναμεμειγμένο με 11,5 g διπλά παστεριωμένου δείγματος AF1 επωάστηκε για 11 ημέρες στους 33 °C.

-Το δείγμα AF42D ζυμώθηκε ως εξής: 11,5 g διπλά παστεριωμένου δείγματος AF1 εμβολιάστηκε με 10⁸ CFUs *Apilactobacillus kunkeei* (στέλεχος NADBB37) που είχαν επαναιωρηθεί σε 1,3 ml ζυμού NB3. Το δείγμα αναμίχθηκε και επωάστηκε για 11 ημέρες στους 33 °C.

-Το δείγμα AF43D ζυμώθηκε ως εξής: 11,5 g διπλά παστεριωμένου δείγματος AF1 εμβολιάστηκε με 10⁸ CFUs *A. kunkeei* (στέλεχος NADBB7) που είχαν επαναιωρηθεί σε 1,3 ml ζυμού NB3. Το δείγμα αναμίχθηκε και επωάστηκε για 11 ημέρες στους 33 °C.

-Το δείγμα AF44D ζυμώθηκε ως εξής: 11,5 g διπλά παστεριωμένου δείγματος AF1 εμβολιάστηκε με 10⁸ CFUs *A. kunkeei* (στέλεχος NADBB37), 10⁸ CFUs *A. kunkeei* (στέλεχος NADBB7), 10⁸ CFUs *Fructobacillus fructosus* (στέλεχος NADBB39) και 10⁸ CFUs *Zygosaccharomyces siamensis* που είχαν επαναιωρηθεί σε 1.3 ml ζυμό NB3. Το δείγμα αναμίχθηκε και επωάστηκε για 11 ημέρες στους 33°C.

Το δείγμα AF5U ζυμώθηκε ως εξής: 11,5 g δείγματος AF1 (μη παστεριωμένο) εμβολιάστηκε με 10^8 CFUs *A. kunkeei* (στέλεχος NADBB37) που είχαν επαναιωρηθεί σε 2,3 ml ζωμού NB3. Το δείγμα αναμίχθηκε και επωάστηκε για 29 ημέρες στους 33 °C.

Ο προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) και της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC) των δειγμάτων έγινε όπως έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο B1.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΜΕΛΙΣΣΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΡΟΦΟΔΟΣΙΑ ΜΕ ΓΥΡΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΤΑ ΖΥΜΩΜΕΝΗ ΓΥΡΗ

Ο έλεγχος διενεργήθηκε στο Τμήμα Μελισσοκομίας του ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ, Νέα Μουδανιά

Για τον εργαστηριακό έλεγχο βιωσιμότητας ενήλικων μελισσών χρησιμοποιήθηκαν μικροί ξύλινοι κλωβοί 10εκ X 10 εκ X10 εκ., με τοιχώματα από μεταλλικό πλέγμα και αφαιρούμενο μεταλλικό φύλλο δαπέδου σύμφωνα με τους Hatjina et al. [61]

Χρησιμοποιήθηκαν νεοεκκολαπτόμενες μέλισσες οι οποίες συλλέχθηκαν από 3 διαφορετικές κηρήθρες που περιείχαν γόνο μελισσών (κάθε κηρήθρα προέρχονταν από διαφορετική κυψέλη). Οι κηρήθρες τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο, σε θερμοκρασία 35°C και σχετική υγρασία (RH) περίπου 70% (συνθήκες που προσομοιάζουν εκείνες μίας ζωντανής κυψέλης) και οι μέλισσες συλλέχθηκαν μερικές ώρες μετά την εκκόλαψή τους και τοποθετήθηκαν με τυχαίο τρόπο στους πειραματικούς κλωβούς. Σε κάθε κλωβό τοποθετήθηκαν 40 μέλισσες και 4 κλωβοί χρησιμοποιήθηκαν για κάθε τύπο γύρης και τεχνητά ζυμωμένης γύρης, ενώ 4 επιπλέον κλωβοί χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

Οι κλωβοί με τις μέλισσες διατηρήθηκαν σε απόλυτο σκοτάδι στους 28-29°C και 70% σχετική υγρασία (RH). Οι μέλισσες τρέφονταν καθημερινά με διάλυμα ζάχαρης (33% w/v) και ζυμωμένη γύρη ή γύρη. Τρία διαφορετικά δείγματα τεχνητά ζυμωμένης γύρης χρησιμοποιήθηκαν (22, 23, 24) και η γύρη από την οποία προέκυψαν, χωρίς ζύμωση, χρησιμοποιήθηκε για τους μάρτυρες (δείγμα 30).

Οι νεκρές μέλισσες απομακρύνονταν καθημερινά, τα δάπεδα των κλωβών καθαρίζονταν και η τροφή ανανεωνόταν καθημερινά. Η τροφή που δεν είχε καταναλωθεί ζυγιζόταν και έτσι για κάθε ημέρα ήταν δυνατός ο υπολογισμός της τροφής που κατανάλωσαν οι μέλισσες που παρέμειναν ζωντανές εκείνη την ημέρα. Ο τελικός υπολογισμός ήταν πρωτεϊνική τροφή ή σιρόπι ζάχαρης ανά μέλισσα ανά ημέρα.

Ο έλεγχος διήρκεσε 14 ημέρες, όσες και οι ημέρες που οι μέλισσες κατανάλωναν γύρη, δεδομένου ότι είναι γνωστό ότι μετά από 10-12 ημέρες οι μέλισσες καταναλώνουν απειροελάχιστη γύρη [61].

Τα δείγματα ζυμώθηκαν ως εξής:

Πολυανθική ΓΜ (δείγμα 30) συλλέχτηκε στη Θεσσαλία την άνοιξη του 2022, (ίδιο με δείγμα AF1).

-Δείγμα 30 (μάρτυρας): χρησιμοποιήθηκε όπως ήταν κατά τη συλλογή. Είχε διατηρηθεί σε κατάψυξη στους -20° C.

-Το δείγμα 22 ζυμώθηκε ως εξής: 11,5 g δείγματος 30 εμβολιάστηκαν με 10^8 CFUs *Apilactobacillus kunkeei* (στέλεχος NADBB37) και 10^8 CFUs *Fructobacillus fructosus* (στέλεχος NADBB39) που είχαν επαναιωρηθεί σε 1,3 ml ζωμού NB3. Το δείγμα αναμίχθηκε και επωάστηκε για 8 ημέρες στους 33 °C. Στη συνέχεια προστέθηκαν 11,5 gr ΓΜ από το δείγμα 30, αναμίχθηκαν καλά και φυλάχθηκε στους -20° C για περαιτέρω δοκιμές.

-Το δείγμα 23 ζυμώθηκε ως εξής: 11,5 g δείγματος 30 εμβολιάστηκαν με 10^8 CFUs *Zygosaccharomyces siamensis* που είχαν επαναιωρηθεί σε 1,3 ml ζωμού NB3. Το δείγμα αναμίχθηκε και επωάστηκε για 8 ημέρες στους 33 °C. Στη συνέχεια προστέθηκαν 11,5 gr ΓΜ από το δείγμα 30, αναμίχθηκαν καλά και φυλάχθηκε στους -20° C για περαιτέρω δοκιμές.

-Το δείγμα 24 ζυμώθηκε ως εξής: 11,5 g δείγματος 30 εμβολιάστηκαν με εμβόλιο που περιείχε 10^8 CFUs *Apilactobacillus kunkeei* (στέλεχος NADBB37), 10^8 CFUs *Fructobacillus fructosus* (στέλεχος NADBB39), 10^8 CFUs *Zygosaccharomyces siamensis*, 10^8 CFUs *Bacillus licheniformis* (στέλεχος NADBB16), 10^8 CFUs *Bacillus subtilis* (στέλεχος NADBB17), 10^8 CFUs *Bacillus alotolerans* (στέλεχος NADBB42) και 10^8 CFUs *Bacillus cereus* (στέλεχος NADBB4). Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν επαναιωρήθηκαν όλα μαζί σε όγκο 1,3 ml ζωμού NB3 και προστέθηκαν στη γύρη. Το δείγμα αναμίχθηκε και επωάστηκε για 8 ημέρες στους 33 °C. Στη συνέχεια προστέθηκαν 11,5 gr ΓΜ από το δείγμα 30, αναμίχθηκαν καλά και το τελικό προϊόν φυλάχθηκε στους -20° C για περαιτέρω δοκιμές.

Η ταυτοποίηση των στελεχών και οι βιοσυνθετικές και αντιμικροβιακές ιδιότητές τους περιγράφονται στο κεφάλαιο Γ1 της παρούσας διατριβής.

B.2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΜ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΤΑ ΖΥΜΩΜΕΝΗΣ ΓΜ ΕΝΑΝΤΙ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Με σκοπό να διερευνηθεί η συμβολή του μικροβιώματος του ΜΨ στην αντιβακτηριακή του δράση χρησιμοποιήσαμε στελέχη που απομονώθηκαν από δείγματα ΜΨ για την τεχνητή ζύμωση της γύρης των μελισσών. Επιπλέον εφαρμόσαμε την τεχνική της διπλής παστερίωσης της ΓΜ για την αδρανοποίηση του μικροβιώματός της.

Οι τιμές MIC και MBC απεικονίζονται στον πίνακα 15. Η μη παστεριωμένη ΓΜ (δείγμα AF1) εμφανίζει τιμές MIC 12,5 % w/v και για τα δύο παθογόνα *S. aureus* και *S. Typhimurium* και τιμές MBC >12,5 % w/v επίσης και για τα δύο παθογόνα. Το δείγμα AF46D (διπλά παστεριωμένο AF1 χωρίς ενοφθαλμισμό) δείχνει την ίδια τιμή MIC έναντι του *S. aureus* σε σύγκριση με το δείγμα AF1, υποδεικνύοντας ότι οι αντιμικροβιακές ενώσεις κατά του *S. aureus* είναι ανθεκτικές στη θερμοκρασία της παστερίωσης. Αντίθετα, το δείγμα AF46D δείχνει τιμή MIC >12,5% έναντι της *S. Typhimurium*, υποδεικνύοντας ότι οι αντιμικροβιακές ενώσεις κατά της *S. Typhimurium* δεν είναι ανθεκτικές στη θερμοκρασία της παστερίωσης και δεν είναι οι ίδιες ενώσεις που αναστέλλουν τον *S. aureus*. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από τη διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων σε σχέση με την καλλιέργεια εκκίνησης, γεγονός που μας οδηγεί στην υπόθεση ότι πιθανόν η αντιβακτηριδιακή δράση έναντι του *S. aureus* οφείλεται πιθανό σε ανθεκτικούς στη θερμοκρασία μεταβολίτες φυτικής προέλευσης. Συγκεκριμένα το δείγμα AF46D, παρόλο που επωάστηκε όπως και τα υπόλοιπα δείγματα (αλλά δεν εμβολιάστηκε με καλλιέργεια εκκίνησης), χάνει την αντιβακτηριδιακή του δράση έναντι της *S. Typhimurium* σε αντίθεση με τα υπόλοιπα δείγματα που εμβολιάστηκαν (πίνακας 15).

Συμπεραίνουμε επιπλέον ότι η παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων σχετίζεται κυρίως με τη ζύμωση και όχι με πιθανές φυσικοχημικές μεταβολές που μπορεί να συμβούν κατά τη διάρκεια της επώασης. Ακόμη, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, το είδος της καλλιέργειας εκκίνησης είναι ο κύριος παράγοντας που επηρεάζει τις μεταβολικές διεργασίες και πιθανώς και την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών.

Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται από τις τιμές MIC και MBC των δειγμάτων AF42D, AF43D και AF44D έναντι της *S. Typhimurium*. Η τιμή MIC του δείγματος AF42D (6,25%) είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με την τιμή MIC του δείγματος AF46D (>12,5%). Επίσης η τιμή MIC του δείγματος AF42D είναι καλύτερη σε σύγκριση με την τιμή MIC του δείγματος AF1 (12,5%) που είναι η πρώτη ύλη (ΓΜ) που χρησιμοποιήσαμε για παστερίωση και ζύμωση. Το στέλεχος *A. kunkeei* NADBB37 χρησιμοποιήθηκε ως καλλιέργεια εκκίνησης για το δείγμα AF42D. Ένα διαφορετικό στέλεχος *A. kunkeei* (στέλεχος NADBB7) χρησιμοποιήθηκε ως καλλιέργεια εκκίνησης για το δείγμα AF43D. Το AF43D έδειξε την ίδια τιμή MIC σε σύγκριση με την τιμή MIC του δείγματος AF42D, αλλά το AF43D σε αντίθεση με το AF42D δείχνει βακτηριοκτόνο δράση έναντι της *S. Typhimurium* (MBC= 12,5%). Υποθέτουμε ότι το στέλεχος *A. kunkeei* NADBB7 είναι ικανό να παράγει διαφορετικά ή υψηλότερα επίπεδα αντιμικροβιακών ενώσεων έναντι της *S. Typhimurium* σε σύγκριση με το στέλεχος *A. kunkeei* NADBB37.

Μια διαφορετική καλλιέργεια εκκίνησης (συνδυασμός του στελέχους NADBB37 *A. kunkeei*, *Fructobacillus fructosus* και *Zygosaccharomyces siamensis*) χρησιμοποιήθηκε για τη ζύμωση του δελιγματος AF44D. Το AF44D δεν δείχνει βακτηριοκτόνο έναντι της *S. Typhimurium* (τιμή MBC >12,5) και εμφανίζει τιμή MIC 12,5%.

Το AF1 είναι επίσης η πρώτη ύλη (ΓΜ) που χρησιμοποιήσαμε για το δείγμα AF5U χωρίς παστερίωση. Η καλλιέργεια εκκίνησης για το δείγμα AF5U αποτελούνταν από στέλεχος *A. kunkeei* NADBB37. Το δείγμα AF5U επωάστηκε για 29 ημέρες στους 33 °C (όλα τα άλλα δείγματα επωάστηκαν για 11 ημέρες στους 33 °C). Οι τιμές MIC και MBC αυτού του δείγματος (δείγμα AF5U) είναι οι καλύτερες τιμές που ελήφθησαν σε αυτήν τη μελέτη (πίνακας 15) έναντι και των δύο παθογόνων. Συμπερασματικά αποδεικνύεται ότι ο τύπος της καλλιέργειας εκκίνησης και οι συνθήκες επώασης επηρεάζουν αμφότερα την αντιβακτηριακή δράση της τεχνητά ζυμωμένης ΓΜ.

Πίνακας 15. Τιμές MIC και MBC από τεχνητά ζυμωμένα δείγματα ΓΜ και ΓΜ

ΔΕΙΓΜΑ	<i>S. aureus</i>		<i>S. enterica sub. Typhimurium</i>	
	MIC w/v	MBC w/v	MIC w/v	MBC w/v
AF1	12.5%	>12.5%	12.5%	>12.5%
AF46D	12.5%	>12.5%	>12.5%	>12.5%
AF42D	12.5%	>12.5%	6.25%	>12.5%
AF43D	12.5%	>12.5%	6.25%	12.5%
AF44D	12.5%	>12.5%	12.5%	>12.5%
AF5	6.25%	12.5%	6.25%	6.25%

Απαιτείται περαιτέρω έρευνα ώστε να διευκρινιστεί πως επηρεάζονται οι αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες του ΜΨ σε σχέση με τις συνθήκες αποθήκευσής του μετά τη συγκομιδή του καθώς και με το επίπεδο ωρίμασής του. Πρόσφατη *in vitro* μελέτη έδειξε ότι κατά τη ζύμωση της γύρης υπό εργαστηριακές συνθήκες παρατηρείται αύξηση στα φαινολικά οξέα, στα φλαβονοειδή και στην αντιοξειδωτική δράση στο ζυμωμένο προϊόν, σε σύγκριση με τη φρέσκια γύρη [55]. Επομένως, θα πρέπει να διερευνηθεί εάν αυτό συμβαίνει κατά τη μετατροπή της ΓΜ σε ΜΨ στην κυψέλη και σε ποιο βαθμό το μικροβίωμα παίζει ρόλο σε αυτές τις ιδιότητές του. Είναι εύλογη η συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας σε φαινολικά/φλαβονοειδή και της αντιβακτηριακής δράσης του ΜΨ. Ωστόσο, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι και οι μεταβολίτες μικροβιακής προέλευσης συμβάλλουν σημαντικά στην αντιμικροβιακή δράση.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΕΡΓΑΤΡΙΩΝ ΜΕΛΙΣΣΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΡΟΦΟΔΟΣΙΑ ΜΕ ΓΥΡΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΤΑ ΖΥΜΩΜΕΝΗ ΓΥΡΗ

Στον Πίνακα 16 παρουσιάζεται το επί τοις % ποσοστό επιβίωσης των μελισσών ανά κλωβό στο τέλος του πειράματος (14^η μέρα), ο μέσος όρος (ΜΟ) και η τυπική απόκλιση (SD) όσον αφορά τη βιωσιμότητα των μελισσών. Παρατηρούμε ότι το δείγμα 24 εμφάνισε το μεγαλύτερο ΜΟ βιωσιμότητας την 14^η μέρα (56,7%) σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα που εμφάνισαν τιμές κοντά στο 30% (32,32-33,03%). Παρατηρείται επίσης σημαντική διακύμανση του ποσοστού βιωσιμότητας ανά κλωβό σε κάθε δείγμα με τις τιμές της τυπικής απόκλισης (SD) να κυμαίνονται από 26,24 έως 41,61. Η μεγαλύτερη τιμή τυπικής απόκλισης (41,61) παρατηρήθηκε στη μη ζυμωμένη γύρη με δύο κλωβούς να εμφανίζουν 0% βιωσιμότητα, έναν μεσαία βιωσιμότητα (42,11%) και έναν υψηλή βιωσιμότητα (87,18%). Το δείγμα 24 που εμφάνισε τον υψηλότερο ΜΟ βιωσιμότητας ήταν και το δείγμα όπου την 14^η ημέρα όλοι οι κλωβοί είχαν ζωντανές μέλισσες σε αντίθεση με τα άλλα δύο δείγματα ζυμωμένης γύρης (δείγματα 22 και 23), όπου από τους τέσσερεις κλωβούς (για κάθε δείγμα), στον ένα δεν επιβίωσαν καθόλου μέλισσες.

Πίνακας 16. Ποσοστό επιβίωσης, μέσος όρος (ΜΟ) βιωσιμότητας και τυπική απόκλιση (SD) ανά δείγμα τεχνητά ζυμωμένης γύρης σε διάστημα 14 ημερών

ΔΕΙΓΜΑ	Αριθμός Κλωβού	% ποσοστό επιβίωσης ανά κλωβό τη 14 ^η ημέρα	ΜΟ βιωσιμότητας τη 14 ^η μέρα	Τυπική απόκλιση (SD)
ΖΥΜΩΜΕΝΗ ΓΥΡΗ 22	22.I.	30,00		
	22.II.	0,00		
	22.III.	74,36		
	22.IV.	27,78		
			33,03	30,74
ΖΥΜΩΜΕΝΗ ΓΥΡΗ 23	23.I.	41,46		
	23.II.	0,00		
	23.III.	27,03		
	24.IV.	62,50		
			32,74	26,24
ΖΥΜΩΜΕΝΗ ΓΥΡΗ 24	24.I.	30,23		
	24.II.	26,32		
	24.III.	90,24		
	24.IV.	80,00		
			56,69	33,12
ΔΕΙΓΜΑ 30 (ΓΥΡΗ ΧΩΡΙΣ ΖΥΜΩΣΗ)	30.I.	0,00		
	30.II.	0,00		
	30.III.	87,18		
	30.IV.	42,11		
			32,32	41,61

Οι τιμές ΜΟ και SD εμφανίζονται μέχρι δεύτερο δεκαδικό ψηφίο χωρίς στρογγυλοποίηση.

Από τα αποτελέσματά μας προκύπτει ότι τα δύο από τα τρία δείγματα της τεχνητά ζυμωμένης ΓΜ (22, 23) εμφανίζουν περίπου τα ίδια ποσοστά βιωσιμότητας με τη ΓΜ (30). Σημαντικά υψηλότερα ποσοστά βιωσιμότητας σε σύγκριση με τη ΓΜ εμφανίζει μόνο το ένα ζυμωμένο δείγμα (24).

Αν και γενικά θεωρείται ότι τα ζυμωμένα προϊόντα διατροφής των μελισσών (συγκεκριμένα τα ζυμωμένα υποκατάστατα γύρης) αυξάνουν το προσδόκιμο ζωής των μελισσών [62], από τα δεδομένα μας συμπεραίνουμε ότι αυτό εξαρτάται από το είδος της ζύμωσης και συγκεκριμένα από τους μικροοργανισμούς που ενοφθαλμίστηκαν και συμμετέχουν σε αυτή. Ακόμη εξαρτώνται και από την ποιότητα της αρχικής ΓΜ. Στην περίπτωση μας θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι τα στελέχη των βακίλλων που επιλέχθηκαν λόγω του βιοσυνθετικού δυναμικού τους (Πίνακας 31) μπόρεσαν να διασπάσουν ένα ποσοστό γυροκόκκων και να αυξήσουν κατά αυτό τον τρόπο τη θρεπτική αξία του ζυμωμένου προϊόντος (δείγμα 24). Μελλοντικές μελέτες που θα συνδυάζουν την ανάλυση των μεταβολικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων όχι μόνο με τη διάρκεια ζωής των εργατριών μελισσών αλλά και με άλλους δείκτες (βάρος υποφαρυγγικών αδένων, σύσταση λιπώδους σώματος, επίπεδα βιτελλογενίνης) ή και με την αντίστασή τους σε ασθένειες θα μπορούσε να επιβεβαιώσει την υπόθεσή μας.

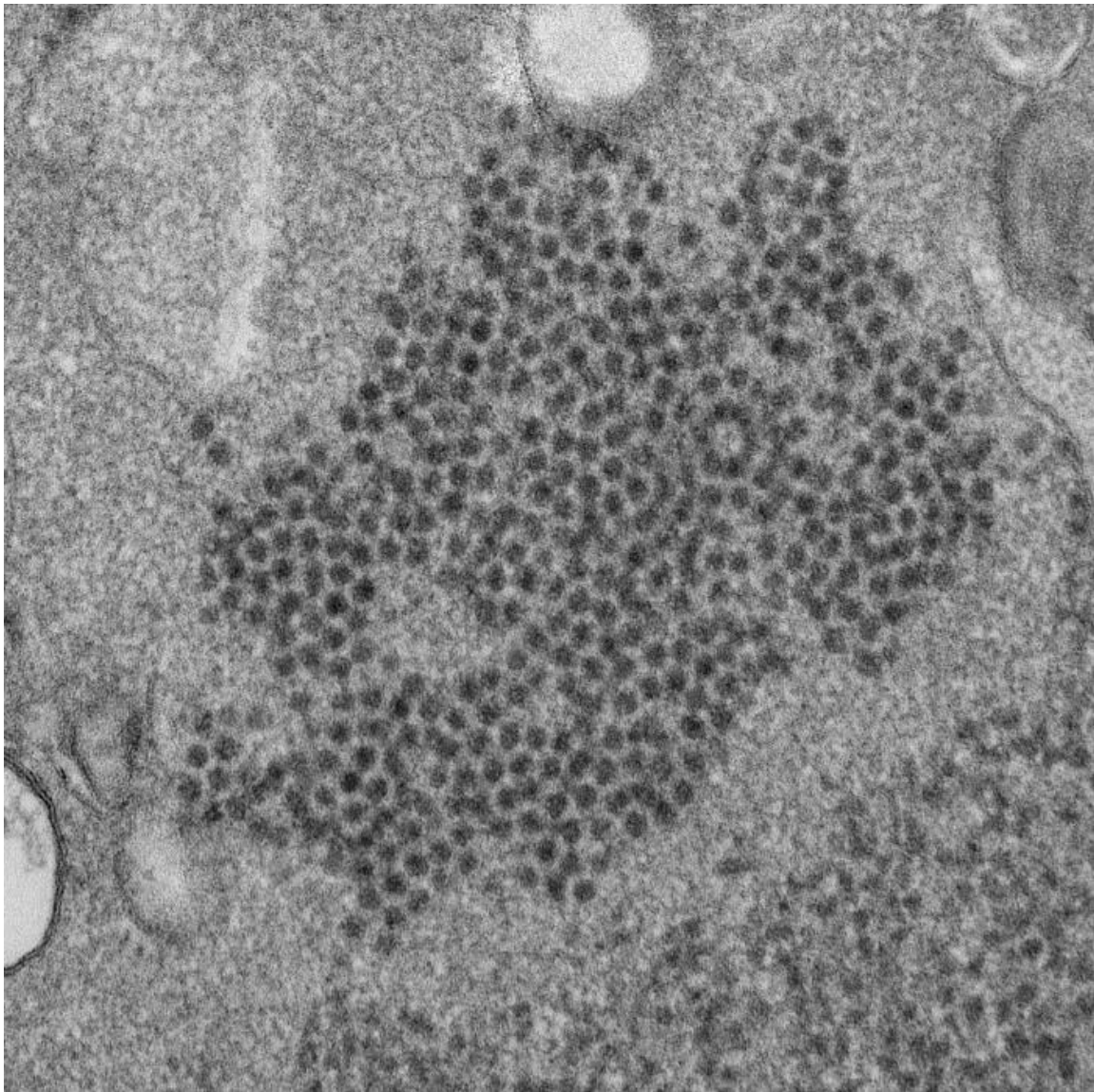
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΩΝ Β1 ΚΑΙ Β2

1. Didaras, N.A.; Karatasou, K.; Dimitriou, T.G.; Amoutzias, G.D.; Mossialos, D. Antimicrobial Activity of Bee-Collected Pollen and Beebread: State of the Art and Future Perspectives. *Antibiotics* 2020, *9*, 811.
2. Bakour, M.; Fernandes, Â.; Barros, L.; Sokovic, M.; Ferreira, I.C.F.R.; Lyoussi, B. Bee bread as a functional product: Chemical composition and bioactive properties. *LWT* 2019, *109*, 276–282.
3. Mărgăoan, R.; Stranț, M.; Varadi, A.; Topal, E.; Yücel, B.; Cornea-Cipcigan, M.; Campos, M.G.; Vodnar, D.C. Bee Collected Pollen and Bee Bread: Bioactive Constituents and Health Benefits. *Antioxidants* 2019, *8*, 568.
4. Kieliszek, M.; Piwowarek, K.; Kot, A.M.; Błażej, S.; Chlebowska-Śmigiel, A.; Wolska, I. Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 2018, *71*, 170–180.
5. Pełka, K.; Otłowska, O.; Worobo, R.W.; Szveda, P. Bee bread exhibits higher antimicrobial potential compared to bee pollen. *Antibiotics* 2021, *10*, 125.
6. Urcan, A.; Criste, A.; Dezmirean, D.; Bobiş, O.; Mărghițaș, L.; Mărgăoan, R.; Hrinca, A. Antimicrobial Activity of Bee Bread Extracts Against Different Bacterial Strains. *Bull. UASVM Anim. Sci. Biotechnol.* 2018, *75*, 85–91.
7. Abouda, Z.; Zerdani, I.; Kalalou, I.; Faid, M.; Ahami, M.T. The antibacterial activity of moroccan bee bread and bee-pollen (fresh and dried) against pathogenic bacteria. *Res. J. Microbiol.* 2011, *6*, 376.
8. Baltrušaitis, V.; Venskmonis, P.R.; Čeksteryte, V. Antibacterial activity of honey and beebread of different origin against *S. Aureus* and *S. epidermidis*. *Food Technol. Biotechnol.* 2007, *45*, 201–208.
9. Velásquez, P.; Rodríguez, K.; Retamal, M.; Giordano, A.; Valenzuela, L.M.; Montenegro, G. Relation between composition, antioxidant and antibacterial activities and botanical origin of multi-floral bee pollen. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 2017.
10. Wang, S.; Yao, J.; Zhou, B.; Yang, J.; Chaudry, M.T.; Wang, M.; Xiao, F.; Li, Y.; Yin, W. Bacteriostatic Effect of Quercetin as an Antibiotic Alternative In Vivo and Its Antibacterial Mechanism In Vitro. *J. Food Prot.* 2018, *81*, 68–78.
11. Rocha, M.F.G.; Sales, J.A.; Da Rocha, M.G.; Galdino, L.M.; De Aguiar, L.; Pereira-Neto, W.d.A.; De Aguiar Cordeiro, R.; Castelo-Branco, D.d.S.C.M.; Sidrim, J.J.C.; Brilhante, R.S.N. Antifungal effects of the flavonoids kaempferol and quercetin: A possible alternative for the control of fungal biofilms. *Biofouling* 2019, *35*, 320–328.
12. Liu, M.-H.; Otsuka, N.; Noyori, K.; Shiota, S.; Ogawa, W.; Kuroda, T.; Hatano, T.; Tsuchiya, T. Synergistic effect of kaempferol glycosides purified from *Laurus nobilis* and fluoroquinolones on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol. Pharm. Bull.* 2009, *32*, 489–492.
13. Griep, M.; Blood, S.; Larson, M.; Koepsell, S.; Hinrichs, S. Myricetin inhibits *Escherichia coli* DnaB helicase but not primase. *Bioorganic Med. Chem.* 2007, *15*, 7203–7208.
14. Qian, W.; Liu, M.; Fu, Y.; Zhang, J.; Liu, W.; Li, J.; Li, X.; Li, Y.; Wang, T. Antimicrobial mechanism of luteolin against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* and its antibiofilm properties. *Microb. Pathog.* 2020, *142*, 104056.
15. Wu, D.; Kong, Y.; Han, C.; Chen, J.; Hu, L.; Jiang, H.; Shen, X. D-Alanine:D-alanine ligase as a new target for the flavonoids quercetin and apigenin. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2008, *32*, 421–426.
16. Hariri, B.M.; McMahon, D.B.; Chen, B.; Adappa, N.D.; Palmer, J.N.; Kennedy, D.W.; Lee, R.J. Plant flavones enhance antimicrobial activity of respiratory epithelial cell secretions against *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* 2017, *12*, e0185203.
17. Cushnie, T.P.T.; Hamilton, V.E.S.; Chapman, D.G.; Taylor, P.W.; Lamb, A.J. Aggregation of *Staphylococcus aureus* following treatment with the antibacterial flavonol galangin. *J. Appl. Microbiol.* 2007, *103*, 1562–1567.
18. Cushnie, T.P.T.; Lamb, A.J. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *J. Ethnopharmacol.* 2005, *101*, 243–248.
19. Borges, A.; Ferreira, C.; Saavedra, M.J.; Simões, M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microb. Drug Resist.* 2013, *19*, 256–265.

20. Collins, W.; Lowen, N.; Blake, D.J. Caffeic Acid Esters Are Effective Bactericidal Compounds Against *Paenibacillus* larvae by Altering Intracellular Oxidant and Antioxidant Levels. *Biomolecules* 2019, 9, 312.
21. Lou, Z.; Wang, H.; Rao, S.; Sun, J.; Ma, C.; Li, J. p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food Control* 2012, 25, 550–554.
22. Azonwade, F.E.; Paraíso, A.; Tossou, M.G.; Sina, H.; Kelomey, A.E.; Chabi-Sika, K.; Baba-Moussa, L. Pollen Analysis of the Honeys Samples Produced in the Three Phyto-geographical Zones of Benin. *Eur. Sci. J.* 2017, 13, 528.
23. Harrison, S.; Spasojevic, M.J.; Li, D. Climate and plant community diversity in space and time. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2020, 117, 4464–4470.
24. Georgioui, K.; Delipetrou, P. Patterns and traits of the endemic plants of Greece. *Bot. J. Linn. Soc.* 2010, 162, 130–153.
25. Sharma S, Mohler J, Mahajan SD, Schwartz SA, Bruggemann L, Aalinkeel R. Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. *Microorganisms*. 2023 Jun 19;11(6):1614. doi: 10.3390/microorganisms11061614. PMID: 37375116; PMCID: PMC10305407.
26. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Tawre MS and pardesi KR. emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. *Front Microbiol.* 2019;10(539):1–24. doi: 10.3389/fmicb.2019.00539
27. Peng Q, Tang X, Dong W, Sun N, Yuan W. A Review of Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* and Its Regulation Mechanism. *Antibiotics (Basel)*. 2022 Dec 22;12(1):12. doi: 10.3390/antibiotics12010012. PMID: 36671212; PMCID: PMC9854888
28. Gang Zhao, Zhengqing Lou, Zhiyong Zhu, Xuying Lai, Jun Li, Xiuqin Lou, Liming Huang, Qi Chen, Epidemiological and molecular evidence of foodborne poisoning outbreak caused by enterotoxin gene cluster-harboring *Staphylococcus aureus* of new sequence type 7591, *International Journal of Infectious Diseases*, Volume 135, 2023, Pages 132-135, ISSN 1201-9712, <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2023.08.005>.
29. Gedefie A, Demsis W, Ashagrie M, Kassa Y, Tesfaye M, Tilahun M, Bisetegn H, Sahle Z. *Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation and Its Role in Disease Pathogenesis: A Review. *Infect Drug Resist.* 2021 Sep 10;14:3711-3719. doi: 10.2147/IDR.S332051. PMID: 34531666; PMCID: PMC843962
30. Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 1999, 299, 152–178.
31. Hassan, S.M.; Al Aqil, A.A.; Attimarad, M. Determination of crude saponin and total flavonoids content in guar meal. *Adv. Med. Plant Res.* 2013, 1, 24–28
32. Stagos, D.; Soultisiotis, N.; Tsadila, C.; Papaeconomou, S.; Arvanitis, C.; Ntontos, A.; Karkanta, F.; Adamou-Androulaki, S.; Petrotos, K.; Spandidos, D.A.; et al. Antibacterial and antioxidant activity of different types of honey derived from Mount Olympus in Greece. *Int. J. Mol. Med.* 2018
33. Cano, A.; Acosta, M.; Arnao, M.B. A method to measure antioxidant activity in organic media: Application to lipophilic vitamins. *Redox Rep.* 2000, 5, 365–370
34. Szveda, P. Antimicrobial Activity of Honey. In *Honey Analysis*; InTech: London, UK, 2017
35. Wingfield, P. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. In *Current Protocols in Protein Science*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 1998; Volume Appendix 3, pp. A.3F.1–A.3F.8.
36. Acar Şahin, A.; Aslım, B.; Tan, S.; Alan, Ş.; Pinar, N.M. Differences in structure, allergenic protein content and pectate lyase enzyme activity of some Cupressaceae pollen. *Turk. J. Biochem.* 2018, 43, 435–446
37. Tsavea E, Tzika P, Katsivelou E, Adamopoulou A, Nikolaidis M, Amoutzias GD, Mossialos D. Impact of Mt. Olympus Honeys on Virulence Factors Implicated in Pathogenesis Exerted by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*. 2023; 12(6):998. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12060998>.
38. Fisher, E.L.; Otto, M.; Cheung, G.Y.C. Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning. *Front. Microbiol.* 2018, 9, 436.
39. Schelin, J.; Wallin-Carlquist, N.; Cohn, M.T.; Lindqvist, R.; Barker, G.C.; Rådström, P. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence* 2011, 2, 580–592

40. Mena, K.D.; Gerba, C.P. Risk assessment of *pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 2009, 201, 71–115.
41. Khalifa, S.A.M.; Elashal, M.; Kieliszek, M.; Ghazala, N.E.; Farag, M.A.; Saeed, A.; Xiao, J.; Zou, X.; Khatib, A.; Göransson, U.; et al. Recent insights into chemical and pharmacological studies of bee bread. *Trends Food Sci. Technol.* 2020, 97, 300–316.
42. Zuluaga, C.M.; Serrato, J.C.; Quicazan, M.C. Bee-pollen structure modification by physical and biotechnological processing: Influence on the availability of nutrients and bioactive compounds. *Chem. Eng. Trans.* 2015, 43, 79–84.
43. Sreeramulu, D.; Reddy, C.V.K.; Chauhan, A.; Balakrishna, N.; Raghunath, M. Natural Antioxidant Activity of Commonly Consumed Plant Foods in India: Effect of Domestic Processing. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2013, 2013, 1–12.
44. Barreira, J.C.M.; Ferreira, I.C.F.R.; Oliveira, M.B.P.P.; Pereira, J.A. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chem.* 2008, 107, 1106–1113. [Google Scholar] [
45. Turski, M.P.; Chwil, S.; Turska, M.; Chwil, M.; Kocki, T.; Rajtar, G.; Parada-Turska, J. An exceptionally high content of kynurenic acid in chestnut honey and flowers of chestnut tree. *J. Food Compos. Anal.* 2016, 48, 67–72.
46. Al-Snafi, A.E. The chemical constituents and pharmacological effects of *Capsella bursa-pastoris*—A review. *Int. J. Pharmacol. Toxicol.* 2015, 5, 76–81.
47. Boscaro, V.; Boffa, L.; Binello, A.; Amisano, G.; Fornasero, S.; Cravotto, G.; Gallicchio, M. Antiproliferative, Proapoptotic, Antioxidant and Antimicrobial Effects of *Sinapis nigra* L. and *Sinapis alba* L. Extracts. *Molecules* 2018, 23, 3004.
48. Saladino, F.; Bordin, K.; Luciano, F.B.; Franzón, M.F.; Mañes, J.; Meca, G. Antimicrobial Activity of the Glucosinolates. In *Reference Series in Phytochemistry*; Springer Science and Business Media B.V.: Dordrecht, The Netherlands, 2017; pp. 249–274.
49. Melrose, J. The Glucosinolates: A Sulphur Glucoside Family of Mustard Anti-Tumour and Antimicrobial Phytochemicals of Potential Therapeutic Application. *Biomedicines* 2019, 7, 62.
50. Dungey, S.G.; Sang, J.P.; Rothnie, N.E.; Palmer, M.V.; Burke, D.G.; Knox, R.B.; Williams, E.G.; Hilliard, E.P.; Salisbury, P.A. Glucosinolates in the pollen of rapeseed and indian mustard. *Phytochemistry* 1988, 27, 815–817.
51. Avato, P.; Argentieri, M.P. Brassicaceae: A rich source of health improving phytochemicals. *Phytochem. Rev.* 2015, 14, 1019–1033.
52. Ștefănescu, B.E.; Szabo, K.; Mocan, A.; Crisan, G. Phenolic compounds from five ericaceae species leaves and their related bioavailability and health benefits. *Molecules* 2019, 24, 2046.
53. Pełka, K.; Hafeez, A.B.; Worobo, R.W. et al. Probiotic potential of *Bacillus* Isolates from Polish Bee Pollen and Bee Bread. *Probiotics & Antimicro. Prot.* (2023). <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10157-4>
54. Tsadila, Christina, Marios Nikolaidis, Tilemachos G. Dimitriou, Ioannis Kafantaris, Grigoris D. Amoutzias, Spyros Pournaras, and Dimitris Mossialos. 2021. "Antibacterial Activity and Characterization of Bacteria Isolated from Diverse Types of Greek Honey against Nosocomial and Foodborne Pathogens" *Applied Sciences* 11, no. 13: 5801. <https://doi.org/10.3390/app11135801>
55. Kaškonienė, V.; Adaškevičiūtė, V.; Kaškonas, P.; Mickienė, R.; Maruška, A. Antimicrobial and antioxidant activities of natural and fermented bee pollen. *Food Biosci.* 2020, 34, 100532
56. Di Cagno, R.; Filannino, P.; Cantatore, V.; Gobbetti, M. Novel solid-state fermentation of bee-collected pollen emulating the natural fermentation process of bee bread. *Food Microbiol.* 2019, 82, 218–230.
57. Gilliam, M. Microbiology of pollen and bee bread: The genus *Bacillus*. *Apidologie* 1979, 10, 269–274.
58. Pełka K, Worobo RW, Walkusz J, Szweda P. Bee Pollen and Bee Bread as a Source of Bacteria Producing Antimicrobials. *Antibiotics (Basel)*. 2021 Jun 13;10(6):713. doi: 10.3390/antibiotics10060713. PMID: 34199247; PMCID: PMC8231920.
59. Dan Aurell, Selina Bruckner, Mikayla Wilson, Nathalie Steinhauer & Geoffrey R. Williams (2023) A national survey of managed honey bee colony losses in the USA: Results from the Bee Informed Partnership for 2020–21 and 2021–22, *Journal of Apicultural Research*, DOI: 10.1080/00218839.2023.2264601

60. Nearman, A., vanEngelsdorp, D. Water provisioning increases caged worker bee lifespan and caged worker bees are living half as long as observed 50 years ago. *Sci Rep* 12, 18660 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21401-2>
61. Hatjina, F., Papaefthimiou, C., Charistos, L. et al. Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. *Apidologie* 44, 467–480 (2013). <https://doi.org/10.1007/s13592-013-0199-4>
62. Mohamed Abd El-Moezz Mahbob, Rania-Qurashy Sayed, Adham Moustafa, and Mohamed Fathallah Abdel-Rahman. Fermented pollen substitute diet affects the lifespan of honey bee workers under the effect of food consumption rate and vitellogenin expression, *J. Multidiscip. Sci.* 2021, 3(1), 39-49. <https://doi.org/10.33888/jms.2021.315>



Φωτογραφία 8. Ηλεκτρονική μικρογραφία μιας λεπτής τομής πολυάριθμων, σφαιρικών ιικών σωματιδίων του Εντεροϊού EV-D68 Credit: Cynthia S. Goldsmith and Yiting Zhang, CDC - <https://www.cdc.gov/non-polio-enterovirus/resources-ev68-photos.html>, Πηγή: Wikimedia Commons

B.3. ANTI-ΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ ΤΗΣ ΓΥΡΗΣ ΤΩΝ ΜΕΛΙΣΣΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΤΑ ΖΥΜΩΜΕΝΗΣ ΓΥΡΗΣ

B.3.1. ANTI-ΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΓΥΡΗΣ ΤΩΝ ΜΕΛΙΣΣΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΪΟΥ EV D68.

B.3.1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μελέτες γύρω από την αντιμικροβιακή δράση του ΜΨ είναι ελάχιστες συγκριτικά με άλλα μελισσοκομικά προϊόντα όπως το μέλι [1]. Λίγες μελέτες έχουν καταδείξει την αντιμικροβιακή δράση του ΜΨ έναντι βακτηριακών παθογόνων και μυκήτων [2,3,4]. Ωστόσο, η αντι-ική δράση του ΜΨ και της ΓΜ πριν από παρούσα μελέτη δεν είχε διερευνηθεί καθόλου. Οι Lee et al. έχουν μελετήσει την αντι-ική δράση ορισμένων ενώσεων που προέρχονται από την γύρη της Κορεάτικης παπαρούνας (*Paraver rhoeas*) κατά του ιού της γρίπης Α [5]. Οι αντι-ικές ιδιότητες άλλων προϊόντων μέλισσας (μέλι, βασιλικός πολτός, πρόπολη και δηλητήριο μέλισσας) έχουν μελετηθεί περισσότερο [6,7,8,9,10,11] και μάλιστα δοκιμάστηκαν πρόσφατα κατά του SARS-CoV-2 [12,13,14,15,16].

Ο εντεροϊός D68 (EV-D68) ανήκει στο γένος *Enterovirus* της οικογένειας Picornaviridae που έχει χαρακτηριστικά τόσο του είδους *Enterovirus* (EV) όσο και του *Rhinovirus* (RV). Το γονιδίωμα του αποτελείται από ένα μονόκλωνο θετικού προσανατολισμού RNA 7.500nt (+ssRNA). Ο EV-D68 απομονώθηκε για πρώτη φορά και αναγνωρίστηκε το 1962 [16]. Έκτοτε, οι αναφορές απομόνωσης του EV68 ήταν πολύ σπάνιες μέχρι το 2014, όταν αναφέρθηκε στις ΗΠΑ σοβαρή αναπνευστική νόσος που συσχετίστηκε με πανεθνική έξαρση (outbreak) του EV-D68 [17]. Οι περισσότεροι από τους μολυσμένους ασθενείς ήταν παιδιά και οι κλινικές εκδηλώσεις κυμαίνονταν από ήπια έως σοβαρά αναπνευστικά συμπτώματα. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έχουν ενοχοποιήσει τον EV-D68 για την εκδήλωση οξείας χαλαρής μυελίτιδας (AFM) [18,19,20]. Κατά του EV-D68 δεν υπάρχουν εγκεκριμένα σκευάσματα για την πρόληψη ή την αντιμετώπισή του [21]. Έχουν αναπτυχθεί φάρμακα που στοχεύουν πικροναϊούς και εντεροϊούς, αλλά κανένα από αυτά δεν έχει δείξει δράση έναντι του EV-D68 σε κλινικά αποδεκτές συγκεντρώσεις [22].

Σε αυτή τη μελέτη, 18 δείγματα ελληνικού ΜΨ και 2 δείγματα ΓΜ, από διαφορετικές βοτανικές πηγές, αξιολογήθηκαν *in vitro* για την αντι-ική τους δράση έναντι του EV-D68.

B.3.1.2. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ (ΜΨ) ΚΑΙ ΓΥΡΗΣ (ΓΜ), ΣΤΕΛΕΧΟΣ ΙΟΥ ΚΑΙ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗ

Συνολικά δοκιμάστηκαν 18 δείγματα ΜΨ και 2 δείγματα ΓΜ που συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Σε κάθε δείγμα δόθηκε ένας μοναδικός αριθμός αναφοράς και καταγράφηκαν λεπτομέρειες σχετικά με τη βοτανική πηγή και τη γεωγραφική κατανομή (Πίνακες 3, 4, 17). Τα δείγματα ΜΨ συλλέχθηκαν απευθείας από κηρήθρες και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους -20°C. Κάθε ένα από τα δείγματα ΜΨ και ΓΜ διαλύθηκε σε μέσο κυτταρικής καλλιέργειας Dulbecco's Modified Eagle (D-MEM, LM-D1113, Biosera, France) για μία ώρα (1 ώρα) σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκεντρήθηκε για 10 min σε 10.000 rcf και στη συνέχεια το υγρό κλάσμα διηθήθηκε μέσω φίλτρου σύριγγας Branchia 0,22μm (Labbox Labware, S.L., Βαρκελώνη, Ισπανία). Το φιλτραρισμένο εναιώρημα ΜΨ και ΓΜ και οι διαδοχικές τους αραιώσεις (σε D-MEM) χρησιμοποιήθηκαν για τις αναλύσεις.

Ο εντεροϊός D-68, στέλεχος Fermon (California/62) (RIVM, Ολλανδία), εμβολιάστηκε σε κύτταρα ραβδομυοσάρκωματος (Rd) (κυτταρική σειρά ανθρώπινου ραβδομυοσάρκωματος - CCLTM, ATTC) αρχικά τιτλοποιήθηκε υπολογίζοντας το TCID₅₀ [23] και στη συνέχεια αραιώθηκε διαδοχικά προκειμένου να ληφθεί τίτλος ιού 10² TCID₅₀/0,1 ml.

ΠΑΛΥΝΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Παλυνολογική ανάλυση των 18 δειγμάτων ΜΨ και 2 ΓΜ για τον χαρακτηρισμό της βοτανικής προέλευσης διενεργήθηκε από τα εργαστήρια CheMa (Κόρινθος, Ελλάδα) όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφ Β1 της παρούσας διατριβής). Τα αποτελέσματα της παλυνολογικής ανάλυσης των δειγμάτων ΜΨ 1-18 περιέχονται στον πίνακα 4 του Κεφαλαίου Β1. Τα αποτελέσματα της παλυνολογικής ανάλυσης των δειγμάτων της ΓΜ περιγράφονται στον πίνακα 17 του παρόντος κεφαλαίου.

Πίνακας 17. Παλυνολογική ανάλυση και βοτανική προέλευση των δειγμάτων ΓΜ

		ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΜ	
		19	20
ΠΕΡΙΟΔΟΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ		ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ 2019	ΑΝΟΙΞΗ 2019
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΣ ΓΥΡΕΟΚΟΚΚΩΝ	Amaranthaceae	17.7	
	Araliaceae	57.9	
	Asteraceae		0.2
	Boraginaceae	4.3	
	Brassicaceae		7.1
	Cistaceae	0.5	
	Cupressaceae	3.6	
	Fabaceae	4.9	19.9
	Guttiferae		27.5
	Oleaceae		2.2
	Rosaceae	9.5	15.8
	Saliaceae		24.4
	Scrophulariaceae		1.2
	Άγνωστο	1.3	1.6
	Zygophyllaceae	0.3	

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ 3-(4,5-ΔΙΜΕΘΥΛΘΕΙΑΖΟΛ-2-ΥΛ)-2,5-ΒΡΩΜΙΟΥΧΟΥ ΔΙΦΑΙΝΥΛΤΕΤΡΑΖΟΛΙΟΥ (MTT)

Προκειμένου να αξιολογηθεί η κυτταροτοξικότητα των δειγμάτων ΜΨ και ΓΜ έναντι των κυττάρων Rd, χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική δοκιμή MTT [24]. Τα κύτταρα Rd σε θρεπτικό μέσο D-MEM με προσθήκη 2% εμβρυϊκού βόειου ορού (FB-1001, Biosera) καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 96 φρεατίων (Biologix Europe, Γερμανία). Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C σχηματίζοντας έτσι μια μονοστιβάδα. Κατόπιν το μέσο αφαιρέθηκε και 100 μl από κάθε αραιώση δείγματος (από διαδοχικές αραιώσεις σε D-MEM) προστέθηκαν στην πλάκα των 96 φρεατίων εις τριπλούν. Οι τελικές συγκεντρώσεις των ελεγχμένων δειγμάτων ΜΨ και ΓΜ κυμαίνονταν από 16 έως 0,0625 mg/ml. Αρνητικός μάρτυρας που περιείχε μόνο κύτταρα Rd χρησιμοποιήθηκε εις τριπλούν.

Η πλάκα επώαστηκε στους 37°C για 24 ώρες. Μετά την επώαση 10 μl MTT (τελική συγκέντρωση 0,5 mg/ml) προστέθηκαν σε κάθε φρεάτιο. Η πλάκα επώαστηκε στους 37°C για 1 ώρα και προστέθηκαν 100 μl διαλύτη MTT (10% SDS και 0,01 M HCl) για τη διαλυτοποίηση των κρυστάλλων φορμαζίνης. Το αποτέλεσμα κυτταροτοξικότητας εκτιμήθηκε φασματοφωτομετρικά στα 570 nm.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ANTI-ΙΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Προκειμένου να αξιολογηθεί η αντι-ϊική δράση των δειγμάτων ΜΨ και ΓΜ έναντι του EV-D68, εφαρμόστηκε μια δοκιμασία κυτταροκαλλιέργειας. Τα κύτταρα Rd σε D-MEM συμπληρωμένο με 2% εμβρυϊκό βόειο ορό (FB-1001, Biosera) καλλιιεργήθηκαν σε πλάκες 96 φρεατίων (Biologix Europe, Γερμανία). Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C σχηματίζοντας έτσι μια μονοστιβάδα. Μετά από αυτό, το μέσο αφαιρέθηκε και 200 μl από κάθε αραιώση ΜΨ ή ΓΜ σε μέσο D-MEM που περιείχε 100 μl τιτλοδοτημένου ιού EV-D68 προστέθηκαν στην πλάκα των 96 φρεατίων εις τριπλούν. Οι τελικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων ΜΨ και ΓΜ κυμαίνονταν από 16 έως 0,0625 mg/ml. Η πλάκα επώαστηκε στους 37°C και εξετάζονταν καθημερινά για την εμφάνιση κυτταροπαθητικής δράσης (CPE) από τη μόλυνση των κυττάρων με τον ιό. Αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν χωρίς προσθήκη ιού (περιείχαν δείγματα ΜΨ ή ΓΜ) προκειμένου να διαφοροποιηθεί η CPE λόγω της δραστηριότητας του ιού ή της τοξικότητας που ασκείται από το ίδιο το δείγμα. Κάθε συγκέντρωση δοκιμάστηκε εις τριπλούν. Για να θεωρηθεί έγκυρη η δοκιμή ο αρνητικός μάρτυρας έπρεπε να εμφανίζει μια άθικτη μονοστιβάδα κυττάρων Rd. Ένας θετικός μάρτυρας που περιείχε κύτταρα Rd και τον ιό EV-D68 χρησιμοποιήθηκε για τον θετικό έλεγχο εις τριπλούν. Όταν παρατηρήθηκε 100% CPE στον θετικό μάρτυρα, τότε η επώαση ολοκληρώθηκε και οι πλάκες των 96 φρεατίων αποθηκεύτηκαν στους -20°C για περαιτέρω ανάλυση.

ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA ΚΑΙ ANΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

Για κάθε δείγμα ΜΨ/ΓΜ λήφθηκαν από τις πλάκες των 96 φρεατίων που είχαν αποθηκευτεί στους -20° C οι αραιώσεις που εμφάνιζαν μετά το μικροσκοπικό έλεγχο, καταστροφή του 50% των κυττάρων Rd. Επίσης ελήφθησαν και η προηγούμενη όπως και η επόμενη αραιώση ξεχωριστά. Κάθε αραιώση δοκιμάστηκε εις τριπλούν. Η εκχύλιση RNA για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Casas et al [25] με βάση τον χασοτροπικό παράγοντα θειοκυανική γουανιδίνη. Συγκεκριμένα 100μl δείγματος με προσθήκη 10μl γλυκογόνου (5 mg/ml) και 300μl lysis buffer [GuSCN 4 M, N-lauroyl sarcosine 0,5%, διθειοθρεϊτόλη (DTT) 1 mM, κιτρικό τρινάτριο 25 mM] επώαστηκαν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου μετά από έντονη ανάδευση. Η καθίζηση του DNA έλαβε χώρα χρησιμοποιώντας ίσο όγκο ψυχρής ισοπροπυλικής αλκοόλης με παραμονή 20 λεπτά στους -20° C. Το ίζημα λήφθηκε μετά από φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 10.000 rcf. Κατόπιν αυτό επαναδιαλύθηκε σε 500μl 70% αιθανόλη και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά σε 10.000 rcf. Το ίζημα που προέκυψε αφέθηκε να στεγνώσει και διαλύθηκε σε 100 μl αποστειρωμένου νερού διπλής απόσταξης ελεύθερο DNase-RNase (DEMO S.A, Αθήνα, Ελλάδα). Τα εκχυλίσματα του RNA αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Προκειμένου να ανιχνευθούν στα δείγματά μας τα ιικά αντίγραφα μέσω PCR πραγματικού χρόνου, πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή στο ιικό γονιδίωμα ssRNA του EV-D68, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές EV2 (5'-CCCCTGAATGCGGCTAATC-3'), EV1 (5'-GATTGTCACCATAAGCAGC-3') (Macrogen, Νότια Κορέα) και FastGene Scriptase II cDNA Kit (Nippon Genetics, Ιαπωνία) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Το cDNA που συντέθηκε αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι περαιτέρω χρήση.

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ

Η αντι-ικική δράση των δειγμάτων αξιολογήθηκε με τη χρήση συγκριτικής PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR, RT-PCR). Υπολογίστηκε η σχετική συγκέντρωση των ιικών αντιγράφων σε κυτταροκαλλιέργειες που περιέχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις ΜΨ/ΓΜ σε σύγκριση με τη συγκέντρωση των ιικών αντιγράφων που ανιχνεύθηκε στον θετικό μάρτυρα. Τρία μικρολίτρα cDNA προστέθηκαν σε ένα σωληνάριο 0,2 ml που περιείχε 1X FastGene Mix (Nippon Genetics, Japan), 50nM ROX Low, 10 pmoI από κάθε παγκόσμιο εκκινητή εντεροϊού που στοχεύει την περιοχή 5'-UTR EV2 (5'-CCCCTGAATGCGGCTAATC-3'), EV1 (5'-GATTGTACCATAAGCAGC-3') [26] και ddH₂O έως 20μl. Η Συγκριτική PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Eco48 (PCRMax) με το ακόλουθο πρωτόκολλο: 95°C για 2 λεπτά, 40 κύκλοι στους 95°C για 5 δευτερόλεπτα και 30 δευτερόλεπτα στους 60°C ακολουθούμενο από βήμα ανάλυσης καμπύλης τήξης. Οι τιμές κατωφλίου κύκλου (Ct) χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της σχετικής συγκέντρωσης ως εξής: Σχετική συγκέντρωση = $1 - 2^{\Delta Ct}$ (Ct θετικού μάρτυρα - Ct δείγματος) και σύμφωνα με το EcoStudy (PCRMax).

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ CC₅₀, IC₅₀ ΚΑΙ SI

Η συγκέντρωση κυτταροτοξικότητας 50% (CC₅₀) ορίζεται ως η συγκέντρωση μιας ουσίας που θα σκοτώσει τα μισά κύτταρα σε μια μη μολυσμένη κυτταρική καλλιέργεια [27]. Η κυτταροτοξικότητα του ΜΨ και της ΓΜ υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία MTT[24]. Η μισή μέγιστη συγκέντρωση αναστολής (IC₅₀) είναι ένα μέτρο της ισχύος μιας ουσίας όσον αφορά την αναστολή μιας συγκεκριμένης βιολογικής ή βιοχημικής λειτουργίας [27]. Στη μελέτη μας, ο δείκτης IC₅₀ χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της αντι-ικικής ισχύος των δειγμάτων ΜΨ και ΓΜ έναντι του EV-D68. Πιο συγκεκριμένα, η τιμή IC₅₀ εκφράζει τη συγκέντρωση κάθε δείγματος ΜΨ που αντιστοιχεί σε μείωση 50% του τίτλου του ιού και υπολογίζεται μέσω των αποτελεσμάτων PCR πραγματικού χρόνου. Τέλος, ο Δείκτης Επιλεκτικότητας (SI) είναι μια αναλογία που μετρά το παράθυρο μεταξύ της κυτταροτοξικότητας και της αντι-ικικής δράσης διαιρώντας την τιμή CC₅₀ κάθε δείγματος με την τιμή IC₅₀ αυτού του δείγματος (CC₅₀/IC₅₀)[28].

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η ανάλυση συσχέτισης διεξήχθη χρησιμοποιώντας την ανάλυση συσχέτισης Spearman. Οι τιμές $p < 0,05$ θεωρήθηκαν ότι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο SPSS έκδοσης 13.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

B.3.1.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με τη χρήση της δοκιμασίας MTT προσδιορίστηκαν τα επίπεδα τοξικότητας των δειγμάτων του ΜΨ και της ΓΜ σε κύτταρα Rd. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2, τα επίπεδα τοξικότητας που εκφράζονται ως τιμές CC₅₀ κυμαίνονται από 0,17 έως 10,19 mg/ml, υποδεικνύοντας ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις ΜΨ και ΓΜ είναι επιβλαβείς για τα κύτταρα Rd. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της συγκριτικής ποσοτικής ανάλυσης PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) για την παρακολούθηση του αριθμού αντιγράφων του ιού παρουσία των δειγμάτων. Υποθέσαμε ότι, η ασκούμενη αντιική δράση των δειγμάτων ΜΨ και ΓΜ θα πρέπει να οδηγήσει σε μείωση του αριθμού αντιγράφων του γονιδιώματος EV-D68 μετά από ταυτόχρονο εμβολιασμό ιού και δειγμάτων σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα όπου ο ιός προστέθηκε στην κυτταροκαλλιέργεια χωρίς την προσθήκη δείγματος. Αυτή η ανάλυση στοχεύει την εξαιρετικά συντηρημένη περιοχή 5'UTR, μια περιοχή που χρησιμοποιείται ευρέως για τη μοριακή ανίχνευση εντεροϊών [26].

Η χρήση της συγκριτικής ανάλυσης PCR πραγματικού χρόνου έδειξε έναν μειούμενο αριθμό αντιγράφων του EV-D68 όταν ο ιός συνενοφθαλμίζεται με δείγματα ΜΨ ή ΓΜ στην κυτταρική καλλιέργεια. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι όλα τα δείγματα του ΜΨ και της ΓΜ ασκούν αντι-ική δράση με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση. Η αντι-ική δράση εκφράζεται με το δείκτη IC_{50} (Πίνακας 18) με τιμές που κυμαίνονται από 0,048 έως 5,45 mg/ml. Οι τιμές IC_{50} είναι πολύ μεταβλητές (πάνω από 100 φορές) υποδηλώνοντας ότι η αντι-ική δράση θα μπορούσε να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη βοτανική πηγή και τη γεωγραφική θέση κάτι που έχει παρατηρηθεί και για το μέλι όσον αφορά την αντιβακτηριακή του δράση[29].

Πίνακας 18. Γεωγραφική προέλευση, βοτανική προέλευση και αντιικό προφίλ (τιμές CC_{50} , IC_{50} και SI) δειγμάτων ΜΨ και ΓΜ

Δείγμα	Περιοχή	Βοτανική προέλευση	(mg/ml)		SI	
			CC ₅₀	IC ₅₀		
ΜΕΛΙΣΣΟΥΨΩΜΟ	1	Λάρισα	Πολυανθικό	4,73 ± 0,02	0,048	98,542
	2	Θεσσαλία	Πολυανθικό	2,32 ± 0,17	0,31	7,484
	3	Πήλιο	Πολυανθικό	0,23 ± 0,4	0,42	0,548
	4	Λάρισα	Πολυανθικό	8,60 ± 0,04	0,11	78,182
	5	Πήλιο	<i>Hedera</i> sp	6,83 ± 0,09	0,33	20,697
	6	Θεσσαλία	Πολυανθικό	0,17 ± 0,03	0,53	0,321
	7	Ηράκλειο	Πολυανθικό	1,28 ± 0.06	0,052	24,615
	8	Κοζάνη	Πολυανθικό	0,63 ± 0.02	0,091	6,923
	9	Ρέθυμνο	Πολυανθικό	0,31 ± 0,02	0,2	1,550
	10	Άρτα	Πολυανθικό	5,25 ± 0,07	1,003	5,234
	11	Χανιά	Πολυανθικό	3,78 ± 0.02	0,182	20,769
	12	Λάρισα	Πολυανθικό	1,03 ± 0.05	0,28	3,679
	13	Λάρισα	<i>Cistus</i> sp	0,52 ± 0.02	0,087	5,977
	14	Λασιίθι	Πολυανθικό	3,87 ± 0.04	0,5	7,740
	15	Εύβοια	Πολυανθικό	4,15 ± 0.06	0,58	7,155
	16	Πελοπόννησος	Πολυανθικό	7,56 ± 0,02	0,13	58,154
	17	Χαλκιδική	Πολυανθικό	8,03 ± 0,01	0,34	23,618
	18	Άθως	<i>Castanea sativa</i>	0,32 ± 0,05	5,45	0,059
ΓΜ	19	Πήλιο	<i>Hedera</i> sp	4,85 ± 0,01	0,91	5,330
	20	Θεσσαλία	Πολυανθικό	10,19±0,02	0,27	37,741

Οι τιμές του δείκτη επιλεκτικότητας (SI) έχουν υπολογιστεί για κάθε δείγμα, λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές CC_{50} και IC_{50} . Όσο υψηλότερη είναι η αναλογία SI, τόσο πιο αποτελεσματική και ασφαλέστερη είναι μια ουσία[28].

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 18, οι τιμές SI χαρακτηρίζονται από εξαιρετικά μεγάλη παραλλακτικότητα (1.670 φορές) και κυμαίνονται από 0.059 έως 98.542. Τρία (δείγματα 3, 6 και 18) από τα είκοσι δείγματα (15%) έδειξαν τιμή SI χαμηλότερη από 1, που σημαίνει ότι η ικκή αναστολή παρατηρείται σε συγκεντρώσεις που είναι τοξικές για τα κύτταρα Rd. Τα άλλα 17 δείγματα (85%) έδειξαν τιμή SI υψηλότερη από 1 που σημαίνει ότι η ικκή αναστολή παρατηρείται σε συγκεντρώσεις που δεν είναι τοξικές. Είναι ενδιαφέρον ότι 8 δείγματα (40%) έδειξαν τιμές SI υψηλότερες από 20 (No 1>4>16>20>7>17>11>5), που σημαίνει ότι η συγκέντρωση IC₅₀ είναι περισσότερο από 20 φορές μικρότερη από την αντίστοιχη συγκέντρωση CC₅₀, ένδειξη ισχυρής αντι-ικκής δράσης.

Η ΓΜ ζυμώνεται σε ΜΨ μέσω μιας διαδικασίας που περιλαμβάνει τις μέλισσες, τα φυτά και το μικροβίωμα. Κάθε ένας από αυτούς τους παράγοντες μπορεί να είναι πηγή αντι-ικκών ενώσεων όπως φυτοχημικών [1,30], εκκρίσεων μελισσών [12] και δευτερογενών μεταβολιτών [31,32] που πιθανώς συμβάλλουν στην αντι-ικκή δράση.

Προκειμένου να διαλευκανθεί ο ρόλος των φυτών ελήφθη υπόψη η βοτανική προέλευση των δειγμάτων. Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση προκειμένου να αξιολογηθεί η συσχέτιση μεταξύ των τιμών CC₅₀, IC₅₀ και SI και των κύριων οικογενειών γύρης που υπάρχουν σε κάθε δείγμα ΜΨ και ΓΜ. Συμπεριλήφθηκαν μόνο οι κυρίαρχες (> 10%) οικογένειες. Επιπλέον, οικογένειες που ήταν παρούσες σε λιγότερα από τρία δείγματα αποκλείστηκαν από περαιτέρω ανάλυση.

Παρατηρήθηκε αρνητική ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των τιμών IC₅₀ και της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε γύρη Brassicaceae ($r=0,90$, $p<0,05$). Αυτή η συσχέτιση δείχνει ότι πιθανώς ουσίες από τη γύρη της οικογένειας Brassicaceae παρουσιάζουν αντι-ικκή δράση και υπάρχει ανάγκη περαιτέρω έρευνας για αυτήν την υπόθεση. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε ισχυρά θετική και στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των τιμών CC₅₀ και της περιεκτικότητας σε κάποιο είδος γύρης. Είναι ενδιαφέρον ότι μια ισχυρή θετική συσχέτιση ($r=0,90$, $p<0,05$) παρατηρήθηκε μεταξύ της περιεκτικότητας σε γύρη από φυτά της οικογένειας Rosaceae και των τιμών SI (Πίνακας 19)

Η οικογένεια Brassicaceae γνωστή και ως οικογένεια της μουστάρδας, περιλαμβάνει φυτά που χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή ιατρική όπως το *Sinapis nigra* και το *Sinapis alba* καθώς και καλλιεργούμενα φυτά με υψηλή αντιοξειδωτική δράση όπως το λάχανο, το μπρόκολο και το κουνουπίδι [2]. Από την άλλη πλευρά, η οικογένεια Rosaceae περιλαμβάνει πολλά σπωροφόρα φυτά. Μελλοντική έρευνα θα αποκαλύψει εάν η γύρη ορισμένων ειδών Brassicaceae και Rosaceae μπορεί να περιέχει ισχυρές αντι-ικκές ενώσεις.

Πίνακας 19. Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης (r) υπολογίστηκαν από τη συσχέτιση των τιμών CC₅₀, IC₅₀ και SI με τα τα ποσοστά συμμετοχής των κυρίαρχων φυτικών οικογενειών που ανιχνεύθηκαν από την παλυνολογική ανάλυση σε κάθε δείγμα.

Οικογένειες Γυρεόκοκκων	IC ₅₀	CC ₅₀	SI
Araliaceae	1,000**	0,500	-0,500
Boraginaceae	0,500	-1,000**	-0,500
Brasicaceae	-0,900*	0,600	0,600
Cistaceae	-0.400	0,200	0.400
Ericaceae	1,000**	0,500	-0,500
Fabaceae	0,095	0,238	0,048
Fagaceae	0,200	-0,800	-0,200
Guttiferae	0,600	0,429	0,200
Rosaceae	-0,300	0,300	0,900*
Saliacea	0,500	-0,500	-0,500

*Η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική με $p<0,05$,

**Η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική με $p<0,01$

B.3.2. ΑΝΤΙ-ΙΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ, ΤΗΣ ΓΥΡΗΣ ΤΩΝ ΜΕΛΙΣΣΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΤΑ ΖΥΜΩΜΕΝΗΣ ΓΥΡΗΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ Α Η1Ν1.

B.3.2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ιός της γρίπης Α (ΙΑV), εκτός από τον άνθρωπο, προσβάλλει διάφορα πτηνά και κατοικίδια θηλαστικά. Η εξάπλωση των εποχιακών στελεχών της γρίπης θεωρείται σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας, ιδιαίτερα όσον αφορά τους μεγάλους σε ηλικία ανθρώπους τους ανοσοκατεσταλμένους ή αυτούς που έχουν σοβαρά χρόνια νοσήματα [33].

Το γονιδίωμα του ΙΑV περιλαμβάνει οκτώ γονιδιακά τμήματα μονόκλωνου RNA αρνητικού προσανατολισμού. Τα ισωμάτια ΙΑV έχουν προσεκβολές (ακίδες) στην εξωτερική τους επιφάνεια (δομές που μοιάζουν με αυτές του SARS-CoV-2), οι οποίες αποτελούνται από δύο επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες: αιμοσυγκολλητίνη (ΗΑ) και νευραμινιδάση (ΝΑ). Η υψηλή αντιγονική μεταβλητότητα αυτών των επιφανειακών γλυκοπρωτεϊνών ταξινομεί τα μέλη του ΙΑV σε 18 υποτύπους ΗΑ και 11 ΝΑ [33].

Εμβόλια και αντι-ιικά φάρμακα (αναστολείς διαύλων ιόντων Μ2, αναστολείς νευραμινιδάσης και πολυμεράσης) χρησιμοποιούνται για την πρόληψη και τη θεραπεία της γρίπης. Ωστόσο, η ιική αντίσταση που αναπτύσσεται στα εγκεκριμένα αντι-ιικά φάρμακα αλλά και στην αποτελεσματικότητα των εμβολίων έχει καταστήσει με τα χρόνια όλο πιο δυσχερή την αντιμετώπιση της γρίπης και έχει κάνει πιο επιτακτική την ανάγκη για νέες αντι-ιικές ουσίες για την καταπολέμησή της [34,35]. Οι ιοί της γρίπης εξελίσσονται γρήγορα και προκύπτουν νέα επιδημικά ή πανδημικά ξεσπάσματα, με πιο πρόσφατο αυτό του 2009 από τον Η1Ν1. Ήδη τα πρώτα αντι-ιικά φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν για την αντιμετώπιση της γρίπης όπως οι αδαμαντάνες (Amanadine, Rimantadine) είναι πλέον αναποτελεσματικά. Ο ιός έχει αρχίσει να εμφανίζει αντίσταση και σε νεότερα αντι-ιικά φάρμακα όπως οι αναστολείς της νευραμινιδάσης. Οι συνεχείς αντιγονικές μεταβολές του ιού ειδικότερα στις επιφανειακές του γλυκοπρωτεΐνες τον προφυλάσσουν από τις αντιδράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή [35]. Η ανεύρεση νέων προϊόντων που εκδηλώνουν αντι-ιική δραστηριότητα έναντι του ιού της γρίπης Η1Ν1 θα μπορούσε μελλοντικά να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων αντι-ιικών ουσιών με στόχο την θεραπευτική αξιοποίησή τους.

Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να αναλύσει το χημικό προφίλ των δειγμάτων ΜΨ και ΓΜ που συλλέχθηκαν από μελισσοκομεία στην Ελλάδα καθώς και να εκτιμήσει *in vitro* την αντι-ιική δράση που ασκείται από μη επεξεργασμένα δείγματα ΜΨ, ΓΜ, από κλάσματα αυτών (πρωτεϊνικό, η-βουτανολικό) και από αντίστοιχα δείγματα τεχνητά ζυμωμένης ΓΜ κατά του ΙΑV (Η1Ν1).

B.3.2.2. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Σε αυτή τη μελέτη, δύο δείγματα ΓΜ και δύο δείγματα ΜΨ υποβλήθηκαν σε περαιτέρω επεξεργασία, όπως περιγράφεται παρακάτω, και πρόεκυψαν συνολικά 19 δείγματα που δοκιμάστηκαν (Πίνακας 20).

Κάθε δείγμα ΜΨ και ΓΜ διαλύθηκε αρχικά σε Minimum Essential Medium (MEM) μέσο κυτταρικής καλλιέργειας Earle's Balanced Salts (MEM, LM-E1144, Biosera, Γαλλία) για μία ώρα (1 ώρα) σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στα 10.000 × g και στη συνέχεια, το υπερκείμενο διηθήθηκε μέσω ενός φίλτρου σύριγγας Branchia 0,22 μm (Labbox Labware, S.L., Βαρκελώνη, Ισπανία). Τα φιλτραρισμένα ελαιώδη ΜΨ και ΓΜ αραιώθηκαν διαδοχικά και χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή ΜΤΤ και τις αντι-ιικές δοκιμές που περιγράφονται παρακάτω.

Πίνακας 20. Περιγραφή των δειγμάτων που δοκιμάστηκαν ενάντια στον ιό IAV H1N1

ΔΕΙΓΜΑ	ΕΙΔΟΣ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ
AF1	Γύρη μελισσών	Πολυανθική Θεσσαλία, Ελλάδα, Άνοιξη 2022
AF4	Τεχνητά ζυμωμένη AF1 ΓΜ	
AF5	Τεχνητά ζυμωμένη AF1 ΓΜ	
AF17	Τεχνητά ζυμωμένη AF1 ΓΜ	
AF1-P	Γύρη μελισσών	Πρωτεϊνικό κλάσμα του AF1
AF4-P	Κλάσμα τεχνητά ζυμωμένης ΓΜ	Πρωτεϊνικό κλάσμα του AF4
AF5-P	Κλάσμα τεχνητά ζυμωμένης ΓΜ	Πρωτεϊνικό κλάσμα του AF5
AF17-P	Κλάσμα τεχνητά ζυμωμένης ΓΜ	Πρωτεϊνικό κλάσμα του AF17
1-BB	ΜΨ	Πολυανθικό Θεσσαλία, Ελλάδα, Άνοιξη 2019
4-BB	ΜΨ	Πολυανθικό Θεσσαλία, Ελλάδα, Άνοιξη 2019
6P-BCP	Γύρη μελισσών	Πολυανθική Θεσσαλία, Ελλάδα, Άνοιξη 2019
1-BB-P	Κλάσμα ΜΨ	Πρωτεϊνικό κλάσμα του 1-BB
4-BB-P	Κλάσμα ΜΨ	Πρωτεϊνικό κλάσμα του 4-BB
6P-BCP-P	Κλάσμα γύρης μελισσών	Πρωτεϊνικό κλάσμα του 6-BCP
1-BB-Bu	Κλάσμα ΜΨ	Βουτανολικό κλάσμα του 1-BB
4-BB-Bu	Κλάσμα ΜΨ	Βουτανολικό κλάσμα του 4-BB
6P-BCP-Bu	Κλάσμα γύρης μελισσών	Βουτανολικό κλάσμα του 6-BCP
4-BB-H	Κλάσμα ΜΨ	Υδατικό κλάσμα του 4-BB
6P-BCP-H	Κλάσμα γύρης μελισσών	Υδατικό κλάσμα του 6-BCP

Σε μια προηγούμενη μελέτη που διεξήχθη στο εργαστήριό μας σχετικά με τις βιολογικές ιδιότητες του ελληνικού ΜΨ [1], (Κεφ. Β.1 της παρούσας διατριβής) πραγματοποιήθηκε παλυνολογική ανάλυση 18 δειγμάτων ΜΨ. Τα δείγματα 1-BB και 4-BB αντιστοιχούν στα δείγματα 1 και 4, των οποίων η λεπτομερής βοτανική σύνθεση έχει παρουσιαστεί στο συγκεκριμένο κεφάλαιο (Κεφ. Β.1, Πίνακας 4). Παλυνολογική ανάλυση έχει επίσης δημοσιευτεί για το δείγμα 6P-BCP, το οποίο δοκιμάστηκε σε προηγούμενη μελέτη που διεξήχθη στο εργαστήριό μας σχετικά με την *in vitro* αντι-ιική δράση της ελληνικής ΓΜ και του ΜΨ έναντι του Enterovirus D68 [36]. Η παλυνολογική ανάλυση του δείγματος 6P-BCP το οποίο είναι το ίδιο με το δείγμα 20-ΓΜ περιγράφεται στον πίνακα 1, του κεφαλαίου Β.3.1 της παρούσας διατριβής. Για το δείγμα AF1, δεν έγινε παλυνολογική ανάλυση αλλά ο μελισσοκόμος μας παρείχε πληροφορίες για τις κύριες οικογένειες ανθισμένων φυτών στην περιοχή κατά τη συλλογή της ΓΜ. Σύμφωνα με αυτές τις πληροφορίες, οι κυρίαρχες οικογένειες φυτών ήταν οι Brassicaceae, Ranunculaceae, Papaveraceae και Cistaceae. Η παλυνολογική ανάλυση διενεργήθηκε από τα εργαστήρια CheMa (Κόρινθος, Ελλάδα) όπως περιγράφηκε προηγουμένως [1].

Βακτήρια και ζυμομύκητες απομονώθηκαν από ένα φρέσκο δείγμα πολυανθικού ΜΨ που συλλέχθηκε από δικό μας μελισσοκομείο τοποθετημένο στο Πήλιο (Θεσσαλία, Ελλάδα, Φθινόπωρο 2021). Τα βακτήρια αναπτύχθηκαν σε στερεά θρεπτικά μέσα με σπορά 100 μl διαφορετικών αραιώσεων ΜΨ (10^{-1} , 10^{-2} και 10^{-3}) σε στείρο φυσιολογικό ορό. Έξι τρυβλία από κάθε αραιώση παρασκευάστηκαν: τρία από αυτά επωάστηκαν στους 37° C και τα υπόλοιπα στους 30° C στους τουλάχιστον για 5 ημέρες. Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα μέσα: Plate Count Agar (PCA) (Neogen Heywood UK), μέσο *Bacillus cereus* (LAB M, Bury, UK) με προσθήκη 1,5% βακτηριολογικό άγαρ και πολυμυξίνη Β (LAB M, Bury, UK) και άγαρ Man Rogosa and Sharpe (MRS) (Neogen, Heywood, UK). Τα τρυβλία MRS επωάστηκαν αναερόβια σε AnaeroJar AG25 χρησιμοποιώντας το σύστημα παραγωγής αναερόβιου περιβάλλοντος AnaeroGen Atmosphere (Oxoid, Basingstoke, UK) στους 37° C για 5 ημέρες. Στην περίπτωση που αναπτύχθηκαν αρκετές μορφολογικά πανομοιότυπες αποικίες σε ένα τρυβλίο, ελήφθησαν και ανακαλλιέργηθηκαν τουλάχιστον τρεις από αυτές. Καθαρές μεμονωμένες αποικίες (μετά από σπορά σε γραμμές) χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω καλλιέργειες και δοκιμές. Οι ζύμες αναπτύχθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν 45% γλυκόζη, 5% φρουκτόζη, 0,5% εκχύλισμα ζύμης (ΥΕ), 0,5% NaCl και 1,5% βακτηριολογικό άγαρ για την επιλεκτική απομόνωση οσμόφιλων ζυμών προσαρμοσμένων σε μέλι και γύρη [37]. Η επώαση έγινε στους 37° C για 5 ημέρες. Ανακαλλιέργειες των ζυμών έγιναν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Agar (PDA) (LAB M, Bury, UK). Απομονωμένα βακτήρια και ζυμομύκητες αποθηκεύτηκαν σε θρεπτικό ζωμό Nutrient Broth NB (LAB M, Bury, UK) συμπληρωμένο με 0,5% ΥΕ, 0,5% γλυκόζη και 20% v/v τελική συγκέντρωση γλυκερόλης στους -80° C, μέχρι περαιτέρω ανάλυση.

Ταυτοποίηση των στελεχών έγινε με την ενίσχυση και αλληλούχηση περιοχής του 16S rRNA γονιδίου για τα βακτήρια και της περιοχής Internal Transcribed Spacer (ITS) για τις ζύμες. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε μονή καθαρή αποικία για την εξαγωγή ολικού DNA με το kit ExtractMe Genomic DNA (Bliirt, Gdansk, Πολωνία). Για την ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA χρησιμοποιήθηκαν οι παγκόσμιοι εκκινητές 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') και 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Eurofins Genomics, Γερμανία) [38]. Η διαδικασία ενίσχυσης και τα υλικά περιγράφονται στα υλικά και μεθόδους του Κεφ. Γ.1.

Για την ενίσχυση της ITS περιοχής όσον αφορά τις ζύμες χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') και ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Eurofins Genomics). Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε: 2 U FastGene Taq DNA Πολυμεράση, 1X ρυθμιστικό διάλυμα A, MgCl₂ 0,5 mM, 25 pmol από κάθε εκκινητή, 1 mM dNTPs, 3 μl ολικό DNA και απιονισμένο αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 50 μl. Χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής Primus 25 στις ακόλουθες συνθήκες PCR: αρχική αποδιάταξη στους 95° C για 3 λεπτά, ακολουθούμενη από 40 κύκλους που περιλάμβαναν αποδιάταξη στους 95° C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση εκκινητών στους 55° C για 30 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση στους 72° C για 30 δευτερόλεπτα. Ένα τελικό βήμα επιμήκυνσης προστέθηκε στους 72° C για 2 λεπτά. Οι ενισχυμένες περιοχές καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας το kit καθαρισμού NucleoSpin Gel και PCR (MachereyNagel, Düren, Γερμανία) και στη συνέχεια προσδιορίστηκε η αλληλουχία μέσω της μεθόδου Sanger από την CeMIA SA (Λάρισα, Ελλάδα). Για να ελεγχθεί η ποιότητα των ληφθέντων αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Chromas έκδοση 2.6.6 (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, Αυστραλία). Οι αλληλουχίες για κάθε δείγμα συνδυάστηκαν σε μια ενιαία αλληλουχία με τη χρήση των λογισμικών MEGA X, έκδοση 10.1.6 [39] και Gene Runner, έκδοση 6.5 (www.generunner.net, πρόσβαση στις 11 Οκτωβρίου 2022). Οι αλληλουχίες υποβλήθηκαν σε αναζήτηση BlastN (Megablast) στην NCBI GenBank για τον εντοπισμό αλληλουχιών με την υψηλότερη ομοιότητα.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΘΕΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Παρασκευάστηκαν αρχικές και επιπρόσθετες καλλιέργειες για τη ζύμωση στερεάς κατάστασης της ΓΜ ως εξής: χρησιμοποιήθηκαν φρέσκιες βακτηριακές καλλιέργειες και καλλιέργειες ζυμομυκήτων που αναπτύχθηκαν σε Nutrient Broth συμπληρωμένο με 0,5% YE και 0,5% γλυκόζη (για τα βακτήρια) και ζωμό Potato Dextrose Broth PDB (για τις ζύμες). Η επώαση έγινε στους 37° C όλη τη νύχτα. Οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν σε 4000 × g για 5 λεπτά και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό. Καλλιέργειες *Apilactobacillus kunkeei* επώαστηκαν για 48 ώρες στους 30°C. Τα βακτηριακά κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 4000 × g για 5 λεπτά, και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό. Η ΓΜ λειοτριβήθηκε χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο γουδί. Η πολυανθική ΓΜ δείγμα AF1 (Πίνακας 20) χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα σε όλες τις ζυμώσεις.

Η ποσότητα της ΓΜ, τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν και οι συνθήκες ζύμωσης κάθε δείγματος περιγράφονται παρακάτω:

-Το δείγμα AF4 ζυμώθηκε ως εξής: 11,5 g AF1 εμβολιάστηκαν με 10⁸ CFUs *Zygosaccharomyces siamensis* που είχαν επαναιωρηθεί σε 2,3 ml αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού. Το δείγμα αναμίχθηκε με στείρα σπάτουλα και επώαστηκε για 8 ημέρες στους 33° C.

-Το δείγμα AF5 ζυμώθηκε ως εξής: 11,5 g AF1 εμβολιάστηκαν με 10⁸ CFUs *A. kunkeei* (στέλεχος NADBB37) που είχαν επαναιωρηθεί σε 2,3 ml αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού. Το δείγμα αναμίχθηκε με στείρα σπάτουλα και επώαστηκε για 29 ημέρες στους 33° C.

-Το δείγμα AF17 ζυμώθηκε σε τρία στάδια:

1. Προϊόν Α: Συνολικά 11,5 g AF1 εμβολιάστηκαν με 10⁸ CFUs *Z. siamensis* που είχαν επαναιωρηθεί σε 2,3 ml αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού. Το δείγμα αναμίχθηκε με στείρα σπάτουλα και επώαστηκε για 24 ώρες στους 33° C.

2. Προϊόν Β: Συνολικά 2,5 g του παραπάνω προϊόντος (Α) εμβολιάστηκαν με 10⁸ CFUs *A. kunkeei* (στέλεχος NADBB37) που είχαν επαναιωρηθεί σε 250 μl στείρου φυσιολογικού ορού. Το δείγμα αναμίχθηκε με στείρα σπάτουλα και επώαστηκε για 3 ημέρες στους 33° C.

3. Τελικό προϊόν: Συνολικά 11,5 g AF1 προστέθηκαν στο Β, αναμίχθηκαν και εμβολιάστηκαν με 10⁸ CFUs *Bacillus licheniformis* (στέλεχος NADBB16), 10⁸ CFUs *Bacillus* sp (στέλεχος NADBB14) και 10⁸ CFU του *Bacillus subtilis* (στέλεχος NADBB17), που είχαν επαναιωρηθεί σε 1 ml στείρο φυσιολογικό ορό. Το δείγμα αναμίχθηκε με στείρα σπάτουλα και επώαστηκε για 24 ώρες στους 33°C. Στη συνέχεια συμπιέστηκε χρησιμοποιώντας στείρο γουδοχέρι και επώαστηκε για 28 ημέρες στους 33° C.

Τα στελέχη των βακίλων επιλέχθηκαν μετά από διαλογή για την ικανότητά τους να παράγουν διάφορα ένζυμα (Κεφ. Γ1).

Στο τέλος της περιόδου επώασης, 1g από κάθε δείγμα αραιώθηκε σε 10 ml αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και οι τιμές του pH μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας όργανο μέτρησης pH JENWAY.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΓΜ, ΜΨ, ΖΥΜΩΜΕΝΗΣ ΓΜ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥΣ ΜΕ ΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗ-Κ

Προκειμένου να παρασκευαστούν τα πρωτεϊνικά κλάσματα, 500 mg από κάθε δείγμα διαλύθηκαν σε στείρο απιονισμένο νερό (ddH₂O) μέχρι τελικού όγκου 1,5 ml. Τα δείγματα παρέμειναν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με περιστασιακή ανάδευση. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά σε 10.000 X g και το υπερκείμενο υδατικό κλάσμα συλλέχθηκε. Κατόπιν προστέθηκε στερεό θειικό αμμώνιο (NH₄)₂SO₄ (AnalaR, BDH Chemicals Ltd., Poole, Αγγλία) σταδιακά μέχρι τελικής συγκέντρωσης 60% w/v.

Τα δείγματα αναδεύτηκαν απαλά και αφέθηκαν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για εξισορρόπηση, κατόπιν τοποθετήθηκαν για 10 λεπτά στους -20° C και φυγοκεντρήθηκαν για 30 λεπτά σε

11.000 × g. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1 ml στείρου ddH₂O [40,41]. Επί πλέον τα πρωτεϊνικά κλάσματα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με 150 µg/ml πρωτεϊνάσης-K (Blirt, Πολωνία) για 24 ώρες στους 37° C στις 210 rpm, και στη συνέχεια, δοκιμάστηκαν για την εκδήλωση αντι-ικικής δράσης.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΟΞΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ, n-ΒΟΥΤΑΝΟΛΗΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ

Η παρασκευή των κλασμάτων έγινε στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων της Φαρμακευτικής Σχολής του ΕΚΠΑ.

Για την παρασκευή των κλασμάτων του οξικού αιθυλεστέρα, της n-βουτανόλης και των υδατικών κλασμάτων, δείγματα ΓΜ και ΜΨ (≈500 mg το καθένα) διαλύθηκαν σε νερό (10 ml × 3), αναμίχθηκαν με περιδίνηση για περίπου 1 λεπτό και στη συνέχεια επωάστηκαν όλη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 4000 × g, το υπερκείμενο υδατικό κλάσμα συλλέχθηκε και διηθήθηκε. Τα δείγματα υποβλήθηκαν διαδοχικά σε εκχύλιση υγρού-υγρού με οξικό αιθυλεστέρα (10 ml × 3) (Merck, Darmstadt, Γερμανία) και n-βουτανόλη (10 ml × 3) (Merck, Darmstadt, Γερμανία). Με αυτή τη μέθοδο εκχυλίστηκαν τα μη πολικά συστατικά (λιπίδια) στα κλάσματα του οξικού αιθυλεστέρα, 1-BB-Et, 4-BB-Et, 6PBCP-Et), τα μεσαίας πολικότητας συστατικά (πολυφαινόλες, σάκχαρα) στα κλάσματα της n-βουτανόλης, 1-BB-Bu, 4-BB-Bu, 6P-BCP-Bu, ενώ τα υπόλοιπα πολικά συστατικά (σάκχαρα και πρωτεΐνες) παρέμειναν στο υδατικό διάλυμα (υδατικά κλάσματα 4-BB-H, 6P-BCP-H). Όλα τα κλάσματα συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού υπό κενό (20°C) και τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα μέχρι να σταθεροποιηθούν τα βάρη τους. Τα δείγματα αναλύθηκαν με τη χρήση GC-MS (κλάσματα 1-BB-Et, 4-BB-Et, 6P-BCP-Et), LC-MS (κλάσματα 1-BB-Bu, 4-BB-Bu και 6P-BCP-Bu) και NMR (κλάσματα 1-BB, 4-BB, 6P-BCP, 1-BB-Et, 4-BB-Et, 6P-BCP-Et, 1-BB-Bu, 4-BB-Bu και 6P-BCP-Bu).

ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΓΜ ΚΑΙ ΜΨ

Η χημική ανάλυση έγινε στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων της Φαρμακευτικής Σχολής του ΕΚΠΑ.

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR): Ο εξοπλισμός και η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση NMR έχουν περιγραφεί προηγουμένως από τους Tsami et al. [42]. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης NMR, υπήρξε μια μεταβολομική στρατηγική για τη συνεχή παρακολούθηση και ανίχνευση όλων των εκχυλισμάτων και των λαμβανόμενων υποκλασμάτων. Αυτό επέτρεψε τον χαρακτηρισμό των χημικών τους προφίλ. Επιπλέον μετρήθηκαν τα φάσματα 1D και 2D της NMR όσον αφορά τα κλάσματα της n-βουτανόλης (κλάσματα 1-BB-Bu, 4-BB-Bu, και 6P-BCP-Bu). Οι μεταβολίτες ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση της NMR και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτές των προτύπων και σε συνδυασμό με δεδομένα της LC-MS. Στη συνέχεια όλες οι υποψήφιες δομές συγκρίθηκαν με προηγούμενες δημοσιευμένες που υπάρχουν στη βιβλιογραφία (συμπεριλαμβανομένων των Reaxys, Scifinder και μιας εσωτερικής βάσης δεδομένων φυσικών ενώσεων).

Υγρή χρωματογραφία Υψηλής ανάλυσης (LC-Q-TOF-MS/MS): Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις LC-Q-TOF-MS/MS στα κλάσματα της n-βουτανόλης κάθε δείγματος (1-BB, 4-BB και 6P-BCP) χρησιμοποιώντας εξοπλισμό και μεθοδολογία που έχουν περιγραφεί από τους Tsami et al. [42]. Για να ληφθεί η χημική σύνθεση, η ανάλυση διεξήχθη τόσο σε θετικό όσο και σε αρνητικό τρόπο ιονισμού.

Οι μεταβολίτες χαρακτηρίστηκαν βάση του φάσματος μάζας τους και έγινε σύγκριση με μόρια που έχουν ήδη περιγραφεί στη βιβλιογραφία χρησιμοποιώντας βάσεις δεδομένων όπως οι Reaxys, Scifinder, Pubmed, NIST, mzCloud και MassBank. Οι ταυτοποιημένες ενώσεις καταγράφηκαν στη συνέχεια με βάση τους χρόνους κατακράτησης τους (TIC).

Ανάλυση Αέριας Χρωματογραφίας – Φασματομετρίας Μάζας (GC-MS): Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις GC-MS στα κλάσματα του οξικού αιθυλεστέρα (1-BB-Et, 4-BB-Et και 6P-BCP-Et), ο εξοπλισμός και η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκαν για τις αναλύσεις GC-MS έχουν περιγραφεί από τους Tsami et al. [42].

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Προκειμένου να αξιολογηθεί η κυτταροτοξικότητα των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική δοκιμή MTT όπως έχει ήδη περιγραφεί στο κεφάλαιο B.3.1.

ΙΟΣ ΓΡΙΠΗΣ Α ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκε κλινικό στέλεχος της γρίπης Α H1N1 που απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε με αναγνωρισμένες μεθόδους (standard laboratory methods). Το στέλεχος παραχωρήθηκε από τον Δρ. Νικόλαο Σιαφάκα (Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ Αθηνών). Για την αξιολόγηση της αντι-ικκής δράσης των δειγμάτων έναντι του IAV H1N1 εφαρμόστηκε δοκιμασία κυτταροκαλλιέργειας. Κύτταρα MDCK σε MEM συμπληρωμένο με 2% εμβρυϊκό βόειο ορό καλλιεργήθηκαν σε πλάκες των 96 φρεατίων και επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37° C ώστε να σχηματιστεί μια μονή στιβάδα κυττάρων. Στη συνέχεια, το μέσο αφαιρέθηκε και προστέθηκαν 200 μl από κάθε αραιώση δείγματος σε μέσο MEM που περιείχε 100 μl ιού IAV H1N1 και 1 μg/ml τρυψίνης (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Η κάθε αραιώση δοκιμάστηκε εις τριπλούν. Οι τελικές συγκεντρώσεις των ελεγμένων δειγμάτων ΜΨ και ΓΜ κυμαίνονταν από 16 έως 0,0625 mg/ml (διαδοχικές αραιώσεις). Η πλάκα επώαστηκε στους 37° C και εξετάζονταν καθημερινά για την εκδήλωση της κυτταροπαθητικής δράσης του ιού (CPE). Τα φρεάτια που περιείχαν μόνο κύτταρα MDCK χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός μάρτυρας. Χρησιμοποιήθηκε θετικός μάρτυρας μόνο με κύτταρα MDCK και τον ιό. Η επώαση των πλακών σταμάτησε με την εμφάνιση 100% CPE στον θετικό μάρτυρα. Οι πλάκες των 96 φρεατίων αποθηκεύτηκαν στους -80° C μέχρι περαιτέρω ανάλυση. Πραγματοποιήθηκαν δύο ξεχωριστές ομάδες πειραμάτων. Στην πρώτη τα δείγματα ΜΨ και ΓΜ επώαστηκαν για μία ώρα με μη μολυσμένα κύτταρα MDCK πριν από τον εμβολιασμό του IAV H1N1. Στη δεύτερη ο ιός IAV H1N1 επώαστηκε παρουσία των δειγμάτων μας για μία ώρα, και στη συνέχεια, μολύνθηκαν τα κύτταρα MDCK.

ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA

Οι μέθοδοι έχουν ήδη περιγραφεί στο κεφάλαιο B.3.1. για τον ιό EV-D68.

Για τον ιό H1N1 πραγματοποιήθηκε η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιώντας τους εκκινητές M30F2/08 5'-ATGAGYCTTYTAACCGAGGTCGAAACG-3' (Eurofins Genomics, Γερμανία) και τη σκριπτάση FastGene Scriptase II (Nippon Genetics, Ιαπωνία) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Το συνθετιμένο cDNA αποθηκεύτηκε στους -20° C μέχρι περαιτέρω χρήση.

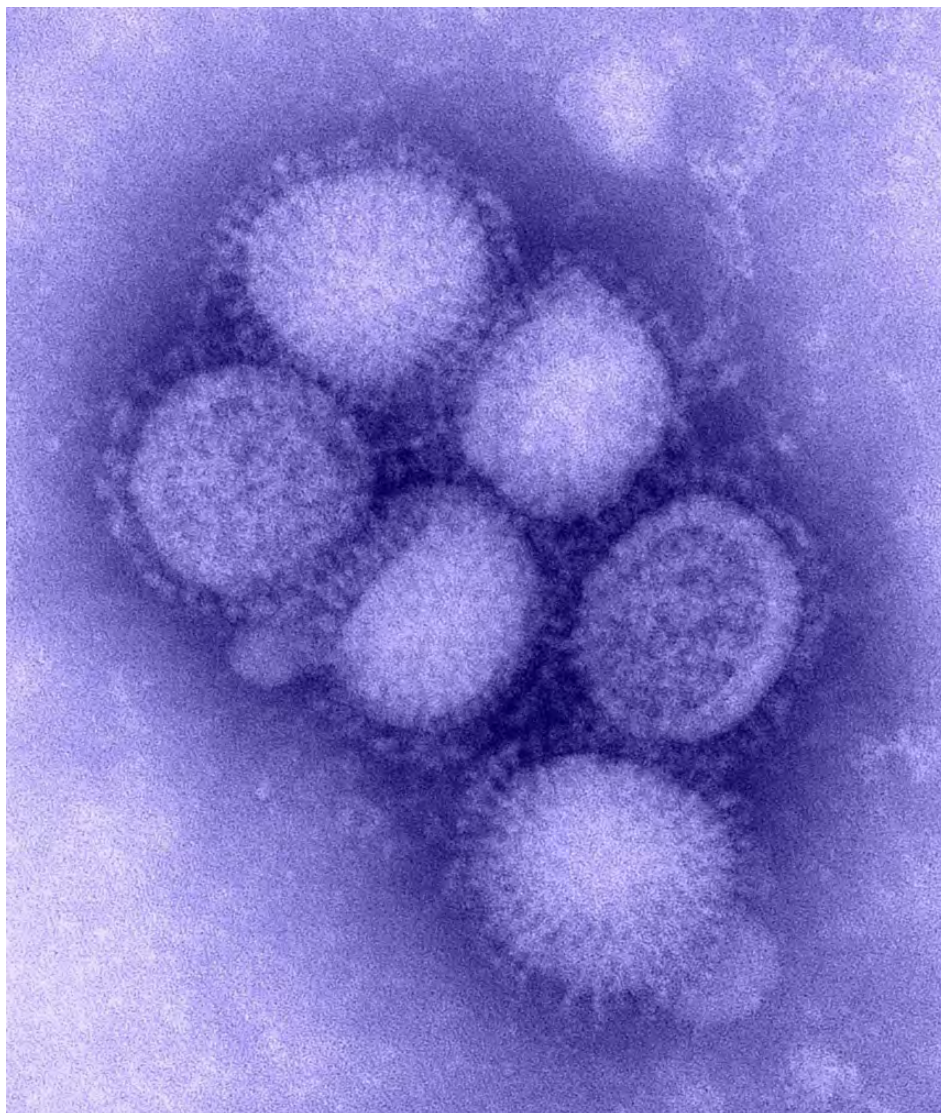
ΔΟΚΙΜΗ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ

Η αντι-ικκή δράση των δειγμάτων αξιολογήθηκε με τη χρήση συγκριτικής PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR, RT-PCR) που βασίστηκε σε προηγούμενη μελέτη μας [36]. Υπολογίστηκε η σχετική συγκέντρωση των ιικών αντιγράφων σε κυτταροκαλλιέργειες που περιέχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις δειγμάτων σε σύγκριση με τη συγκέντρωση των ιικών αντιγράφων που ανιχνεύθηκε στον θετικό μάρτυρα.

Τρία μικρολίτρα cDNA προστέθηκαν σε ένα σωληνάριο 0,2 ml που περιείχε 1X FastGene Mix (Nippon Genetics, Japan), 50nM ROX Low, 10 pmol από κάθε εκκινητή που στοχεύουν το M γονιδιακό τμήμα M30F2/08 5'-ATGAGYCTTYTAACCGAGGTCGAAACG-3'/ M264R3/08 5'-TGGACAAANCGTCTACGCTGCAG-3' [43], και ddH₂O έως 20μl. Η συγκριτική PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Eco48 (PCRMax) με το ακόλουθο πρωτόκολλο: 95°C για 2 λεπτά, 40 κύκλοι στους 95°C για 5 δευτερόλεπτα και 30 δευτερόλεπτα στους 60°C ακολουθούμενο από βήμα ανάλυσης καμπύλης τήξης. Οι τιμές κατωφλίου κύκλου (Ct) χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της σχετικής συγκέντρωσης ως εξής: Σχετική συγκέντρωση = $1-2^{\Delta Ct}$ (Ct θετικού μάρτυρα-Ct δείγματος) και σύμφωνα με το EcoStudy (PCRMax).

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ CC₅₀, IC₅₀ ΚΑΙ SI

Όπως έχει ήδη περιγραφεί στο κεφάλαιο B.3.1. για τον ιό EV-D68



Φωτογραφία 9. Σωματίδια του ιού της γρίπης A H1N1. Credit: CDC Influenza Laboratory Πηγή Wikimedia Commons

B.3.2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πειραματικός σχεδιασμός

Στόχος αυτής της μελέτης ήταν να αξιολογήσει τις αντι-ικκές ιδιότητες του ΜΨ, της ΓΜ και των υδατικών, βουτανολικών και πρωτεϊνικών κλασμάτων τους έναντι του ιού της γρίπης Α (ΙΑV) H1N1, καθώς και να διερευνήσει τον πιθανό τρόπο δράσης τους. Ως εκ τούτου, πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικά είδη πειραμάτων. Στο πρώτο, επώασαμε τα δείγματα για μία ώρα με μη μολυσμένα κύτταρα MDCK πριν από τον εμβολιασμό του ΙΑV H1N1. Η αντι-ική δράση που παρατηρείται υπό αυτές τις συνθήκες θα σήμαινε ότι οι ενώσεις που υπάρχουν στα δείγματά μας εμποδίζουν την μόλυνση από τον ιό επιδρώντας στα κύτταρα, πιθανόν στα σημεία προσκόλλησης του ιού. Στο δεύτερο πείραμα, επώασαμε τον ιό ΙΑV H1N1 παρουσία των δειγμάτων μας για μία ώρα, και στη συνέχεια μολύνθηκαν τα κύτταρα MDCK. Η αντι-ική δράση παρατηρήθηκε μόνο στο δεύτερο πείραμα, υποδεικνύοντας ότι τα δείγματα ΜΨ και ΓΜ καθώς και τα πρωτεϊνικά τους κλάσματα ασκούν δράση απευθείας πάνω στον ιό (Πίνακας 21).

Πίνακας 21. Τιμές CC_{50} και IC_{50} των δειγμάτων εκφρασμένες σε mg/ml και τιμές SI

ΔΕΙΓΜΑ	CC_{50}	IC_{50}	SI
AF1	11,57	3,91	2,95
AF4	10,63	10,04	1,06
AF5	11,11	2,27	4,89
AF17	12,00	2,47	4,85
AF1-P	>64	3,14	20,38
AF4-P	51,18	2,71	18,88
AF5-P	47,78	3,37	14,17
AF17-P	>64	0,46	139,13
1-BB	4,88	0,16	31,28
4-BB	0,83	0,18	4,60
6P-BCP	0,47	0,42	1,12
1-BB-P	32,00	0,097	329,89
4-BB-P	7,45	0,022	338,64
6P-BCP-P	3,92	0,052	75,38
1-BB-Bu	>64	2,91	21,99
4-BB-Bu	>64	-	-
6P-BCP-Bu	>64	-	-
4-BB-H	7,70	-	-
6P-BCP-H	6,97	-	-

AF: τεχνητά ζυμωμένη ΓΜ, P: πρωτεϊνικό κλάσμα, Bu: βουτανολικό κλάσμα, H: υδατικό κλάσμα, SI: δείκτης επιλεκτικότητας

Σε δεύτερο στάδιο διερευνήθηκε εάν το μικροβίωμα του ΜΨ μπορεί να συμβάλλει στην αντι-ική δράση. Για το σκοπό αυτό, το δείγμα γύρης μελισσών AF1 εμβολιάστηκε με ζυμομύκητες και βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από το ΜΨ, προσομοιώνοντας έτσι τη ζύμωση στερεάς φάσης (solid state fermentation), η οποία συμβαίνει σε φυσικές συνθήκες στην κυψέλη. Μετά τη ζύμωση, τα δείγματα AF4, AF5 και AF17 εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές pH σε σύγκριση με μη ζυμωμένα δείγματα AF1 (τιμές pH δείγματος AF1: 4,33, AF4: 3,81, AF5: 3,9, AF17: 4,06).

Το μικροβίωμα του ΜΨ εμπλουτίζει τη ΓΜ με ένζυμα, αμινοξέα, βιταμίνες, φαινολικές ενώσεις και πιθανώς αντιμικροβιακές ενώσεις [2,3]. Η ζύμωση της ΓΜ είναι γνωστό ότι αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητα τόσο των θρεπτικών όσο και των βιοδραστικών ενώσεων στο ΜΨ που προκύπτει [44,45,46].

Οι μέλισσες εμβολιάζουν τη ΓΜ με λακτοβακίλλους, συμπεριλαμβανομένου του *Apilactobacillus kunkeei*, και η γαλακτική ζύμωση λαμβάνει χώρα στα αρχικά στάδια της μετατροπής της ΓΜ σε ΜΨ [47]. Οι ζυμομύκητες υπάρχουν στη γύρη των λουλουδιών, στη ΓΜ και στο ΜΨ και συμμετέχουν ενεργά στη ζύμωση [44,48]. Οι οσμοανθεκτικές ζύμες όπως ο *Zygosaccharomyces siamensis* είναι σε θέση να επιβιώσουν σε περιβάλλον με χαμηλή ενεργότητα νερού, όπως το μέλι και το ΜΨ [49]. Πρόσφατα, οι Royraz et al. παρήγαγαν τεχνητά ζυμωμένο ΜΨ χρησιμοποιώντας μια καλλιέργεια εκκίνησης, που συνδυάζει στελέχη *Lactobacillus kunkeei* και δύο ζυμομύκητες, *Starmerella magnolia* MP-2 και *Zygosaccharomyces siamensis* MP-14, για σύγκριση με το εμπορικά διαθέσιμο ΜΨ. Έδειξαν ότι το τεχνητά ζυμωμένο ΜΨ είχε παρόμοιες ή βελτιωμένες ιδιότητες όσον αφορά τη μικροβιακή σταθερότητα και τη βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών [50].

Επιπλέον, μια πληθώρα στελεχών *Bacillus* υπάρχουν στο ΜΨ [51], παράγοντας κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, αμυλάσες και πρωτεϊνάσες που μπορούν να επιδράσουν στο σκληρό εξωτερικό στρώμα των γυρεοκόκκων. Με τη διάσπαση των γυρεοκόκκων αυξάνεται η βιοδιαθεσιμότητα των βιοδραστικών ενώσεων. Έχει επίσης αναφερθεί ότι βιταμίνες, αμινοξέα και άλλα θρεπτικά συστατικά ή μεταβολίτες όπως τα φαινολικά οξέα μπορεί να παράγονται από το μικροβίωμα του ΜΨ, συμπεριλαμβανομένων πιθανώς αντιμικροβιακών ενώσεων [1,3,45,52]. Λαμβάνοντας υπ' όψη τα ανωτέρω, για την τεχνητή ζύμωση της ΓΜ επελέγησαν τα στελέχη *A. kunkeei* (στέλεχος NADBB37), *Z. siamensis* και επιπλέον τα *B. licheniformis* (στέλεχος NADBB16), *Bacillus* sp. (στέλεχος NADBB14) και *B. subtilis* (στέλεχος NADBB17), που απομονώσαμε από δείγματα ΜΨ. Από όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη φορά που στελέχη *Bacillus* χρησιμοποιούνται μόνα τους ή σε συνδυασμό με άλλους μικροοργανισμούς ως καλλιέργεια για τη ζύμωση ΓΜ.

Προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας των δειγμάτων

Η δοκιμασία MTT χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των επιπέδων τοξικότητας όλων των δειγμάτων που δοκιμάστηκαν στα κύτταρα MDCK. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 21, τα επίπεδα τοξικότητας που εκφράζονται ως τιμές CC₅₀ κυμαίνονταν από 0,47 έως >64 mg/ml, υποδεικνύοντας ότι ορισμένα δείγματα ΜΨ και ΓΜ ενδέχεται να ασκήσουν κυτταροτοξικότητα σε κύτταρα MDCK σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Σε μια μελέτη των Watanabe et al., η τοξικότητα του μελιού στα κύτταρα MDCK κυμαινόταν περίπου από 80 έως 83 mg/ml [6]. Τα δεδομένα μας δείχνουν ότι η ΓΜ και το ΜΨ παρουσιάζουν υψηλότερη κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα MDCK από το μέλι. Αντίθετα, τα πρωτεϊνικά κλάσματα της ΓΜ και του ΜΨ έδειξαν χαμηλότερη τοξικότητα σε σύγκριση με τα δείγματα από τα οποία προήλθαν. Επιπλέον, και τα τρία κλάσματα βουτανόλης έδειξαν τη χαμηλότερη τοξικότητα στα κύτταρα MDCK μεταξύ όλων των δειγμάτων που δοκιμάστηκαν.

Αντι-ικκή δράση – PCR πραγματικού χρόνου

Πραγματοποιήθηκε μια συγκριτική ανάλυση PCR σε πραγματικό χρόνο για την παρακολούθηση του αριθμού των αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος παρουσία των δειγμάτων μας. Υποθέσαμε ότι η αντιική δράση που ασκείται από τα δείγματα που δοκιμάστηκαν θα πρέπει να οδηγήσει σε μειωμένο αριθμό αντιγράφων του γονιδιώματος του IAV H1N1 σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα (μόνο ιό) μετά από ταυτόχρονο εμβολιασμό του ιού και των δειγμάτων. Η χρήση της συγκριτικής ανάλυσης PCR σε πραγματικό χρόνο έδειξε έναν μειούμενο αριθμό αντιγράφων του IAV H1N1 όταν ο ιός εμβολιάζεται ταυτόχρονα με τα δοκιμασμένα δείγματα στην κυτταροκαλλιέργεια. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι όλα τα δείγματα ΜΨ και ΓΜ ασκούν αντι-ική δράση με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση. Η αντι-ική δράση εκφράστηκε ως τιμές IC₅₀ (Πίνακας 21) που κυμαίνονται από 0,022 έως 10,04 mg/ml.

Τα βουτανολικά και τα υδατικά κλάσματα δεν άσκησαν καμία αντι-ικκή δράση, με εξαίρεση το δείγμα 1-BB-Bu, το οποίο έδειξε τιμή IC_{50} 2,91 mg/ml. Χημικά, το δείγμα 1-BB-Bu διαφοροποιείται από τα υπόλοιπα από την παρουσία σε αυτό της κερκετίνης (γνωστής αντι-ικκής ένωσης), ειδικών φλαβονοειδών γλυκοσιδών και διγλυκοσιδών, καθώς και από παράγωγα ισοφλαβόνης (γνωστές αντι-ικκές ενώσεις) σύμφωνα με την ανάλυση LC-MS (Πίνακας 22). Επιπλέον με τη χρήση της NMR εντοπίστηκαν τα κυρίαρχα φλαβονοειδή (που φέρουν έναν Β δακτύλιο χωρίς κανένα υποκατάστατο) όπως η πινοκεμπρίνη, η πινομπακσίνη και η χρυσίνη [57].

Τα πρωτεϊνικά κλάσματα όλων των δειγμάτων (ΜΨ, ζυμωμένη ΓΜ και ΓΜ) εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές IC_{50} και υψηλότερες τιμές CC_{50} σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων από τα οποία προήλθαν. Η επεξεργασία τους με πρωτεϊνάση-Κ εξουδετέρωσε εντελώς την αντι-ικκή τους δράση, επιβεβαιώνοντας έτσι την πρωτεϊνική φύση του αντι-ικού παράγοντα ή παραγόντων που υπάρχουν σε αυτά τα δείγματα.

Η αντι-ικκή δράση εμφανίζει διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων, η οποία μπορεί να αποδοθεί στα διαφορετικά χημικά τους προφίλ, τα οποία με τη σειρά τους εξαρτώνται από τη βοτανική τους προέλευση αλλά και από τη διαδικασία ζύμωσης του ΜΨ. Οι διαφορές τόσο στη σύνθεση όσο και στη συγκέντρωση των συστατικών που υπάρχουν στη ΓΜ, σε σχέση με το ΜΨ, θα μπορούσαν να αποδοθούν στην πρόπεψη των κόκκων της γύρης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και της μετατροπής της ΓΜ σε ΜΨ. Έχει αναφερθεί ότι βιταμίνες, αμινοξέα και άλλα θρεπτικά συστατικά ή μεταβολίτες όπως τα φαινολικά οξέα μπορεί να παράγονται και από το μικροβίωμα του ΜΨ, προφανώς συμπεριλαμβανομένων και αντιμικροβιακών ενώσεων [1,3,45,52].

Προκειμένου να ελεγχθεί η υπόθεση ότι το ΜΨ περιέχει αντι-ικκές ενώσεις που παράγονται από το μικροβίωμά του, εμβολιάσαμε τη ΓΜ με μικροοργανισμούς που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από δείγματα ΜΨ. Το προϊόν της ζύμωσης που προέκυψε (το ονομάσαμε τεχνητά ζυμωμένη γύρη μελισσών, Artificially Fermented, AF) δοκιμάστηκε περαιτέρω για τις αντι-ικκές ιδιότητές του (δείγματα AF4, AF5 και AF17). Τα δείγματα AF5 και AF17 έδειξαν χαμηλότερες τιμές IC_{50} (περίπου 1,6 φορές) από το δείγμα ΓΜ από το οποίο προήλθαν. Το δείγμα AF4 έδειξε υψηλότερη τιμή IC_{50} (περίπου 2,5 φορές) σε σύγκριση με το δείγμα ΓΜ (AF1) από το οποίο προήλθε. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η αντι-ικκή δράση μεταβάλλεται ανάλογα με τις συνθήκες ζύμωσης και συγκεκριμένα παρατηρούμε μια μείωση στην περίπτωση του δείγματος AF4 που οφείλεται στη δράση του ζυμομύκητα, σε σύγκριση με τον *A. kunkei* ή το μικτό μικροβιακό εμβόλιο (δείγματα AF5 και AF17, αντίστοιχα).

Υπάρχουν επίσης αξιοσημείωτες αλλαγές στις τιμές IC_{50} μεταξύ των δειγμάτων AF και AF-P. Οι τιμές IC_{50} των δειγμάτων AF1 και AF1-P είναι πολύ κοντινές, 3,91 και 3,14 mg/ml αντίστοιχα. Ωστόσο, καταγράφηκε μια αξιοσημείωτη μείωση (περίπου 3,9 φορές) μεταξύ των τιμών IC_{50} των δειγμάτων AF4 και AF4-P (10,04 και 2,71 mg/ml, αντίστοιχα). Η πιο σημαντική μείωση (περίπου 5,3 φορές) παρατηρήθηκε μεταξύ των τιμών IC_{50} των δειγμάτων AF17 και AF17-P, από 2,47 σε 0,46 mg/ml, αντίστοιχα. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν τη διαφορετική χημική φύση των αντι-ικών ουσιών (πρωτεϊνικών έναντι μη πρωτεϊνικών) που μπορεί να παραχθούν κατά τη ζύμωση. Η αύξηση των τιμών CC_{50} σε όλα τα δείγματα AF-P σε σύγκριση με τα δείγματα AF έδειξε ότι οι μη πρωτεϊνικές ενώσεις μπορεί να ασκήσουν κυτταροτοξικότητα σε κύτταρα MDCK (Πίνακας 21).

Τιμές δείκτη επιλεκτικότητας

Οι τιμές του δείκτη επιλεκτικότητας (SI) υπολογίστηκαν για όλα τα δείγματα εκτός από εκείνα τα εκχυλίσματα που δεν ασκούσαν καμία αντι-ικκή δράση. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή SI, τόσο πιο αποτελεσματική έναντι του ιού και ασφαλέστερη θα ήταν μια ουσία. Όλα τα δείγματα που άσκησαν αντι-ικκή δράση έδειξαν τιμή SI υψηλότερη από 1, που σημαίνει ότι η αναστολή του ιού παρατηρείται σε συγκεντρώσεις που δεν είναι τοξικές για τα κύτταρα MDCK. Επτά δείγματα (46%) έδειξαν τιμές SI υψηλότερες από 20, που σημαίνει ότι η συγκέντρωση IC_{50} είναι περισσότερο από 20 φορές χαμηλότερη από την αντίστοιχη συγκέντρωση CC_{50} , ένδειξη ισχυρής αντι-ικκής δράσης [28].

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2, οι τιμές SI χαρακτηρίζονται από εξαιρετικά υψηλή διακύμανση και κυμαίνονται από 1,06 έως 338,64. Τα τεχνητά ζυμωμένα δείγματα ΓΜ, AF5 και AF17 έδειξαν υψηλότερες τιμές SI από την ακατέργαστη ΓΜ (AF1), υποδεικνύοντας ότι η ζύμωση ενισχύει την αντι-ικκή δράση πιθανώς μέσω της απελευθέρωσης αντι-ικών φυτοχημικών που υπάρχουν στη γύρη ή μέσω άγνωστων αντι-ικών ενώσεων που παράγονται από τους μικροοργανισμούς που εμπλέκονται στη ζύμωση.

Τέλος, τα πρωτεϊνικά κλάσματα σε όλες τις περιπτώσεις έδειξαν υψηλότερες τιμές SI σε σύγκριση με τα δείγματα από τα οποία προήλθαν και στην περίπτωση του ΜΨ, οι τιμές SI των πρωτεϊνικών κλασμάτων ήταν εντυπωσιακά υψηλές. Επιβεβαιώνεται έτσι η παρουσία πρωτεϊνικών ενώσεων στο ΜΨ που ασκούν υψηλή αντι-ικκή δράση κατά του ιού της γρίπης σε συνδυασμό με χαμηλή κυτταροτοξικότητα.

Χημική Ανάλυση Δειγμάτων ΓΜ και ΜΨ

Ο στόχος αυτής της μελέτης δεν ήταν μόνο η αξιολόγηση της *in vitro* αντι-ικής δραστηριότητας της ΓΜ και του ΜΨ έναντι του IAV H1N1. Εξίσου σημαντικό ήταν να αποσαφηνιστεί και το χημικό προφίλ αυτών των μελισσοκομικών προϊόντων που μέχρι τώρα δεν έχουν διερευνηθεί επαρκώς τουλάχιστον στην Ελλάδα. Τα επιλεγμένα δείγματα ΓΜ και ΜΨ είναι σύνθετα μείγματα πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών. Αποτελούνται από συστατικά χαμηλού μοριακού βάρους σε ένα εύρος μάζας 50–1500 Da καθώς και από άγνωστους πολυσακχαρίτες και από πρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους. Η αποσαφήνιση αυτής της χημικής πολυπλοκότητας είναι ένα αρκετά δύσκολο έργο για τις τρέχουσες αναλυτικές τεχνικές. Για την επιτυχή αναγνώριση συγκεκριμένων ενώσεων, ήταν απαραίτητη η κλασματοποίηση των δειγμάτων με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Μετά την κλασμάτωση εφαρμόστηκαν διάφορες προσεγγίσεις, συμπεριλαμβανομένων των χρωματογραφικών μεθόδων (LC-MS και GC-MS) και άμεσων φασματοσκοπικών μεθόδων (NMR), ώστε να γίνει εφικτή η περαιτέρω χημική ανάλυσή τους [42,53].

Σε αυτή τη μελέτη, τα δείγματα ΜΨ και ΓΜ χαρακτηρίστηκαν αρχικά με εφαρμογή NMR. Τα φάσματα ¹H-NMR αποκάλυψαν ξεκάθαρα τη χημική τους πολυπλοκότητα. Ως εκ τούτου, τα δείγματα υποβλήθηκαν περαιτέρω σε υγρή-υγρή εκχύλιση (liquid-liquid extraction), τη συνηθέστερα εφαρμοζόμενη μέθοδο για την πλήρη ανάκτηση των συστατικών.

Η μέθοδος περιλάμβανε τη διαίρεση των δειγμάτων σε τρία κύρια υποκλάσματα: (α) **κλάσματα οξικού αιθυλεστέρα** για την ανάκτηση των λιπιδίων, κάτι που είναι σημαντικό να γίνει πριν οποιαδήποτε περαιτέρω ανάλυση (β) **βουτανολικά κλάσματα** όπου εκχυλίζονται πολικά συστατικά, όπως πολυφαινόλες και σάκχαρα. Αυτά τα κλάσματα εκχυλίζουν το φαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων και θεωρούνται βιοδραστικά. Έτσι τα δείγματα 1-BB-Bu, 4-BB-Bu και 6P-BCP-Bu αναλύθηκαν περαιτέρω με τεχνικές LC-MS και NMR (γ) **υδατικά κλάσματα** που περιείχαν συστατικά υψηλής πολικότητας, συμπεριλαμβανομένων των σακχάρων και των πρωτεϊνών. Τα πλήρη χημικά αποτυπώματα των αρχικών δειγμάτων προκύπτουν από τη συνδυασμένη ανάλυση των παραπάνω κλασμάτων (πίνακας 22).

Πίνακας 22. Ανάλυση LC-MS των βουτανολικών κλασμάτων (δείγματα 1-BB-Bu, 4-BB-Bu και 6P-BCP-Bu)

Rt	Θετικός ιοντισμός	Αρνητικός ιοντισμός	Μάζα	Μοριακός τύπος	Προτεινόμενα συστατικά	1-BB-Bu	4-BB-Bu	6P-BCP-Bu
	Βρέθηκαν	Βρέθηκαν						
0.324	203.0529 [M+Na] ⁺	179.0564 [M-H] ⁻	180.0634	C ₆ H ₁₂ O ₆	Carbohydrates	•	•	•
0.337	365.1056 [M+Na] ⁺	341.1091 [M-H] ⁻	342.1165	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Carbohydrates	•	•	•
0.490	349.1118 [M+Na] ⁺	371.1186 [M+HCOO] ⁻	326.1215	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₀	Carbohydrates	•	•	•
0.493	139.0390 [M+Na] ⁺		138.0318	C ₇ H ₆ O ₃	simple phenolic	•	•	
0.680		134.0470 [M-H] ⁻	135.0542	C ₄ H ₉ NO ₄	amino acid derivative	•	•	•
1.048	132.1018 [M+H] ⁺			C ₆ H ₁₃ NO ₂	leucine isomer	•	•	•
1.730		243.0620 [M-H] ⁻	244.0695	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	uridine isomer	•		•
1.850	166.0864 [M+H] ⁺		165.079	C ₉ H ₁₁ NO ₂	amino acid	•	•	•
1.998	149.0241 [M+H] ⁺		148.1583	C ₉ H ₈ O ₂	cinnamic acid isomer	•		
2.046	181.0498 [M+H] ⁺	179.0350 [M-H] ⁻	180.0421	C ₉ H ₈ O ₄	caffeic acid isomer	•		•
2.426	195.0649 [M+H] ⁺		194.0579	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	ferulic acid isomer	•	•	
3.210	153.0546 [M+H] ⁺	151.0400 [M-H] ⁻	152.0468	C ₈ H ₈ O ₃	methoxybenzoic acid	•	•	
3.772	181.0496 [M+H] ⁺	179.0349 [M-H] ⁻	180.0421	C ₉ H ₈ O ₄	caffeic acid isomer	•		•
4.936	627.1563 [M+H] ⁺	625.141 [M-H] ⁻	626.1482	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	flavonoid di-glycoside	•	•	•
4.981	611.1611 [M+H] ⁺	595.1303 [M-H] ⁻	609.1462	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	flavonoid di-glycoside	•	•	•
5.000	641.1713 [M+H] ⁺	639.1562 [M-H] ⁻	640.1633	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇	flavonoid di-glycoside	•		•
5.078	641.1721 [M+H] ⁺	639.1570 [M-H] ⁻	640.1646	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇	flavonoid di-glycoside	•		•
5.182	597.1451 [M+H] ⁺	595.1300 [M-H] ⁻	596.1377	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	flavonoid di-glycoside	•		•
5.191	641.1722 [M+H] ⁺	639.1568 [M-H] ⁻	640.1648	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇	flavonoid di-glycoside		•	
5.200	671.1820 [M+H] ⁺	669.1665 [M-H] ⁻	670.1739	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₈	flavonoid di-glycoside			•
5.260	597.1460 [M+H] ⁺	595.1303 [M-H] ⁻	596.1379	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	flavonoid di-glycoside		•	•
5.266	773.2135 [M+H] ⁺	771.1986 [M-H] ⁻	772.2062	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	flavonoid tri-glycoside	•		•
5.320	611.1612 [M+H] ⁺	609.1465 [M-H] ⁻	610.1539	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	flavonoid di-glycoside		•	•
5.440	787.2298 [M+H] ⁺	785.2148 [M-H] ⁻	786.2224	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₁	flavonoid tri-glycoside	•		•
5.460	611.1618 [M+H] ⁺	609.1452 [M-H] ⁻	610.1525	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	flavonoid di-glycoside	•		
5.531	625.1763 [M+H] ⁺	623.1616 [M-H] ⁻	624.1691	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	flavonoid tri-glycoside		•	
5.570	611.1621 [M+H] ⁺	609.1455 [M-H] ⁻	610.1529	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	flavonoid di-glycoside	•	•	
5.603	563.1759 [M+H] ⁺	561.1614 [M-H] ⁻	562.1686	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₃	flavonoid di-glycoside	•		
5.647	757.2190 [M+H] ⁺	755.2041 [M-H] ⁻	756.2116	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	flavonoid tri-glycoside			•
5.741	595.1659 [M+H] ⁺	593.1511 [M-H] ⁻	594.1585	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	flavonoid di-glycoside	•	•	•
5.790	581.1506 [M+H] ⁺	579.1351 [M-H] ⁻	580.1433	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	flavonoid di-glycoside		•	•
5.840	625.1770 [M+H] ⁺	623.1616 [M-H] ⁻	624.1696	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	flavonoid di-glycoside	•	•	•
5.881	611.1617 [M+H] ⁺	609.1454 [M-H] ⁻	610.1527	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	flavonoid di-glycoside		•	•
6.258	625.1768 [M+H] ⁺	623.1610 [M-H] ⁻	624.1682	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	flavonoid di-glycoside	•		
6.355	449.1078 [M+H] ⁺	447.0930 [M-H] ⁻	448.1005	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	flavonoid glycoside	•		•
6.382	417.1008 [M+H] ⁺	415.1033 [M-H] ⁻	416.3789	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	flavonoid glycoside	•		
6.751	465.1028 [M+H] ⁺	463.0946 [M-H] ⁻	464.0955	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	flavonoid glycoside	•		•

7.033	433.1026 [M+H] ⁺	431.0975 [M-H] ⁻	432.1048	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	flavonoid glycoside	•		
7.403	653.1714 [M+H] ⁺	651.1561 [M-H] ⁻	652.1642	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₇	flavonoid tri-glycoside			•
7.812	303.0500 [M+H] ⁺	301.0352 [M-H] ⁻	302.0427	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	quercetin	•		
7.841		255.0662 [M-H] ⁻	256.2568	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	isoflavone derivative	•		
8.936	317.0658 [M+H] ⁺	315.0511 [M-H] ⁻	316.0583	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	methoxylated flavonoid		•	
8.995	287.0553 [M+H] ⁺	285.0405 [M-H] ⁻	286.0478	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	kaempferol	•	•	•
8.999	255.0652 [M+H] ⁺	253.0506 [M-H] ⁻	254.2423	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	isoflavone derivative	•		
9.230	317.0658 [M+H] ⁺	315.0508 [M-H] ⁻	316.0558	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	methoxylated flavonoid		•	•

* Τα χρωματισμένα κελιά δείχνουν την ύπαρξη των ουσιών ανά δείγμα

Ανάλυση LC-MS

Η ανάλυση LC-MS αποκάλυψε την παρουσία περισσότερων των 45 ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων υδατανθράκων, αμινοξέων και πολυφαινολών. Στον Πίνακα 22, παρατίθενται μεμονωμένα στοιχεία σύμφωνα με το χρόνο κατακράτησης (R_t) συμπεριλαμβάνονται οι μοριακοί τύποι και οι προτεινόμενες χημικές οντότητες. Όλα τα δεδομένα ερμηνεύτηκαν και συγκρίθηκαν με τα φάσματα που είναι διαθέσιμα στη βιβλιογραφία και σε συνδυασμό με τα δεδομένα NMR που ελήφθησαν. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, επιβεβαιώθηκε ότι τα κύρια συστατικά ήταν υδατάνθρακες και φαινολικά παράγωγα. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της LC-MS αποκάλυψαν ότι τα δείγματα περιέχουν διάφορους υδατάνθρακες συμπεριλαμβανομένων μονο- και δι-σακχαριτών, αμινοξέα, νουκλεοζίτες, και μια ποικιλία πολυφαινολών, συμπεριλαμβανομένων των φλαβονοειδών στη μορφή των άγλυκων, στη μορφή των μονο-/δι-/τρι-γλυκοσίδων τους καθώς και μερικά απλά φαινολικά παράγωγα. Η χημική αξιολόγηση ήταν σε συμφωνία με προηγούμενα δημοσιευμένα δεδομένα για προϊόντα που προέρχονται από μέλισσες [54].

NMR και GC-MS, χαρακτηρισμός κλασμάτων 1-BB, 4-BB και 6P-BCP

Η οπτική επιθεώρηση των φασμάτων NMR αποκάλυψε την παρουσία διαφορετικών κατηγοριών μεταβολιτών όπως συζητήθηκε προηγουμένως στην ανάλυση LC-MS. Τα φαινολικά παράγωγα ήταν παρόντα σε όλα τα δείγματα, με πολλά κοινά φλαβονοειδή που χαρακτηρίζουν τα δείγματα 4-BB και 6P-BCP, ενώ στο 1-BB, αυτά ήταν παρόντα αλλά με χαμηλότερη ένταση (σε σύγκριση με τις υπόλοιπες πολυφαινόλες που αυτό περιείχε). Όσον αφορά το δείγμα 1-BB, ανιχνεύεται επιπλέον η παρουσία της πινοκεμπρίνης, πινομπακσίνης και σχετιζόμενων με τη χρυσίνη συστατικών [55,56]. Άλλα φαινολικά παράγωγα, όπως απλά φαινολικά ισομερή, ανιχνεύθηκαν επίσης ως δευτερεύοντα συστατικά. Η ανάλυση του γλυκοσιδικού περιεχομένου αποκάλυψε διαφορετικούς τύπους ελεύθερων σακχάρων και/ή γλυκοζίτες σε όλα τα δείγματα. Εκτός από μονοσακχαρίτες όπως η α - και β -γλυκόζη, ανιχνεύθηκαν και άλλοι υδατάνθρακες, όπως φρουκτόζη, σακχαρόζη, μαλτόζη και παράγωγα ινοσιτόλης. Το δείγμα 1-BB-Bu παρουσιάζει το χαμηλότερο γλυκοσιδικό περιεχόμενο με βάση το χαμηλότερης έντασης σήμα των ανωμερών πρωτονίων, ενώ στα δείγματα 4-BB-Bu και 6P-BCP-Bu, τα σάκχαρα υπάρχουν σε ίσες αναλογίες. Όσον αφορά τη συσσώρευση υδρογονανθράκων και λιπιδίων επιβεβαιώθηκε η παρουσία τους σε όλα τα δείγματα. Επιπλέον, οι αναλύσεις GC-MS των 1-BB-Et, 4-BB-Et και του 6P-BCP-Et αποκάλυψαν την παρουσία ν-αλκανίων σε όλα τα δείγματα, συμπεριλαμβανομένων της τρικοζάνης και της πεντακοζάνης [57].

Συμπερασματικά, η ΓΜ, το ΜΨ και η τεχνητά ζυμωμένη ΓΜ άσκησαν σημαντική αντι-ιική δράση κατά του ιού της γρίπης Α (ΙΑV) H1N1. Τα δείγματα AF5 και AF17 που έχουν υποστεί τεχνητή ζύμωση έδειξαν υψηλότερες τιμές SI σε σχέση με την πρώτη ύλη από την οποία προήλθαν (AF1), υποδεικνύοντας την πιθανή συμβολή του μικροβιώματος του ΜΨ στην παρατηρούμενη αντι-ιική δράση. Τα πρωτεϊνικά κλάσματα της ΓΜ, του ΜΨ και της τεχνητά ζυμωμένης ΓΜ έδειξαν τις υψηλότερες τιμές SI, υποδεικνύοντας την πρωτεϊνική φύση του άγνωστου αντι-ιικού παράγοντα ή παραγόντων. Οι πρωτεϊνικής φύσης παράγοντες πιθανόν δρουν συνεργικά με φυτικούς αντι-ιικούς μεταβολίτες που έχουν προσδιοριστεί στη χημική ανάλυση των δειγμάτων της ΓΜ και του ΜΨ. Οι αναλύσεις με τη χρήση NMR και LC-MS αποκάλυψαν την παρουσία γνωστών αντι-ιικών ουσιών όπως η κερκετίνη. Η συνδυασμένη χρήση NMR και LC-MS αποδεικνύεται μια αξιόπιστη μεθοδολογία διερεύνησης μεταβολικών προτύπων που μπορεί να συσχετίζονται με τη βιοδραστικότητα και συγκεκριμένα με την αντι-ιική δράση. Η ταυτοποίηση των αντι-ιικών παραγόντων, η διερεύνηση του μηχανισμού δράσης τους καθώς και η πιθανή συνέργεια τους θα μπορούσε να οδηγήσει σε νέες θεραπείες κατά του ΙΑV H1N1 αντιμετωπίζοντας και την ανθεκτικότητα που εμφανίζουν τα νέα στελέχη στα υπάρχοντα αντι-ιικά σκευάσματα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ Β.3

1. Didaras, N. A., Kafantaris, I., Dimitriou, T. G., Mitsagga, C., Karatasou, K., Giavasis, I., Stagos, D., Amoutzias, G. D., Hatjina, F., & Mossialos, D. (2021). Biological Properties of Bee Bread Collected from Apiaries Located across Greece. *Antibiotics*, 10(5), 555. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050555>
2. Didaras, N. A., Karatasou, K., Dimitriou, T. G., Amoutzias, G. D., & Mossialos, D. (2020). Antimicrobial Activity of Bee-Collected Pollen and Beebread: State of the Art and Future Perspectives. *Antibiotics*, 9(11), 811. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110811>
3. Peřka, K., Ořłowska, O., Worobo, R. W., & Szveda, P. (2021). Bee Bread Exhibits Higher Antimicrobial Potential Compared to Bee Pollen. *Antibiotics*, 10(2), 125. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020125>
4. Bakour, M.; Fernandes, A.; Barros, L.; Soković, M.; Ferreira, I.; Badiia, L. Bee bread as a functional product: Chemical composition and bioactive properties. *LWT* 2019, 109
5. Lee, I. K., Hwang, B. S., Kim, D. W., Kim, J. Y., Woo, E. E., Lee, Y. J., Choi, H. J., & Yun, B. S. (2016). Characterization of Neuraminidase Inhibitors in Korean Papaver rhoeas Bee Pollen Contributing to Anti-Influenza Activities in Vitro. *Planta Medica*, 82(6), 524–529. <https://doi.org/10.1055/s-0041-111631>
6. Watanabe, K., Rahmasari, R., Matsunaga, A., Haruyama, T., & Kobayashi, N. (2014). Anti-influenza Viral Effects of Honey In Vitro: Potent High Activity of Manuka Honey. *Archives of Medical Research*, 45(5), 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.05.006>
7. Habashy, N. H., & Abu-Serie, M. M. (2019). Major royal-jelly protein 2 and its isoform X1 are two novel safe inhibitors for hepatitis C and B viral entry and replication. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 1072–1087. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.080>
8. Uddin, M. B., Lee, B.-H., Nikapitiya, C., Kim, J.-H., Kim, T.-H., Lee, H.-C., Kim, C. G., Lee, J.-S., & Kim, C.-J. (2016a). Inhibitory effects of bee venom and its components against viruses in vitro and in vivo. *Journal of Microbiology*, 54(12), 853–866. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-6376-1>
9. Uddin, M. B., Lee, B. H., Nikapitiya, C., Kim, J. H., Kim, T. H., Lee, H. C., Kim, C. G., Lee, J. S., & Kim, C. J. (2016b). Inhibitory effects of bee venom and its components against viruses in vitro and in vivo. *Journal of Microbiology*, 54(12), 853–866. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-6376-1>
10. Hood, J. L., Jallouk, A. P., Campbell, N., Ratner, L., & Wickline, S. A. (2013). Cytolytic nanoparticles attenuate HIV-1 infectivity. *Antiviral Therapy*, 18(1), 95–103. <https://doi.org/10.3851/IMP2346>
11. Gekker, G., Hu, S., Spivak, M., Lokensgard, J. R., & Peterson, P. K. (2005). Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(2), 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.045>
12. Al-Hatamleh, M. A. I. I., Hatmal, M. M., Sattar, K., Ahmad, S., Mustafa, M. Z., Bittencourt, M. D. C., & Mohamud, R. (2020). Antiviral and Immunomodulatory Effects of Phytochemicals from Honey against COVID-19: Potential Mechanisms of Action and Future Directions. *Molecules*, 25(21), 5017. <https://doi.org/10.3390/molecules25215017>
13. Habashy, N. H., & Abu-Serie, M. M. (2020). The potential antiviral effect of major royal jelly protein2 and its isoform X1 against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Insight on their sialidase activity and molecular docking. *Journal of Functional Foods*, 75, 104282. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104282>
14. Hossain, K. S., Hossain, M. G., Moni, A., Rahman, M. M., Rahman, U. H., Alam, M., Kundu, S., Rahman, M. M., Hannan, M. A., & Uddin, M. J. (2020). Prospects of honey in fighting against COVID-19: pharmacological insights and therapeutic promises. *Heliyon*, 6(12), e05798. <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2020.E05798>

15. Berretta, A. A., Silveira, M. A. D., C ndor Capcha, J. M., & De Jong, D. (2020). Propolis and its potential against SARS-CoV-2 infection mechanisms and COVID-19 disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110622. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110622>
16. Lima, W. G., Brito, J. C. M., & Cruz Nizer, W. S. (2021). Bee products as a source of promising therapeutic and chemoprophylaxis strategies against COVID-19 (SARS-CoV-2). *Phytotherapy Research*, 35(2), 743–750. <https://doi.org/10.1002/ptr.6872>
17. Midgley, C. M., Watson, J. T., Nix, W. A., Curns, A. T., Rogers, S. L., Brown, B. A., Conover, C., Dominguez, S. R., Feikin, D. R., Gray, S., Hassan, F., Hoferka, S., Jackson, M. A., Johnson, D., Leshem, E., Miller, L., Nichols, J. B., Nyquist, A. C., Obringer, E., ... Gerber, S. I. (2015). Severe respiratory illness associated with a nationwide outbreak of enterovirus D68 in the USA (2014): A descriptive epidemiological investigation. *The Lancet Respiratory Medicine*, 3(11), 879–887. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00335-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00335-5)
18. Aliabadi, N., Messacar, K., Pastula, D. M., Robinson, C. C., Leshem, E., Sejvar, J. J., Nix, W. A., Oberste, M. S., Feikin, D. R., & Dominguez, S. R. (2016). Enterovirus D68 infection in children with acute flaccid Myelitis, Colorado, USA, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 22(8), 1387–1394. <https://doi.org/10.3201/eid2208.151949>
19. Hu, Y. L., Huang, L. M., Lu, C. Y., Fang, T. Y., Cheng, A. L., & Chang, L. Y. (2019). Manifestations of enterovirus D68 and high seroconversion among children attending a kindergarten. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 52(6), 858–864. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2019.04.010>
20. Mishra, N., Ng, T. F. F., Marine, R. L., Jain, K., Ng, J., Thakkar, R., Caciula, A., Price, A., Garcia, J. A., Burns, J. C., Thakur, K. T., Hetzler, K. L., Routh, J. A., Konopka-Anstadt, J. L., Nix, W. A., Tokarz, R., Briesse, T., Oberste, M. S., & Lipkin, W. I. (2019). Antibodies to Enteroviruses in Cerebrospinal Fluid of Patients with Acute Flaccid Myelitis. *MBio*, 10(4), e01903-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01903-19>
21. Vogt, M. R., Fu, J., Kose, N., Williamson, L. E., Bombardi, R., Setliff, I., Georgiev, I. S., Klose, T., Rossmann, M. G., Bochkov, Y. A., Gern, J. E., Kuhn, R. J., & Crowe, J. E. (2020). Human antibodies neutralize enterovirus D68 and protect against infection and paralytic disease. *Science Immunology*, 5(49), 4902. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aba4902>
22. Oermann, C. M., Schuster, J. E., Conners, G. P., Newland, J. G., Selvarangan, R., & Jackson, M. A. (2015). Enterovirus D68: A focused review and clinical highlights from the 2014 U.S. outbreak. *Annals of the American Thoracic Society*, 12(5), 775–781. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201412-592FR>
23. Hierholzer, J. C., & Killington, R. A. (1996). Virus isolation and quantitation. In B. W. Mahy & H. O. Kangro (Eds.), *Virology Methods Manual* (pp. 25–46). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012465330-6/50003-8>
24. van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2011). Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In I. Cree (Ed.), *Cancer Cell Culture. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (pp. 237–245). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20
25. Casas, I., Powell, L., Klapper, P. E., & Cleator, G. M. (1995). New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *Journal of Virological Methods*, 53(1), 25–36. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(94\)00173-E](https://doi.org/10.1016/0166-0934(94)00173-E)
26. Monpoeho, S., Deh e, A., Mignotte, B., Schwartzbrod, L., Marechal, V., Nicolas, J. C., Billaudel, S., & F err , V. (2000). Quantification of enterovirus RNA in sludge samples using single tube real-time RT-PCR. *BioTechniques*, 29(1), 88–93. <https://doi.org/10.2144/00291st03>
27. Pritchett, J. C., Naesens, L., & Montoya, J. (2014). Treating HHV-6 Infections: The Laboratory Efficacy and Clinical Use of Anti-HHV-6 Agents. In L. Flamand, I. Lautenschlager, G. R. F. Krueger, & D. V. Ablashi (Eds.), *Human Herpesviruses HHV-6A, HHV-6B, and HHV-7* (Third edit, pp. 311–331). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62703-2.00019-7>

28. Cavalli, R., Donalisio, M., Bisazza, A., Civra, A., Ranucci, E., Ferruti, P., & Lembo, D. (2012). Enhanced Antiviral Activity of Acyclovir Loaded into Nanoparticles. In N. Düzgüneş (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 509, pp. 1–19). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391858-1.00001-0>
29. Stagos, D., Soulitsiotis, N., Tsadila, C., Papaeconomou, S., Arvanitis, C., Ntontos, A., Karkanta, F., Adamou-Androulaki, S., Petrotos, K., Spandidos, D. A., Kouretas, D., & Mossialos, D. (2018). Antibacterial and antioxidant activity of different types of honey derived from Mount Olympus in Greece. *International Journal of Molecular Medicine*, 42(2), 726–734. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3656>
30. Ha, T. K. Q., Lee, B. W., Nguyen, N. H., Cho, H. M., Venkatesan, T., Doan, T. P., Kim, E., & Oh, W. K. (2020). Antiviral Activities of Compounds Isolated from *Pinus densiflora* (Pine Tree) against the Influenza A Virus. *Biomolecules*, 10(5), 711. <https://doi.org/10.3390/biom10050711>
31. Esawy, M. A., Ahmed, E. F., Helmy, W. A., Mansour, N. M., El-Senousy, W. M., & El-Safty, M. M. (2011). Production of levansucrase from novel honey *Bacillus subtilis* isolates capable of producing antiviral levans. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), 823–830. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.05.035>
32. Zhang, T., Ren, L., Luo, M., Li, A., Gong, C., Chen, M., Yu, X., Wu, J., Deng, Y., & Huang, F. (2015). Enterovirus D68–Associated Severe Pneumonia, China, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 21(5), 916–918. <https://doi.org/10.3201/eid2105.150036>
33. Chauhan, R.P.; Gordon, M.L. An overview of influenza A virus genes, protein functions, and replication cycle highlighting important updates. *Virus Genes* 2022, 58, 255–269
34. Wang, J.; Sun, Y.; Liu, S. Emerging antiviral therapies and drugs for the treatment of influenza. *Expert Opin. Emerg. Drugs* 2022, 27, 389–403.
35. Govorkova, E.A.; Takashita, E.; Daniels, R.S.; Fujisaki, S.; Presser, L.D.; Patel, M.C.; Huang, W.; Lackenby, A.; Nguyen, H.T.; Pereyaslov, D.; et al. Global update on the susceptibilities of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir, 2018–2020. *Antivir. Res.* 2022, 200, 105281.
36. Asoutis Didaras, N., Dimitriou, T., Daskou, M., Karatasou, K. ., & Mossialos, D. (2022). IN VITRO ASSESSMENT OF THE ANTIVIRAL ACTIVITY OF GREEK BEE BREAD AND BEE COLLECTED POLLEN AGAINST ENTEROVIRUS D68. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 11(4), e4859. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.4859>
37. Pfannebecker, J.; Schiffer-Hetz, C.; Fröhlich, J.; Becker, B. Culture medium optimization for osmotolerant yeasts by use of a parallel fermenter system and rapid microbiological testing. *J. Microbiol. Methods* 2016, 130, 14–22.
38. Tsadila, C.; Nikolaidis, M.; Dimitriou, T.G.; Kafantaris, I.; Amoutzias, G.D.; Pournaras, S.; Mossialos, D. Antibacterial Activity and Characterization of Bacteria Isolated from Diverse Types of Greek Honey against Nosocomial and Foodborne Pathogens. *Appl. Sci.* 2021, 11, 5801
39. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018, 35, 1547–1549
40. Wingfield, P. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. In *Current Protocols in Protein Science*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 1998; Volume Appendix 3, pp. A.3F.1–A.3F.8.
41. Acar Şahin, A.; Aslım, B.; Tan, S.; Alan, Ş.; Pınar, N.M. Differences in structure, allergenic protein content and pectate lyase enzyme activity of some Cupressaceae pollen. *Turk. J. Biochem.* 2018, 43, 435–446
42. Tsami, K.; Barda, C.; Ladopoulos, G.; Didaras, N.A.; Grafakou, M.-E.; Heilmann, J.; Mossialos, D.; Rallis, M.C.; Skaltsa, H. Chemical Profile and *In Vitro* Evaluation of the Antibacterial Activity of *Dioscorea communis* Berry Juice. *Sci* 2022, 4, 21
43. Eisfeld, A.J.; Neumann, G.; Kawaoka, Y. Influenza A virus isolation, culture and identification. *Nat. Protoc.* 2014, 9, 2663–2681

44. Di Cagno, R.; Filannino, P.; Cantatore, V.; Gobbetti, M. Novel solid-state fermentation of bee-collected pollen emulating the natural fermentation process of bee bread. *Food Microbiol.* 2019, 82, 218–230
45. Kaškonienė, V.; Adaškevičiūtė, V.; Kaškonas, P.; Mickienė, R.; Maruška, A. Antimicrobial and antioxidant activities of natural and fermented bee pollen. *Food Biosci.* 2020, 34, 100532
46. Adaškevičiūtė, V.; Kaškonienė, V.; Barčauskaitė, K.; Kaškonas, P.; Maruška, A. The Impact of Fermentation on Bee Pollen Polyphenolic Compounds Composition. *Antioxidants* 2022, 11, 645
47. Vásquez, A.; Olofsson, T.C. The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *J. Apic. Res.* 2009, 48, 189–195
48. Gilliam, M. Microbiology of pollen and bee bread: The yeasts. *Apidologie* 1979, 10, 43–53
49. Saksinchai, S.; Suzuki, M.; Lumyong, S.; Ohkuma, M.; Chantawannakul, P. Two new species of the genus *Candida* in the *Zygoascus* clade, *Candida lundiana* sp. nov. and *Candida suthepensis* sp. nov., isolated from raw honey in Thailand. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2012, 101, 633–640
50. Poyraz, F.; Yalman, D.; İspirli, H.; Dertli, E. Characterization of Bee Bread Produced with Defined Starter Cultures Mimicking the Natural Fermentation Process. *Fermentation* 2023, 9, 174.
51. Gilliam, M. Microbiology of pollen and bee bread: The genus *Bacillus*. *Apidologie* 1979, 10, 269–274
52. Peřka, K.; Worobo, R.W.; Walkusz, J.; Szwed, P. Bee Pollen and Bee Bread as a Source of Bacteria Producing Antimicrobials. *Antibiotics* 2021, 10, 713
53. Barda, C.; Anastasiou, K.; Tzara, A.; Grafakou, M.-E.; Kalpoutzakis, E.; Heilmann, J.; Rallis, M.; Kourounakis, A.P.; Skaltsa, H. A Bio-Guided Screening for Antioxidant, Anti-Inflammatory and Hypolipidemic Potential Supported by Non-Targeted Metabolomic Analysis of *Crepis* spp. *Molecules* 2022, 27, 6173
54. Bakour, M.; Laaroussi, H.; Ousaid, D.; El Ghouzi, A.; Es-Safi, I.; Mechchate, H.; Lyoussi, B. Bee Bread as a Promising Source of Bioactive Molecules and Functional Properties: An Up-To-Date Review. *Antibiotics* 2022, 11
55. Peršurić, Ž.; Pavelić, S.K. Bioactives from Bee Products and Accompanying Extracellular Vesicles as Novel Bioactive Components for Wound Healing. *Molecules* 2021, 26, 3770
56. Alotaibi, M.; Ali, A.; Bakhshwin, D.; Alatawi, Y.; Alotaibi, S.; Alhifany, A.; Alharthi, B.; Alharthi, N.; Alyazidi, A.; Alharthi, Y.; et al. Effectiveness and Safety of Favipiravir Compared to Hydroxychloroquine for Management of Covid-19: A Retrospective Study. *Int. J. Gen. Med.* 2021, 14, 5597–5606
57. Dimitriou TG, Asoutis Didaras N, Barda C, Skopeliti D, Kontogianni K, Karatasou K, Skaltsa H, Mossialos D. Antiviral Activity of Beebread, Bee-Collected Pollen and Artificially Fermented Pollen against Influenza A Virus. *Foods*. 2023; 12(10):1978. <https://doi.org/10.3390/foods12101978>

Γ. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ1. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ – ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ - ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ

Γ.1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Έχει προταθεί ότι οι μέλισσες εξελίχθηκαν πριν από περίπου 123 εκατομμύρια χρόνια από σαρκοφάγα είδη σφήκας που αντικατέστησαν το κρέας (ως πηγή τροφής) με γύρη. Η μετάβαση σε μια χορτοφαγική διατροφή σχετίζεται και με τον αποικισμό του πεπτικού συστήματος (ειδικότερα του εντέρου) αυτής της προγονικής σφήκας με νέες μικροβιακές κοινότητες οι οποίες διευκολύνουν την πέψη της γύρης [1].

Πέραν των δυσκολιών που εμφανίζει η πέψη της γύρης [2,3], η καλής ποιότητας, θρεπτική γύρη δεν είναι πάντα άφθονη κατά τη διάρκεια του έτους [4]. Επίσης η ΓΜ είναι μια ευαλλοίωτη τροφή που αλλοιώνεται εύκολα στο ζεστό περιβάλλον της κυψέλης, λόγω της σχετικά υψηλής περιεκτικότητάς της σε νερό και της πληθώρας θρεπτικών συστατικών [5]. Οι μέλισσες κατάφεραν να προσαρμοστούν στις συνθήκες αυτές μετατρέποντας τη ΓΜ σε ΜΨ, μια τροφή που έχει υποστεί ζύμωση και μπορεί να αποθηκευτεί και να διατηρηθεί στην κυψέλη για μεγάλο χρονικό διάστημα. Επιπλέον, το ΜΨ θεωρείται πιο θρεπτικό και βιοδραστικό σε σύγκριση με τη ΓΜ και χαρακτηρίζεται ως μια εξαιρετική λειτουργική τροφή [6,7,8,9,10,11].

Στη γύρη που συλλέγουν οι μέλισσες προστίθενται αδενικές εκκρίσεις των μελισσών μαζί με νέκταρ και μέλι, συμπεριλαμβανομένων και συμβιωτικών μικροοργανισμών του ανώτερου πεπτικού συστήματος της μέλισσας και των αδένων που συνδέονται με αυτό. Τέλος μια ευρεία, ετερογενής κοινότητα μικροοργανισμών φυτικής και περιβαλλοντικής προέλευσης βρίσκεται στη ΓΜ και φυσικά στο ΜΨ [12,13,14,15]. Πρόσφατες μελέτες έχουν δημοσιευτεί σχετικά με τη βιοδραστικότητα του ΜΨ με ιδιαίτερη έμφαση στις αντιμικροβιακές ιδιότητές του [9,16,17], ωστόσο η βιβλιογραφία είναι ελάχιστη γύρω από το μικροβίωμα του ΜΨ και το πώς συμβάλλει σε αυτή τη βιοδραστικότητα.

Το μικροβίωμα του ΜΨ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατροφή και την ανάπτυξη των μελισσών [18,19]. Έχει αναφερθεί ότι οι μικροοργανισμοί διευκολύνουν την ενζυμική πρόπεψη (μικροβιακή πέψη) των κόκκων της γύρης, αυξάνοντας έτσι την πεπτικότητα της γύρης και τη βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών της [20,21]. Μέχρι στιγμής, η αντιμικροβιακή δράση και το βιοσυνθετικό δυναμικό του μικροβιώματος του ΜΨ είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστα. Οι Pelka et al., έχουν δείξει ότι βάκιλλοι που απομονώθηκαν από ΓΜ και ΜΨ έχουν αντιμικροβιακή δράση και παράγουν λιπολυτικά, πρωτεολυτικά, κυτταρινολυτικά και εστερολυτικά ένζυμα [22].

Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι το ΜΨ ασκεί σημαντικά υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση από τη ΓΜ [9]. Ομοίως, αξιοσημείωτη είναι η αντιβακτηριακή δράση που ασκεί το ΜΨ σε υδατικά εναιωρήματα έναντι σημαντικών κλινικών παθογόνων βακτηρίων [23, 24]. Η εφαρμογή χημικών διαλυτών όπως η αιθανόλη, η μεθανόλη, ο αιθέρας ή η εφαρμογή άλλων τεχνικών επεξεργασίας όπως η χρήση υπερήχων ή μικροκυμάτων, οδηγεί σε ρήξη των γυρεοκόκκων αυξάνοντας έτσι τη διαθεσιμότητα γνωστών αντιμικροβιακών φυτοχημικών όπως οι πολυφαινόλες.

Το μικροβίωμα του ΜΨ αποτελείται τόσο από μικροοργανισμούς που προέρχονται από τα φυτά όσο και από μικροοργανισμούς που προέρχονται από τις μέλισσες, φαίνεται όμως ότι αυτοί που προέρχονται από τις μέλισσες είναι σχετικά πιο άφθονοι. Έχει αναφερθεί ότι οι αλλαγές στη μικροβιολογική και βιοχημική σύνθεση του ΜΨ ξεκινούν μόλις συλλεχθεί η γύρη [20].

Δεδομένου ότι οι εννέα βακτηριακοί φυλότυποι, που αποτελούν το βασικό (πυρηνικό) βακτηρίωμα του εντέρου των ενήλικων εργατριών μελισσών, εκπροσωπούνται ελάχιστα στο ΜΨ [18,25], έχει προταθεί ότι ως επί το πλείστον στο μικροβίωμα του ΜΨ απαντώνται μικροοργανισμοί από τον πρόλοβο της μέλισσας (στομάχι μελιού), συμπεριλαμβανομένης μιας ποικιλίας λακτοβακίλων [26,27].

Οι συλλέκτριες μέλισσες εμβολιάζουν τη γύρη που συλλέγουν από τα άνθη με βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) που προέρχονται από τον πρόλοβό τους [12]. Πράγματι, οι εργάτριες μέλισσες που συλλέγουν γύρη αναρροφούν το νέκταρ από τον προστόμαχο, το οποίο προστίθεται στη συλλεγόμενη γύρη για να σχηματίσουν τα μπαλάκια γύρης που εναποθέτουν στο καλάθι της γύρης και μεταφέρουν πίσω στην κυψέλη. Τα μπαλάκια της γύρης καταλήγουν μέσα στην κυψέλη στα κελιά των κηρηθρών όπου οι μέλισσες μέσης ηλικίας τα επεξεργάζονται περαιτέρω προσθέτοντας μέλι και αδενικές εκκρίσεις. Τέλος, οι μέλισσες συμπιέζουν τα σφαιρίδια γύρης με το κεφάλι τους μέσα στα κελιά και η ΓΜ μετατρέπεται σε ΜΨ μέσω της ζύμωσης στερεάς κατάστασης που λαμβάνει χώρα [28].

Έχει προταθεί ότι εντός του ΜΨ, στις φυσικές συνθήκες που επικρατούν στα κελιά της κηρήθρας, μπορεί να επικρατούν αερόβιες, αναερόβιες ή μικροαερόφιλες συνθήκες [29] οι οποίες επηρεάζουν τόσο την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό όσο και το μεταβολισμό των μικροοργανισμών [30,31,32,33] άρα και τους μεταβολίτες που περιέχονται στο ΜΨ (αναερόβια ή αερόβια ζύμωση) [34,35].

Μελέτες έχουν διεξαχθεί όσον αφορά την ύπαρξη LAB, που είχαν απομονωθεί από το στομάχι μελισσών, σε δείγματα ΜΨ ηλικίας έως και δύο μηνών. Εντοπίστηκαν δώδεκα είδη βακτηρίων που ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*, τα περισσότερα από τα οποία παρέμειναν βιώσιμα στη ΓΜ και στο ΜΨ ηλικίας δύο εβδομάδων αλλά όχι σε δείγματα ΜΨ μεγαλύτερης ηλικίας [12, 36]. Τα LAB μπορεί να θεωρηθούν ως η καλλιέργεια εκκίνησης στη ζύμωση του ΜΨ [12,28] και είναι γνωστό ότι παράγουν αντιμικροβιακές ενώσεις που θα μπορούσαν να συμβάλλουν τόσο στη διατήρηση του ΜΨ μέσα στο περιβάλλον της κυψέλης όσο και να προστατεύσουν τις μέλισσες από ασθένειες [12,27,37]. Οι ζυμομύκητες υπάρχουν επίσης στο ΜΨ [30,28,33] και συμμετέχουν στη ζύμωση του.

Πρόσφατα, οι Dranca et al [35] ανέφεραν ότι δεν ανίχνευσαν γαλακτικό οξύ σε δικά τους δείγματα ΜΨ αλλά, αντίθετα, το γλυκονικό οξύ ήταν το πιο άφθονο οργανικό οξύ. Ανέφεραν ότι το ώριμο ΜΨ, περιείχε 97,9 g/kg οργανικά οξέα, με κύριο το γλυκονικό οξύ (79,2 g/kg), ακολουθούμενο από το οξικό οξύ (10,4 g/kg) και το μυρμηκικό οξύ (6,75 g/kg). Ανιχνεύθηκαν επίσης προπιονικό οξύ (1,30 g/kg) και βουτυρικό οξύ (0,33 g/kg). Το γλυκονικό οξύ παράγεται από τη γλυκόζη είτε από το ένζυμο οξειδάση γλυκόζης που παράγεται συνήθως από μύκητες είτε από το ένζυμο αφυδρογονάση της γλυκόζης που παράγεται από βακτήρια όπως το *Glucanobacter* όποτε επικρατούν αερόβιες συνθήκες ζύμωσης [38].

Συνολικά, το μικροβίωμα του ΜΨ αποτελείται από μικροβιακές κοινότητες που ακμάζουν ή χάνονται κατά την ωρίμανση του. Η Gilliam (1997) ήταν η πρώτη που πρότεινε ότι κατά τη μετατροπή της ΓΜ σε ΜΨ λαμβάνει χώρα μικροβιακή διαδοχή. Πρόσφατη έρευνα έχει δείξει ότι η ποικιλομορφία και η δομή των κοινοτήτων του μικροβιώματος του ΜΨ αλλάζουν πράγματι κατά την ωρίμανση [39,28,40,33].

Στόχος στην παρούσα διατριβή ήταν η διερεύνηση του μικροβιώματος του ΜΨ, από την πρώιμη ζύμωση έως την ωρίμανση, και ο εντοπισμός των σχετικά πιο άφθονων μικροβιακών ομάδων με τη χρήση μεταταξινομικών μεθόδων (Next Generation Sequencing, NGS) αλλά και μεθόδων κλασσικής μικροβιολογίας. Επιπλέον διερευνήσαμε εάν συγκεκριμένα ένζυμα, όπως αμυλάσες, πρωτεϊνάσες, ημικυτταρινάσες, κυτταρινάσες και λακάσες που πιθανώς διευκολύνουν την πέψη των κόκκων της γύρης παράγονται από βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από το ΜΨ.

Τέλος, αξιολογήθηκε η αντιμικροβιακή δράση απομονωμένων βακτηριακών στελεχών του μελισσόψωμου έναντι σημαντικών ανθρώπινων παθογόνων, προκειμένου αυτά να αξιοποιηθούν τόσο για τη διερεύνηση της συμβολής του μικροβιώματος στην αντιμικροβιακή δράση που ασκεί το ΜΨ και η τεχνητά ζυμωμένη γύρη όσο και για τη μελλοντική απομόνωση αντιμικροβιακών παραγόντων (έχουν περιγραφεί στα κεφάλαια B2 και B3-2 της παρούσας διατριβής).

Γ.1.2. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Από τα 11 συνολικά δείγματα (Πίνακας 23), τα 10 συγκομίστηκαν *in situ* από μελισσοσμήνη που βρίσκονται εγκατεστημένα στο Πήλιο, μια περιοχή γνωστή για την πλούσια ποικιλότητα της χλωρίδας, που προσελκύει πολλούς μελισσοκόμους. Το δείγμα 11 συλλέχθηκε από πλαίσιο κυψέλης που περιείχε ανοιξιάτικο ΜΨ και παρασχέθηκε από μελισσοκόμο από το Ρέθυμνο της Κρήτης.

Η δειγματοληψία στο Πήλιο έγινε μετά την τοποθέτηση κενών, σημαδεμένων πλαισιοκηρηθρών στα μελίσσια. Η επιφάνεια κάθε πλαισιοκηρήθρας χωρίστηκε σε πέντε τμήματα. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε από κάθε τμήμα της σε διαφορετικό χρονικό σημείο. ΜΨ 1 ημέρας (δείγματα S2 και S7) συλλέχθηκε την πρώτη ημέρα μετά την τοποθέτηση του κενού πλαισίου από ένα από τα πέντε τμήματά του και από το τμήμα αυτό δεν ξανασυλλέχθηκε ΜΨ. ΜΨ 11 ημερών (δείγματα S3 και S8) συλλέχθηκε από άλλο τμήμα του πλαισίου και ούτω καθεξής για ΜΨ 27 ημερών (δείγματα S4 και S9) και 41 ημερών (δείγμα S5). Επισημαίνεται ότι η κηρήθρα γέμισε με ΓΜ σε λίγες μέρες διότι υπήρχε άφθονη, οπότε ήταν εύκολο να υπολογίσουμε την ηλικία του ΜΨ. Επιπλέον η κενή κηρήθρα τοποθετήθηκε σε απόσταση 2 πλαισίων από το γόνο ώστε να μην καταναλώνεται η αποθηκευμένη γύρη σε μεγάλο βαθμό από τις παραμάνες, χωρίς να μπορούμε όμως να το αποκλείσουμε.

Για να γνωρίζουμε με ακρίβεια την ηλικία του ΜΨ από τη 12η ημέρα και μετά το πλαίσιο που χρησιμοποιήθηκε για τη δειγματοληψία απομονώθηκε μέσα στο περιβάλλον της κυψέλης (τοποθετώντας το μέσα σε ένα ξύλινο πλαίσιο με μεταλλικό δίκτυο αποκλείοντας τις μέλισσες από αυτό). Με αυτό τον τρόπο οι μέλισσες δεν μπορούσαν να καταναλώσουν το αποθηκευμένο ΜΨ ούτε να προσθέσουν γύρη σε αυτό (μετά την απομόνωση λήφθηκαν τα δείγματα S4, S5 και S9). Η ΓΜ συλλέχτηκε με παγίδες εισόδου 24 ώρες μετά την τοποθέτησή τους (ΓΜ 1 ημέρας, δείγματα S1 και S6). Τα δείγματα S1 και S6 προέκυψαν με διαίρεση του ίδιου αρχικού δείγματος, το ίδιο ισχύει και για τα δείγματα του ΜΨ S2 και S7, τα δείγματα S3 και S8 και τα δείγματα S4 και S9 αντίστοιχα.

Τα δείγματα συλλέχθηκαν με τη χρήση αποστειρωμένων υλικών και γαντιών σε κλειστό χώρο πλησίον του μελισσοκομείου αποκλείοντας κατά το δυνατό τις επιμολύνσεις ώστε να είναι δυνατή η διερεύνηση της ποικιλότητας και της σχετικής αφθονίας των μικροβιακών κοινοτήτων στα διαφορετικά στάδια ωρίμανσης του ΜΨ.

Για την απομόνωση βακτηρίων ΜΨ χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα S5, S11 και S12. Αν και δεν έγινε μελισσοπαλυνολογική ανάλυση, οι μελισσοκόμοι παρείχαν πληροφορίες σχετικά με τη βοτανική προέλευση της συλλεγόμενης γύρης. Όσον αφορά τα δείγματα S1-S9 οι πιο άφθονες φυτικές οικογένειες, είδη των οποίων βρίσκονταν σε άνθηση τη συγκεκριμένη περίοδο συλλογής, ήταν οι *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Cistaceae*, *Brassicaceae*, *Ranunculaceae* και *Papaveraceae*. Όσον αφορά το δείγμα S11 οι πιο άφθονες φυτικές οικογένειες, είδη των οποίων βρίσκονταν σε άνθηση τη συγκεκριμένη περίοδο συλλογής ήταν οι *Lamiaceae*, *Cistaceae*, *Brassicaceae*, *Papaveraceae* και *Ranunculaceae*. Όσον αφορά το δείγμα S12 οι πιο άφθονες φυτικές οικογένειες είδη των οποίων βρίσκονταν σε άνθηση τη συγκεκριμένη περίοδο συλλογής ήταν οι *Ericaceae* (κουμαριές και φθινοπωρινά ρείκια), *Asteraceae* (ακονιζά, ραδίκια κ.α.) και *Asparagaceae* (αγριοσπαραγγιές, *Asparagus acutifolius*).

Πίνακας 23. Βοτανική προέλευση, τοποθεσία και μήνας συγκομιδής δειγμάτων ΓΜ και ΜΨ.

Δείγματα	Ηλικία του ΜΨ και της ΓΜ	Μήνας	Περιοχή	Βοτανική προέλευση
S1 και S6	1 ημέρας ΓΜ	Μάιος	Πήλιο	Πολυανθικό
S2 και S7	1 ημέρας ΜΨ	Μάιος	Πήλιο	Πολυανθικό
S3 και S8	11 ημερών ΜΨ	Μάιος	Πήλιο	Πολυανθικό
S4 και S9	27 ημερών ΜΨ	Ιούνιος	Πήλιο	Πολυανθικό
S5	41 ημερών ΜΨ	Ιούνιος	Πήλιο	Πολυανθικό
S11	Άγνωστη	Μάιος	Ρέθυμνο, Κρήτη	Πολυανθικό
S12	34 ημερών ΜΨ	Οκτώβριος	Πήλιο	Πολυανθικό

ΜΕΤΑΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΣΩ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΕΠΟΜΕΝΗΣ ΓΕΝΙΑΣ (NGS) ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΨ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΟΥ.

Το ολικό DNA εκχυλίστηκε από 0,2 g υλικού για κάθε δείγμα (δείγματα S1-S9), χρησιμοποιώντας το κιτ τροφίμων Macherey Nagel NucleoSpin (Γαλλία) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το εκχυλισμένο DNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την ενίσχυση της περιοχής V3-V4 του γονιδίου 16S rRNA, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') και 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'). Ομοίως, η περιοχή ITS1 των μυκήτων ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας τους εκκινητές ITS1-1F-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') και ITS1-1F-R (5'-GCTGCGTTCTTCTCATCGATGC-3'). Η ποιότητα των ενισχυμένων περιοχών (αμπλικόνια) αξιολογήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης και η συγκέντρωση και καθαρότητά του με φωτομέτρηση σε nanodrop. Στη συνέχεια, τα προϊόντα PCR χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή βιβλιοθήκης των ενισχυμένων περιοχών. Ακολούθως η βιβλιοθήκη αλληλουχήθηκε και προς τις δύο κατευθύνσεις σε πλατφόρμα Illumina MiSeq PE250 (Macrogen, Ν. Κορέα). Όλη η διαδικασία της NGS υλοποιήθηκε από την εταιρεία Macrogen. Οι αναγνώσεις των αλληλουχιών κατατέθηκαν στη βάση δεδομένων NCBI Sequence Read Archive (SRA) (Bioproject: PRJNA846146, Accession Numbers: SAMN28869225- SAMN28869233).

ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η βιοπληροφορική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοπληροφορικής του τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Η επεξεργασία των ακατέργαστων δεδομένων των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με την πλατφόρμα QIIME2 [44]. Η αφαίρεση θορύβου και το φιλτράρισμα χιμαιρικών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκαν με το DADA2 [45] ενώ οι βακτηριακές αλληλουχίες περικόπηκαν (μετά από επιθεώρηση των βαθμολογιών FASTQ) στα 290 και 220 νουκλεοτίδια για τις εμπρός και τις αντίστροφες αναγνώσεις αντίστοιχα. Οι μυκητιακές αλληλουχίες προς τα εμπρός και αντίστροφα περικόπηκαν στα 240 και 180 νουκλεοτίδια αντίστοιχα. Το φιλτράρισμα χιμαιρας βασίστηκε στην default consensus μέθοδο.

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση ποικιλομορφίας με αποκοπή βάθους δειγματοληψίας 5000 για 16S και 30000 για ITS. Υπολογίστηκαν οι δείκτες α -ποικιλότητας (Πίνακας 25) και οι δείκτες β -ποικιλότητας (πίνακας 26). Η ταξινομική κατάταξη βασίστηκε στην έκδοση 132 της βάσης δεδομένων 16S Silva (SILVA_132_97_16S.fna) [46] και στην έκδοση 8 της βάσης δεδομένων UNITE ITS (ver8_97_02.02.2019) (Kõljalg, with thehmse0019). Η ταξινόμηση βασίστηκε στην ταυτότητα νουκλεοτιδίων κατά 97%. Προκειμένου να αναγνωριστεί το βασικό μικροβίωμα εφαρμόστηκε ένα φίλτρο όπου η αφθονία κάθε γένους καθορίστηκε να είναι τουλάχιστον 3% επί των συνολικών αλληλουχιών.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΣΙΜΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΖΥΜΩΝ ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΨ

Τα βακτήρια απομονώθηκαν με επίστρωση 100 μ l από διαφορετικές αραιώσεις κάθε δείγματος ΜΨ (δείγματα S5, S11, S12) σε αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό (αραιώσεις 10^{-1} , 10^{-2} και 10^{-3}) σε έξι τρυβλία από κάθε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε. Από τα έξι αυτά τρυβλία τα τρία επώαστηκαν στους 37°C και τα υπόλοιπα στους 30°C τουλάχιστον για 5 ημέρες. Τα επιλεγμένα μέσα καλλιέργειας για την απομόνωση διαφορετικών βακτηριακών ομάδων ήταν: Plate Count Agar (PCA) (Neogen, Heywood, UK), Medium *Bacillus cereus* (LAB M, Bury, UK), που περιέχει 1,5% βακτηριολογικό άγαρ και πολυμυξίνη B (LAB M, Bury, UK) και Man Rogosa Sharpe (MRS) (NEOGEN, Heywood, UK). Τα τρυβλία Man Rogosa Sharpe (MRS) (NEOGEN, Heywood, UK) επώαστηκαν αναερόβια σε AnaeroJar AG25 με το σύστημα AnaeroGen Atmosphere Generation (Oxoid, Basingstoke, UK) στους 30 °C για περίπου 5 ημέρες. Για την απομόνωση των ζυμών χρησιμοποιήθηκε στερεό υπόστρωμα με 45% γλυκόζη, 5% φρουκτόζη, 0,5% NaCl, 0,5% w/v εκχύλισμα ζύμης (Neogen, Heywood, UK) και έγινε επώαση στους 30° C έως ανάπτυξης των αποικιών. Σε περίπτωση ανάπτυξης μορφολογικά ταυτόσημων αποικιών σε ένα από τα παραπάνω καλλιεργητικά μέσα τουλάχιστον τρεις από αυτές συλλέχθηκαν με εξαίρεση το θρεπτικό MRS από το οποίο συλλέχθηκαν όλες οι αποικίες. Στη συνέχεια για τη λήψη καθαρών αποικιών έγινε επίστρωση σε γραμμές, των αποικιών που είχαν συλλεχθεί, σε υπόστρωμα PCA για τα βακτήρια και potato dextrose agar (PDA) (Biolab, Hungary) για τις ζύμες. Η επώαση έγινε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι καθαρές καλλιέργειες που ελήφθησαν αποθηκεύτηκαν σε ζωμό Nutrient Broth (Biolab, Ουγγαρία) που περιείχε 0,5% w/v εκχύλισμα ζύμης (Neogen, Heywood, UK), 0,5% w/v γλυκόζη (SERVA, Heidelberg, GmbH) και 20 % w/v γλυκερόλη (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, ΗΠΑ) στους -80° C, μέχρι περαιτέρω ανάλυση.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΤΟΥ ΜΨ

Η μέθοδος της κάθετης επίστρωσης σε γραμμές (cross streaking) εφαρμόστηκε για την αξιολόγηση των αντιβακτηριακών ιδιοτήτων των απομονωμένων βακτηρίων του ΜΨ έναντι παθογόνων. Κάθε βακτήριο του ΜΨ που δοκιμάστηκε εμβολιάστηκε σε τρυβλία με υπόστρωμα PCA σε μια γραμμή. Μετά από αρκετό χρόνο επώασης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος που επέτρεψε στα στελέχη να αναπτυχθούν σε όλο το μήκος της γραμμής και σε πλάτος τουλάχιστον 5 mm, εμβολιάστηκαν τα παθογόνα βακτήρια με κατεύθυνση κάθετη ως προς τη γραμμή που αναπτύχθηκαν τα βακτήρια του ΜΨ. Ακολούθησε επώαση στους 37° C για 24 ώρες και για λακτοβάκιλους που εμφάνιζαν ισχυρή αντιβακτηριδιακή δράση αυτή παρατάθηκε έως και 5 ημέρες. Για τη σπορά των παθογόνων βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν φρέσκιες υγρές καλλιέργειες [επώαση στους 37° C για περίπου 16 ώρες σε ζωμό Mueller Hinton (NEOGEN, Heywood, UK)]. Πριν τον εμβολιασμό η απορρόφηση της κάθε καλλιέργειας παθογόνου βακτηρίου προσαρμόστηκε σε OD 600nm=0,1 και αραιώθηκε περαιτέρω 1/10 σε αποστειρωμένο ζωμό Muller-Hinton. Μετρήθηκε και καταγράφηκε η αναστολή της ανάπτυξης του παθογόνου και συγκεκριμένα μετρήθηκε η απόσταση από τη γραμμή ανάπτυξης των βακτηρίων του ΜΨ.

Από τις μετρήσεις δημιουργήθηκαν οι πίνακες ποσοτικοποίησης της αντιβακτηριδιακής δράσης. Κάθε δοκιμή για κάθε ένα από τα απομονωμένα βακτήρια του ΜΨ και για κάθε παθογόνο πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις φορές σε τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές.

Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα κλινικά παθογόνα: *Staphylococcus aureus* 1552 MRSA, ανθεκτική στην καρβαπενέμη *Pseudomonas aeruginosa* 1773, *Salmonella enterica* ser. Typhimurium και *Klebsiella pneumoniae*. Τα παθογόνα στελέχη απομονώθηκαν, ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν με τυπικές εργαστηριακές μεθόδους στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αττικών και παραχωρήθηκαν από τον Καθηγητή Κλινικής Μικροβιολογίας Σπυρίδωνα Πουρνάρα, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ [47].

ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΕΝΖΥΜΩΝ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΤΟΥ ΜΨ

Προκειμένου να ελεγχθεί εάν τα βακτήρια που απομονώθηκαν από το ΜΨ παράγουν ένζυμα - όπως αμυλάσες, πρωτεϊνάσες, ημικυτταρινάσες, κυτταρινάσες, συμπεριλαμβανομένων ενζύμων που διασπούν χρωστικές όπως οξειδάσες χαλκού (λακκάσες), οξειδάσες μαγγανίου και οξειδάσες λιγνίνης [48]- αυτά αναπτύχθηκαν σε τρυβλία PCA παρουσία κατάλληλων υποστρωμάτων (βλέπε παρακάτω). Τα βακτήρια επωάζονταν για 1-7 ημέρες στους 37°C και κάθε μέρα ελέγχονταν για την ανίχνευση θετικού φαινοτύπου.

- Δραστικότητα αμυλάσης: PCA + 1% άμυλο. Μια διαυγής ζώνη ανιχνεύθηκε γύρω και κάτω από την βακτηριακή αποικία λόγω της διάσπασης του αμύλου. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η δραστικότητα αμυλάσης, το τρυβλίο καλύφθηκε με διάλυμα ιωδίου 1% για 5-10 λεπτά. Κατόπιν πλύθηκε με απιονισμένο νερό και στη συνέχεια με τη χρήση φωτός παρατηρήθηκε η ύπαρξη ή μη φωτεινών ζωνών λόγω διάσπασης ή μη του αμύλου [49]. Φωτεινές ζώνες υποδήλωναν τη διάσπαση του αμύλου. Για την πλήρη επιβεβαίωση παραγωγής αμυλάσης οι αποικίες με αρνητικό φαινότυπο αποκολλήθηκαν και στη συνέχεια προστέθηκε το διάλυμα ιωδίου. Διαπιστώθηκε ότι ορισμένες ταχέως αναπτυσσόμενες αποικίες ενώ ήταν θετικές στην παραγωγή αμυλάσης αυτό δεν έγινε αμέσως αντιληπτό λόγω της ταχύτητας αύξησής τους που κάλυπτε τις περιοχές διάχυσης του ενζύμου.

- Δραστηριότητα πρωτεάσης: PCA + 2% αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη. Μια διαυγής ζώνη σχηματίστηκε γύρω από τη βακτηριακή αποικία λόγω της διάσπασης των πρωτεϊνών του γάλακτος [22].

- Δραστικότητα ημικυτταρινάσης (ενδο- β 1,4-ξυλανάση): PCA + 0,02% w/v Megazyme AZCL-XYLAN (Megazyme, Bray, Ιρλανδία). Μια μπλέ ζώνη ανιχνεύθηκε γύρω από τη βακτηριακή αποικία λόγω της διάσπασης των κόκκων ημικυτταρίνης και της απελευθέρωσης της δεσμευμένης αζωχρωστικής [50].

- Δραστικότητα κυτταρίνης (ενδο-κυτταρινάση): PCA + 0,02% w/v Megazyme AZCL-HE-CELLULOSE (Megazyme, Bray, Ιρλανδία). Στην περίπτωση της έκκρισης κυτταρινάσης, σχηματίστηκε μια μπλέ ζώνη γύρω από τη βακτηριακή αποικία λόγω της διάσπασης των κόκκων κυτταρίνης και της απελευθέρωσης της αζωχρωστικής [51].

- Δοκιμασία Guaiacol και αποδόμηση χρωστικών: χρησιμοποιήθηκαν PCA + 0,02% w/v Coomassie Brilliant Blue G, PCA + 0,02% w/v Coomassie Brilliant Blue R, PCA + 10% v/v πράσινο του μαλαχίτη (οξαλικό διάλυμα 0,2% w/v), PCA με 0,5 mM γουαϊακόλη. Η έκκριση ενζύμων που διασπούν τις χρωστικές ανιχνεύθηκε από τη δημιουργία αποχρωματισμένης περιοχής γύρω από την βακτηριακή αποικία. Η εμφάνιση καφέ χρώματος στη δοκιμασία guaiacol θεωρήθηκε ως θετικός φαινότυπος [52].

- Προκειμένου να διαπιστώσουμε εάν σε φυσικές συνθήκες παράγονται στο ΜΨ κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες δοκιμάστηκαν για αυτό το σκοπό τα δείγματα ΜΨ από τα οποία απομονώθηκαν βακτήρια. Η δοκιμή έγινε χρησιμοποιώντας τα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα που έχουν αναφερθεί πιο πάνω για τα συγκεκριμένα ένζυμα. Στα τρυβλία ανοίχτηκαν φρεάτια διαμέτρου 6mm και στο καθένα από αυτά τοποθετήθηκαν 100μl από κάθε πρωτεϊνικό κλάσμα δείγματος ΜΨ. Τα πρωτεϊνικά κλάσματα παρασκευάστηκαν όπως έχει ήδη περιγραφεί στο κεφάλαιο B1 της παρούσας διατριβής.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΕΝΖΥΜΑ ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΜΨ

Τμήματα γονιδίων που κωδικοποιούν λακκάσες και ημικυτταρινάσες που παράγονται από βακτηριακά στελέχη ΜΨ με θετικό φαινότυπο ενισχύθηκαν με τη χρήση PCR. Για το γονίδιο της λακκάσας χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Cu1AF και Cu2R [53,54], για την ενίσχυση ενός τμήματος 142 bp. Το μίγμα αντίδρασης της PCR (συνολικός όγκος 50 μl) περιελάμβανε 1 mM dNTPs (Invitrogen), 1 x ρυθμιστικό διάλυμα B (Fastgene), 0,5 mM MgCl₂ (Fastgene), 25 pmol από κάθε εκκινητή, 3 μl εκχυλισμένου DNA (από το κάθε δοκιμαζόμενο βακτηριακό στέλεχος) και 1 μονάδα Taq Πολυμεράση (Fastgene NIPPONyo Genetics, Tok, , Ιαπωνία). Οι συνθήκες του θερμικού κυκλοποιητή Primus 25 (PEQLAB biotechnologie, Erlangen, Γερμανία) ήταν: 3 λεπτά στους 95°C για αρχική αποδιάταξη του διπλού κλώνου, ακολουθούμενοι από 30 κύκλους που περιλάμβαναν αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδισμός των εκκινητών στους 50°C για 30 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα, με τελική επέκταση 5 λεπτών στους 72°C. Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% (w/v), χρωματίστηκαν με βρωμιούχο αιθίδιο και οι ζώνες έγιναν ορατές υπό υπεριώδες φως.

Για τα γονίδια ενδοξυλανάσης οι εκφυλισμένοι εκκινητές GH11R και GH11F [55] χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση ενός τμήματος 336 bp. Εν συντομία, το τμήμα DNA ενισχύθηκε σε ένα μείγμα αντίδρασης 50 μl, που περιελάμβανε 1μM dNTPs (Invitrogen), 1 x ρυθμιστικό διάλυμα A (Fastgene), 0,5 mM MgCl₂ (Fastgene), 25 pmol από κάθε εκκινητή, 3 μl εκχυλισμένου DNA (από το κάθε δοκιμαζόμενο βακτήριο) και 1,5 μονάδα Taq πολυμεράσης (Taq) (NIPPONFast Genetics, Τόκιο, Ιαπωνία). Οι συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή Primus 25 (PEQLAB biotechnologie, Erlangen, Γερμανία) για την touch down PCR ήταν: 3 λεπτά στους 95°C για αρχική αποδιάταξη του διπλού κλώνου, ακολουθούμενοι από 30 κύκλους που περιλάμβαναν αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδισμός εκκινητών στους 66° C-0,5° C/κύκλο για 30 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα. Ακολούθησαν 25 κύκλοι που περιλάμβαναν αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδισμό των εκκινητών στους 50°C για 30 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα, με τελική επέκταση 10 λεπτών στους 72°C. Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% (w/v), χρωματίστηκαν με βρωμιούχο αιθίδιο και οι ζώνες έγιναν ορατές υπό υπεριώδες φως.

Τα ενισχυμένα τμήματα που προέκυψαν από τις αντιδράσεις PCR καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας το κιτ καθαρισμού NucleoSpin Gel και PCR (Macherey-Nagel, Düren, Γερμανία) και στη συνέχεια αλληλουχήθηκαν μέσω της μεθόδου Sanger από την CeMIA SA (Λάρισα-Ελλάδα). Το λογισμικό Chromas έκδοσης 2.6.6 (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, Αυστραλία, www.technelysium.com.au), στο οποίο έγινε πρόσβαση στις 21 Σεπτεμβρίου 2021, χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ποιότητας των δεδομένων αλληλουχίας που ελήφθησαν. Οι αλληλουχίες υποβλήθηκαν σε επεξεργασία χρησιμοποιώντας το λογισμικό Gene Runner έκδοση 6.5 (www.generunner.net πρόσβαση στις 21 Σεπτεμβρίου 2021 και υποβλήθηκαν σε BlastN (Megablast) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) για την αναγνώριση των αλληλουχιών με την υψηλότερη ομοιότητα.

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΣΙΜΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ ΜΕΣΩ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ ΤΟΥ 16S rRNA ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ITS ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ

Η ταυτοποίηση των βακτηρίων έγινε μέσω της αλληλούχησης του γονιδίου 16S rRNA και πραγματοποιήθηκε όπως έχει ήδη περιγραφεί [24]. Συγκεκριμένα το βακτηριακό ολικό DNA εκχυλίστηκε χρησιμοποιώντας το κιτ ExtractMe Genomic DNA (Blirt, Gdansk, Πολωνία). Το γονίδιο 16S rRNA ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') και 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Eurofins Genomics, Γερμανία).

Συνθήκες PCR: αρχική αποδιάταξη στους 95° C για 3 λεπτά, ακολουθούμενη από 35 κύκλους που περιλάμβαναν αποδιάταξη στους 95° C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδισμό των εκκινητών στους 50° C για 30 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση στους 72° C για 2 λεπτά. Προστέθηκε ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης στους 72° C για 2 λεπτά (θερμικός κυκλοποιητής Primus 25, PEQLAB biotechnologie, Erlangen, Γερμανία). Για την ενίσχυση της ITS περιοχής χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') και ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Eurofins Genomics). Το μίγμα της αντίδρασης και οι συνθήκες PCR πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφηκαν προηγουμένως [24].

Συγκεκριμένα το μίγμα της αντίδρασης περιείχε: 2 U FastGene Taq DNA Πολυμεράση, 1X PCR ρυθμιστικό διάλυμα A, 0,5 mM MgCl₂, 25 pmol από κάθε εκκινητή, 1 mM dNTPs, 3 μL εκχυλισμένο DNA και απιονισμένο αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 50 μl. Χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής Primus 25 στις ακόλουθες συνθήκες PCR: αρχική αποδιάταξη στους 95° C για 3 λεπτά, ακολουθούμενη από 40 κύκλους που περιλάμβαναν αποδιάταξη στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδισμό στους 55°C για 30 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα. Ένα τελικό βήμα επιμήκυνσης στους 72°C για 2 λεπτά προστέθηκε. Τα ενισχυμένα τμήματα καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας το κιτ καθαρισμού NucleoSpin Gel και PCR (Macherey-Nagel, Düren, Γερμανία) και αλληλουχήθηκαν μέσω της μεθόδου Sanger από τη MacroGen Europe (Άμστερνταμ, Ολλανδία). Τα ενισχυμένα τμήματα ITS των ζυμομυκήτων αλληλουχήθηκαν μέσω της μεθόδου Sanger από την CeMIA SA (Λάρισα, Ελλάδα). Το λογισμικό Chromas έκδοσης 2.6.6 (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, Αυστραλία, www.technelysium.com.au) χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ποιότητας των ληφθέντων δεδομένων αλληλουχίας. Οι αλληλουχίες συγκεντρώθηκαν σε μια ενιαία ακολουθία μέσω του λογισμικού MEGA X έκδοση 10.1.6 [56] και του λογισμικού Gene Runner έκδοσης 6.5 (www.generunner.net πρόσβαση στις 21 Ιουνίου 2022) και υποβλήθηκαν σε BlastN (Megablast) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) για την αναγνώριση αλληλουχιών με την υψηλότερη ομοιότητα. Οι αλληλουχίες κατατέθηκαν στην GenBank με τους ακόλουθους αριθμούς πρόσβασης ON911235-ON911282



Φωτογραφία 10. Εγκάρσια τομή κελίων με μελισσόψωμο. Διακρίνονται στιβάδες με γύρη διαφορετικής βοτανικής προέλευσης που τοποθετήθηκε στο κελί σε διαφορετικό χρόνο. Διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα μέσα στο κελί φιλοξενούν διαφορετικές μικροβιακές κοινότητες Credit: Margaret Anne Adams Πηγή: BBKA on X (<https://twitter.com>)

Γ.1.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

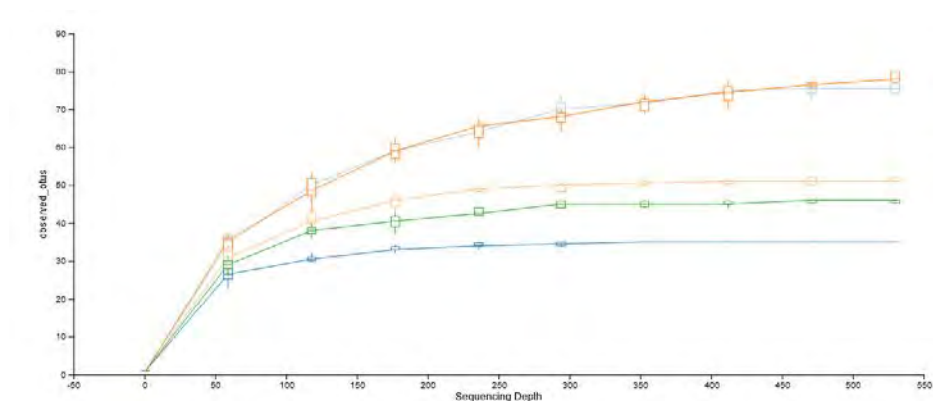
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ ΜΨ ΜΕΣΩ ΜΕΤΑΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ (ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΕΠΟΜΕΝΗΣ ΓΕΝΙΑΣ, NGS)

Πραγματοποιήθηκε μεταταξινομική ανάλυση NGS για τα δείγματα ΓΜ και ΜΨ σε διαφορετικά στάδια ωρίμασης προκειμένου να διερευνηθούν οι αλλαγές του μικροβιώματος στα διαφορετικά χρονικά σημεία. Ο κορεσμός ανάγνωσης είναι ικανοποιητικός όπως δείχνουν οι καμπύλες κορεσμού (εικόνες 3 και 4). Το εύρος ανάγνωσης κυμάνθηκε από 210.454 έως 393.676 αναγνώσεις (reads) μεταξύ των δειγμάτων (Πίνακας 24) και η ποιότητα ανάγνωσης QC 30 κυμαίνεται μεταξύ των δειγμάτων από 84,21% έως 88,61%. Συνεπώς, για το δείγμα 9 με το χαμηλότερο δείκτη QC, τουλάχιστον το 84,21% των δεδομένων μας έχει μικρότερη πιθανότητα λάθους από 1 στις 1000 βάσεις, ποσοστό επίσης ικανοποιητικό για την πιστότητα της ανάγνωσης.

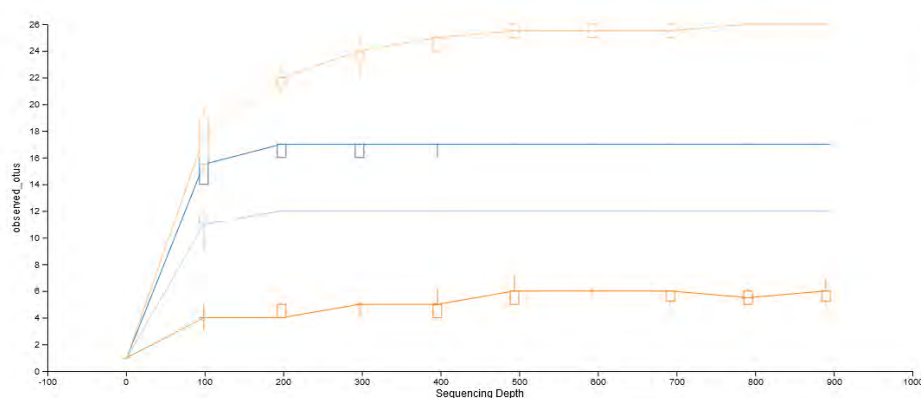
Πίνακας 24. Στατιστικά στοιχεία πρωτογενών δεδομένων ανάλυσης NGS

αριθμός δείγματος	Συνολικές αναγνώσεις βάσεων (bp)	Συνολικές αναγνώσεις	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
1	75,081,440	249,440	55.58	44.42	93.8	86.12
2	71,062,488	236,088	55.4	44.6	94.07	86.49
3	80,605,392	267,792	54.99	45.01	94.25	86.89
4	81,062,912	269,312	55.02	44.98	94.66	87.47
5	63,346,654	210,454	55.03	44.97	93.59	85.74
6	112,431,928	373,528	49.23	50.77	94.99	88.61
7	107,320,346	356,546	52.4	47.6	93.98	86.7
8	117,116,692	389,092	49.89	50.11	92.04	84.85
9	118,496,476	393,676	47.13	52.87	91.82	84.21

- GC(%) : GC ποσοστό.
- AT(%) : AT ποσοστό.
- Q20(%) : δείκτης ποιότητας ανάγνωσης (πιθανότητα λάθους ανάγνωσης 1βάση/ 100 βάσεις)
- Q30(%) : δείκτης ποιότητας ανάγνωσης (πιθανότητα λάθους ανάγνωσης 1βάση/ 1000 βάσεις)



Εικόνα 3. 16S καμπύλες κορεσμού.



Εικόνα 4. ITS καμπύλες κορεσμού.

Το μικροβίωμα της ΓΜ και του ΜΨ περιλαμβάνει τόσο περιβαλλοντικούς μικροοργανισμούς όσο και μικροοργανισμούς που προέρχονται από τις ίδιες τις μέλισσες και το περιβάλλον της κυψέλης. Κατά την ωρίμανση του ΜΨ μεταβάλλεται η δυναμική των μικροβιακών κοινοτήτων και προς το τέλος της ωρίμανσης η μικροβιακή ποικιλότητα μειώνεται (πίνακας 25). Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας η ποικιλότητα των βακτηρίων αυξάνεται από την ημέρα 1 έως την ημέρα 27 και μειώνεται από την ημέρα 27 έως την ημέρα 41, με τις τιμές του δείκτη chao1 (ολική αφθονία ειδών ανά δείγμα) να είναι: 46 (ΓΜ 1 ημέρας), 82 (ΜΨ 27 ημερών) και 42 (ΜΨ 41 ημερών) αντίστοιχα.

Δεν παρατηρείται το ίδιο με το μυκοβίωμα, όπου η βιοποικιλότητα μειώνεται σταδιακά από την ημέρα 1 έως την ημέρα 27, εμφανίζοντας τιμές για το δείκτη chao1: 26 (ΓΜ 1 ημέρας) και 8 (ΜΨ 27 ημερών) αντίστοιχα. Παρόμοιες τιμές εμφανίζει και ο δείκτης Observed OTUs. Ο δείκτης Shannon (αφθονία σε σχέση με την ομοιομορφία των ειδών) εμφανίζεται σχετικά σταθερός στα βακτήρια με τιμές που κυμαίνονται από 4,7778 έως 5,714, ενώ σταδιακά μειώνεται στους μύκητες από 3,380 (S6) έως 0,586 (S9). Ο δείκτης pielou evenness αναφέρεται στην κυριαρχία μεταξύ των ειδών. Οι τιμές είναι υψηλές και σταθερές μεταξύ των δειγμάτων S1-S5 και S6-S8 (υποδηλώνουν σχετική ισοδυναμία) με σημαντική μείωση στο δείγμα S9 που εξηγείται από την κυριαρχία των ζυγοσακχαρομυκήτων σε αυτό το δείγμα όπως θα δούμε παρακάτω. Ο δείκτης Faith pd αναφέρεται στη φυλογενετική ποικιλότητα ανά δείγμα. Ο δείκτης αυξάνεται από το δείγμα S1-S4 και μειώνεται στο δείγμα S5. Μεταξύ των δειγμάτων S6-S9 ο δείκτης σταδιακά μειώνεται (μείωση φυλογενετικής ποικιλότητας).

Πίνακας 25. Δείκτες α-ποικιλότητας ανά δείγμα

Δείγμα	Shannon	Chao1	Observed OTUs	Faith pd	Pielou evenness
S1	5,121	46	46	4,864	0,927
S2	4,778	35	35	4,239	0,931
S3	5,714	80	76	7,271	0,914
S4	5,603	82	80	7,693	0,886
S5	5,146	52	52	6,012	0,903
S6	3,380	26	26	6,531	0,719
S7	3,367	17	17	4,612	0,824
S8	2,843	12	12	3,455	0,793
S9	0,586	8	6	1,497	0,227

Αυτά τα ευρήματα (Πίνακας 25), δείχνουν ότι, κατά την ωρίμανση του ΜΨ λαμβάνει χώρα σταδιακά μια μετατόπιση μεταξύ των μικροβιακών κοινοτήτων που οδηγεί σε μια νέα μικροβιακή ισορροπία. Οι φυσικοχημικές αλλαγές του ΜΨ (μικροβιακοί και άλλοι μεταβολίτες, μικροαερόφιλες ή ανοξικές συνθήκες, οξύτητα, διαθεσιμότητα τροφής και νερού), που λαμβάνουν χώρα κατά τα διάφορα στάδια ωρίμανσης, δημιουργούν ένα περιβάλλον που επιτρέπει σε συγκεκριμένους μικροοργανισμούς να επιβιώνουν ή και να πολλαπλασιάζονται, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματά μας (Πίνακες 28 και 29). Με αυτή την έννοια μπορούμε να θεωρήσουμε ότι οι προσαρμοσμένοι μικροοργανισμοί που επιβιώνουν στο ώριμο ΜΨ συνιστούν το «βασικό μικροβίωμά» του. Ο δείκτης Jaccard (δείκτης β-ποικιλότητας) εμφανίζεται σχετικά σταθερός (δηλώνει μικρές διαφορές ποικιλότητας) μεταξύ των δειγμάτων τόσο για τα βακτήρια όσο και για τους μύκητες (Πίνακες 26 και 27).

Πίνακας 26. Δείκτης Jaccard (δείκτης β-ποικιλότητας) για βακτήρια

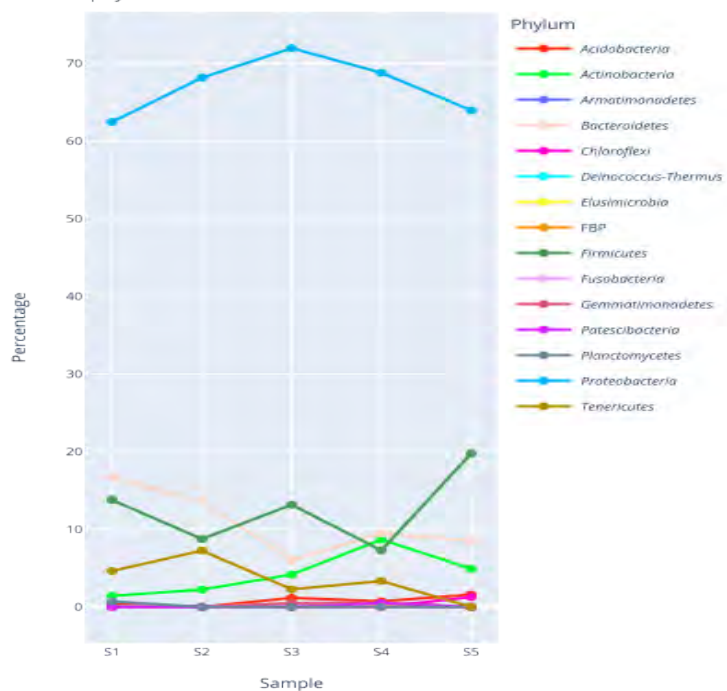
	S1	S2	S3	S4	S5
S1	0,000	0,791	0,870	0,865	0,911
S2	0,791	0,000	0,844	0,883	0,885
S3	0,870	0,844	0,000	0,836	0,847
S4	0,865	0,883	0,836	0,000	0,832
S5	0,911	0,885	0,847	0,832	0,000

Πίνακας 27. Δείκτης Jaccard (δείκτης β-ποικιλότητας) για μύκητες

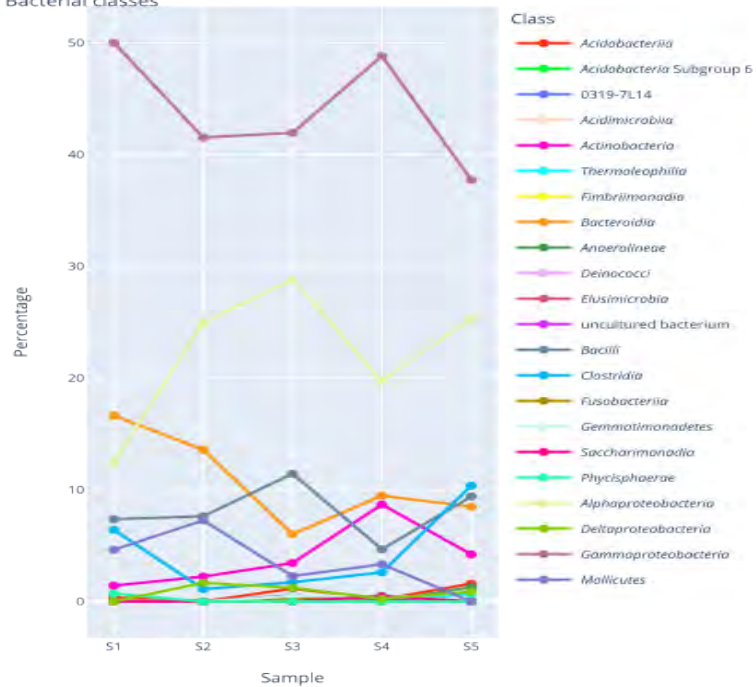
	S6	S7	S8	S9
S6	0,000	0,735	0,813	0,815
S7	0,735	0,000	0,682	0,789
S8	0,813	0,682	0,000	0,714
S9	0,815	0,789	0,714	0,000

Οι εικόνες 5 και 6 απεικονίζουν τα βακτηριακά (εικ. 5) και μυκητιακά (εικ. 6) φύλλα και κλάσεις (συνομοταξίες) αντιστοίχως που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα S1 έως S9 χρησιμοποιώντας την NGS. Οι πίνακες 28 και 29 δείχνουν τις πιο άφθονες οικογένειες και γένη (>3%) μυκήτων και βακτηρίων που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα S1 έως S9.

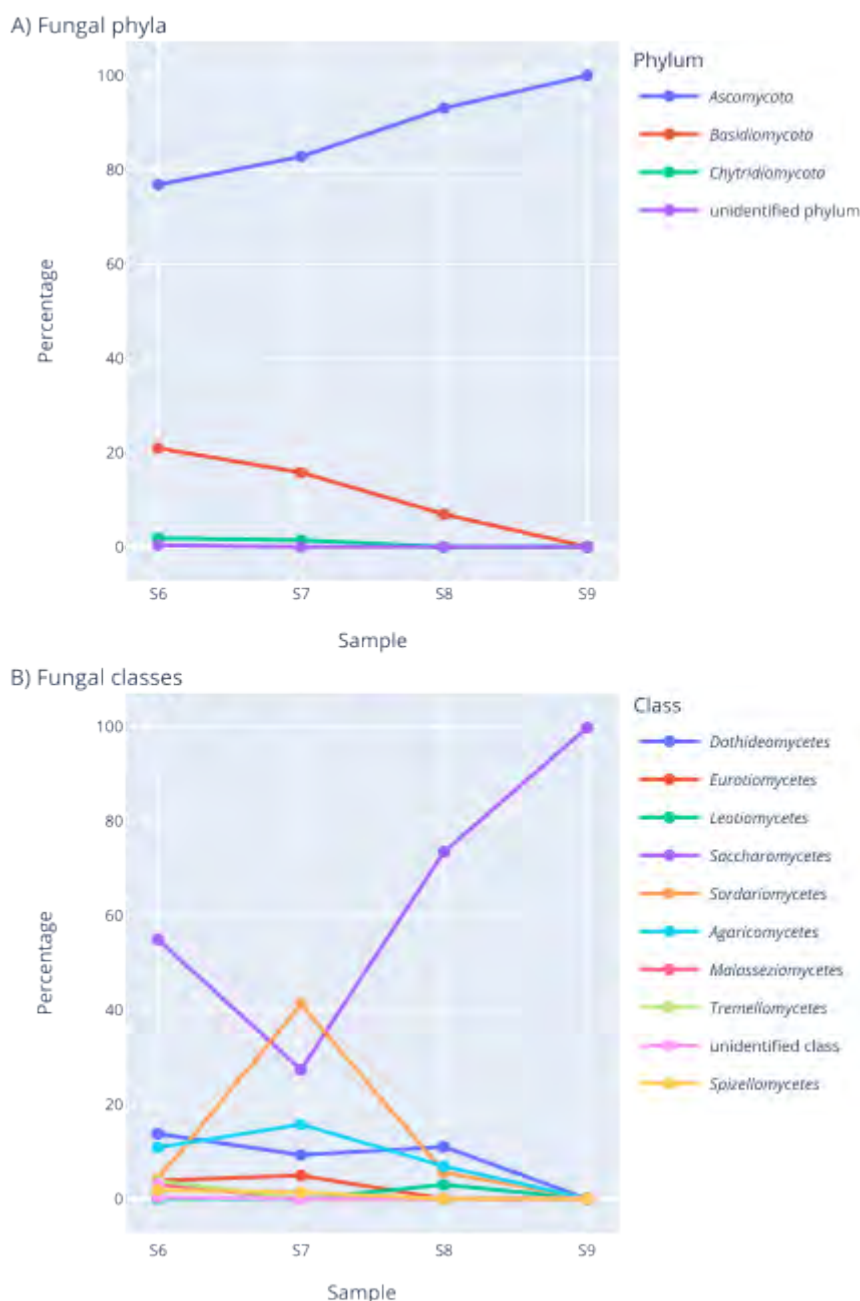
A) Bacterial phyla



B) Bacterial classes



Εικόνα 5. Φύλλα και κλάσεις βακτηρίων που ανιχνεύθηκαν με τη χρήση NGS στα δείγματα S1 - S9



Εικόνα 6. Φύλλα και κλάσεις μυκήτων που ανιχνεύθηκαν με τη χρήση NGS στα δείγματα S1 - S9

Τα πρωτεοβακτήρια είναι το κυρίαρχο φύλο στη ΓΜ και αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 60% των σχετικών OTUs (ημέρα 1). Τα πρωτεοβακτήρια αυξάνονται γρήγορα μέσα σε 24 ώρες (ΜΨ 1 ημέρας), φτάνοντας σχεδόν το 70%, και σταδιακά μειώνονται από την 11η ημέρα έως την 41η ημέρα, φτάνοντας περίπου στο αρχικό ποσοστό. Η κλάση των γ-πρωτεοβακτηρίων είναι η πιο άφθονη (50% όλων των OTUs σε ΓΜ 1 ημέρας) και πέφτει λίγο κάτω από το 40% την 41η ημέρα (ΜΨ 41 ημερών). Μεταξύ αυτών η αφθονία του γένους *Pseudomonas* ποικίλλει μεταξύ των δειγμάτων σε διαφορετικά χρονικά σημεία (ΓΜ 1 ημέρας: 4,62%, ΜΨ 1 ημέρας: 1,12%, ΜΨ 11 ημερών: 6,1%, ΜΨ 27 ημερών: 14,14%, ΜΨ 41 ημερών: 4,68%). Η μείωση από 4,62% σε 1,12% εντός των πρώτων 24 ωρών μπορεί να οφείλεται τόσο στην αρχική γαλακτική ζύμωση που λαμβάνει χώρα όσο και στον ενοφθαλμισμό μικροοργανισμών από τις μέλισσες, γεγονός ικανό να επηρεάσουν τις μικροβιακές κοινότητες κατά τη μετατροπή της ΓΜ σε ΜΨ.

Μετά από αυτό το σημείο, υπάρχει μια προοδευτική αύξηση (ημέρες 11 έως 27) και τελικά μια σημαντική μείωση από την ημέρα 27 στην ημέρα 41, πιθανώς λόγω μεταβολικών ή /και φυσικοχημικών αλλαγών κατά τη διαδικασία ωρίμασης του ΜΨ. Μεταξύ των ημερών 12 - 41 (δείγματα ΜΨ S4 και S5) το πλαίσιο δειγματοληψίας που περιείχε το ΜΨ απομονώθηκε εντός της κυψέλης και οι μέλισσες δεν μπορούσαν να προσθέσουν γύρη σε αυτό ή να καταναλώσουν ΜΨ από αυτό, οπότε υποθέτουμε ότι οι παρατηρούμενες αλλαγές στην ποικιλότητα και στην αφθονία των μικροβιακών κοινοτήτων οφείλονται σε μικροβιακό ανταγωνισμό εντός του ΜΨ.

Τα α-πρωτεοβακτήρια αποτελούν επίσης μια σημαντική κατηγορία, και αυξάνονται έως και 30% σε ΜΨ ηλικίας 11 ημερών, το ποσοστό στη συνέχεια πέφτει στο 25% σε ΜΨ ηλικίας 41 ημερών. Μεταξύ αυτών τα γένη *Sphingomonas* επίσης εμφανίζουν σημαντικά ποσοστά και η αφθονία τους κυμαίνεται από 6,24% (ΜΨ 1 ημέρας) έως 13,34% (ΜΨ 41 ημερών).

Η αφθονία των *Firmicutes* αυξάνεται έως και 20% σε ΜΨ ηλικίας 41 ημερών. Οι κλάσεις των βακίλλων και των κλωστριδίων (*Bacilli* και *Clostridia*) αντιπροσωπεύουν περίπου το 20% όλων των τάξεων σε ΜΨ ηλικίας 41 ημερών. Οι βάκιλλοι αυξάνονται από την ημέρα 1 έως την ημέρα 11, μειώνονται από την ημέρα 11 μέχρι την ημέρα 27 και τελικά αυξάνονται μέχρι την ημέρα 41. Τα κλωστρίδια μειώνονται γρήγορα μέσα στις πρώτες 24 ώρες (1 ημέρας ΓΜ – 1 ημέρας ΜΨ) και από εκείνο το σημείο και μετά παρατηρείται μια προοδευτική αύξηση μέχρι την ημέρα 41. Το γένος *Lactobacillus* αυξάνεται γρήγορα μέσα στις πρώτες 24 ώρες, υποδεικνύοντας τη σημασία των λακτοβακίλλων στη διαδικασία ζύμωσης, ειδικά την πρώτη ημέρα. Αυτή η διαδικασία φαίνεται να είναι κρίσιμη για τη μετατροπή της ΓΜ σε ΜΨ. Η δράση των λακτοβακίλλων είναι επίσης σημαντική για τη διατήρηση του ΜΨ λόγω της αντιμικροβιακής τους δράσης (πίνακας 30). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι λακτοβάκιλλοι ανιχνεύονται σε ποσοστό 4,95% σε ώριμο ΜΨ ηλικίας 41 ημερών, υποδεικνύοντας την προσαρμογή τους σε αυτό το περιβάλλον. Τα *Bacteroidetes* επίσης αποτελούν ένα φύλο που ανιχνεύεται αρχικά σε ποσοστά περίπου 17% και σταδιακά μειώνεται.

Τα δεδομένα μας είναι εν μέρη σύμφωνα με τη μελέτη που διεξήχθη από τους Ghosh et al. [29] οι οποίοι συνέκριναν την ποικιλότητα των βακτηρίων σε ΓΜ και ΜΨ χρησιμοποιώντας NGS (Illumina MiSeq). Οι ερευνητές ανέλυσαν δείγματα από αποικίες *Apis mellifera ligustica* στο Andong της Κορέας. Τα κυρίαρχα φύλα ήταν τα *Proteobacteria* ακολουθούμενα από τα *Firmicutes* στο ΜΨ. Σε αντίθεση με τα δεδομένα μας, τα *Firmicutes* ήταν το φύλο με τη μεγαλύτερη σχετική αφθονία στη ΓΜ. Οι τάξεις των *Firmicutes* που ανιχνεύθηκαν στο ΜΨ ήταν οι *Bacillales*, *Lactobacillales* και *Clostridiales*. Λακτοβάκιλλοι ανιχνεύθηκαν μόνο στη ΓΜ σε αντίθεση με τα δικά μας αποτελέσματα όπου οι λακτοβάκιλλοι ανιχνεύονται και σε ΜΨ 41 ημερών.

Οι Donkersley et al. [32] επίσης χρησιμοποίησαν την NGS (Illumina MiSeq) για τη διερεύνηση της μικροβιακής ποικιλότητας δειγμάτων ΜΨ άγνωστης ηλικίας που συλλέχθηκε από κυψέλες στη βορειοδυτική Αγγλία. Τα αποτελέσματά τους δείχνουν ότι τα *Proteobacteria* ήταν το κυρίαρχο φύλο ακολουθούμενο από τα *Bacteroidetes* και τα *Firmicutes*. Τα πιο κοινά γένη που ανίχνευσαν ήταν τα *Pseudomonas* (32,4%), *Arsenophonus* (13,0%), *Lactobacillus* (8,2%), *Erwinia* (7,7%) και *Acinetobacter* (5,2%). Το γένος *Massilia* εντοπίστηκε στο ΜΨ σε σχετικά χαμηλή αφθονία μαζί με το γένος *Sphingomonas*.

Η δική μας μελέτη δείχνει ότι τα γένη *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* και *Lactobacillus* είναι σημαντικά για την ωρίμαση του ΜΨ και η δυναμική του πληθυσμού τους αλλάζει σε διαφορετικά στάδια (πίνακας 28). Αυτά τα γένη υπάρχουν επίσης σε ΜΨ ηλικίας 41 ημερών (το καθένα αντιπροσωπεύει ένα ποσοστό πάνω από το 4% των αντίστοιχων OTUs). Τα εντεροβακτήρια αυξάνονται από 4,62% (ΓΜ ηλικίας 1 ημέρας) σε 7,08% (ΜΨ 1 ημέρας), αλλά δεν ανιχνεύονται την 11η ημέρα. Αυτό μπορεί να υποδηλώνει τη δυνατότητα του ΜΨ να εξυγιαίνεται εξαλείφοντας πιθανά παθογόνα. Ένα αταυτοποιητό γένος *Enterobacteriaceae* βρέθηκε επίσης στο ΜΨ που κυμαίνεται μεταξύ 1,69% - 9,25% των σχετικών OTUs και σε ΜΨ ηλικίας 41 ημερών (5,36%).

Τα είδη του γένους *Massilia* συνιστούν ένα βακτηριακό γένος που βρίσκεται σε διαφορετικά περιβάλλοντα αλλά κυρίως σχετίζεται με φυτά [57]. Το γένος αυτό ήταν το πιο άφθονο στα πρώιμα στάδια ζύμωσης του ΜΨ (13,06% σε ΜΨ ηλικίας 1 ημέρας) και μειώνεται στο 2,93% σε ΜΨ 41 ημερών. Πίνακας 28. Βακτηριακές οικογένειες/γένη και η % σχετική αφθονία τους

Bacterial families/ genera	S1 (%)	S2 (%)	S3 (%)	S4 (%)	S5 (%)
Sphingomonadaceae; <i>Sphingomonas</i>	6.24	11.36	8.15	6.09	13.34
Pseudomonadaceae; <i>Pseudomonas</i>	4.62	1.12	6.10	14.14	4.68
Burkholderiaceae; <i>Massilia</i>	13.06	2.98	5.86	4.36	2.93
Moraxellaceae; <i>Acinetobacter</i>	6.13	7.26	5.19	3.16	6.42
Lactobacillaceae; <i>Lactobacillus</i>	4.28	7.64	6.70	1.13	4.95
Enterobacteriaceae; Unknown genus	9.25	3.35	1.69	3.10	5.36
Hymenobacteraceae; <i>Hymenobacter</i>	9.71	5.40	2.72	1.13	0.00
Enterobacteriaceae; <i>Pantoea</i>	0.00	6.89	7.37	3.04	1.10
Acetobacteraceae; Unknown genus	0.00	0.00	7.55	7.94	1.88
Entomoplasmataceae; <i>Mesoplasma</i>	4.28	7.26	2.23	3.28	0.00
Enterobacteriaceae; <i>Phaseolibacter</i>	0.81	4.84	1.51	7.04	1.60
Enterobacteriaceae; <i>Enterobacter</i>	4.62	7.08	0.00	0.00	0.00
Beijerinckiaceae; 1174-901-12	0.00	6.70	3.44	0.00	1.05
Sphingobacteriaceae; <i>Mucilaginibacter</i>	6.47	2.42	0.24	0.54	1.28
Orbaceae; <i>Gilliamella</i>	0.00	0.00	3.50	3.16	2.89
Burkholderiaceae; Unknown genus	0.00	0.56	2.05	0.72	4.26
Rhodanobacteraceae; <i>Luteibacter</i>	4.05	2.61	0.00	0.00	0.00
Orbaceae; Ambiguous_taxa	0.00	1.49	0.00	3.40	0.78
Muribaculaceae; uncultured bacterium	0.00	0.00	0.00	3.16	1.70
Enterobacteriaceae; <i>Rosenbergiella</i>	0.00	0.00	3.02	1.61	0.00
Corynebacteriaceae; <i>Corynebacterium</i>	0.00	0.00	0.00	3.22	1.33
Dysgonomonadaceae; <i>Dysgonomonas</i>	0.00	0.00	0.00	0.42	3.07
Other	26.47	21.04	32.67	29.36	41.36

Αναφέρονται μόνο οικογένειες/γένη με ποσοστό 3% και άνω των αντίστοιχων OTUs

Πίνακας 29. Οικογένειες/γένη μυκήτων και η σχετική % αφθονία τους

Fungal families/genera	S6 (%)	S7 (%)	S8 (%)	S9 (%)
Saccharomycetaceae; <i>Zygosaccharomyces</i>	51.64	10.27	67.93	99.58
Pleosporaceae; <i>Alternaria</i>	8.32	5.67	5.12	0.00
Hypocreaceae; <i>Trichoderma</i>	1.00	36.23	5.57	0.13
order Saccharomycetales; unidentified	2.93	17.09	5.57	0.21
order Agaricales; unidentified	3.85	0.00	0.00	0.00
Mrakiaceae; <i>Krasilnikovozyma</i>	3.83	0.00	0.00	0.00
Hymenochaetaceae; <i>Fuscoporia</i>	3.16	3.19	0.00	0.00
Psathyrellaceae; unidentified	3.34	0.00	0.00	0.00
phylum Basidiomycota; unidentified	3.18	0.00	0.00	0.00
Malasseziaceae; <i>Malassezia</i>	3.01	0.00	0.00	0.00
Physalacriaceae; <i>Cryptomarasmius</i>	0.00	7.53	1.78	0.00
Glomerellaceae; unidentified	0.00	4.96	0.00	0.00
Herpotrichiellaceae; unidentified	0.00	4.61	0.00	0.00
Lycoperdaceae; <i>Lycoperdon</i>	0.00	4.07	0.00	0.00
Phaeosphaeriaceae; <i>Leptospora</i>	0.00	0.00	3.90	0.00
Rhytismataceae; <i>Colpoma</i>	0.00	0.00	3.01	0.00
Cantharellaceae; <i>Craterellus</i>	0.00	0.00	3.01	0.00
Other	15.74	6.38	4.12	0.09

Αναφέρονται μόνο οικογένειες/γένη με ποσοστό 3% και άνω των αντίστοιχων OTUs

Μεταξύ των μυκήτων, τα Ascomycota ανιχνεύονται σε ποσοστό που αντιστοιχεί σχεδόν στο 100% των σχετικών OTU σε ΜΨ ηλικίας 27 ημερών. Μεταξύ των Ascomycota οι κυρίαρχες κλάσεις ήταν οι Saccharomycetes και οι Sordariomycetes. Η σχετική αφθονία των Agaricomycetes ήταν σχεδόν 18% στο δείγμα S7 (1 ημέρας ΜΨ) και έπεσε στο μηδέν στο δείγμα S9 (27 ημερών ΜΨ). Ομοίως, η σχετική αφθονία των Dothideomycetes ήταν κοντά στο 15% στα δείγματα S6, S7, S8 και έπεσε στο μηδέν στο δείγμα S9. Το γένος *Zygosaccharomyces* ήταν το πιο άφθονο και ανέρχεται στο 99,58% των σχετικών OTU σε ΜΨ ηλικίας 27 ημερών (δείγμα S9). Τα Basidiomycota ήταν το δεύτερο πιο άφθονο φύλο μυκήτων, αν και η σχετική αφθονία του μειώθηκε σταδιακά από 20% στο δείγμα S6 (ΓΜ 1 ημέρας) σε 0% στο δείγμα S9 (ΜΨ 27 ημερών). Τα ευρήματά μας είναι σύμφωνα με δεδομένα που αναφέρθηκαν σε προηγούμενες μελέτες.

Οι Dimov et al. [58], χρησιμοποίησαν την NGS (Illumina HiSeq) για να διερευνήσουν το μυκοβίωμα του ΜΨ ηλικίας 2 έως 4 ημερών, που συλλέχθηκε από τέσσερις τοποθεσίες στη Βουλγαρία [58]. Όλα τα κυρίαρχα γένη ανήκαν στο φύλο Ascomycota (>99%).

Οι Sinproo et al [39], συνδύασαν μεθόδους PCR, DGGE και καλλιέργειας για τον εντοπισμό μυκητιακών κοινοτήτων σε ΓΜ και ΜΨ 1, 2, 3, 4 και 6 εβδομάδων στην Ταϊλάνδη, ενώ οι μέλισσες συνέλλεξαν γύρη κυρίως από *Mimosa pudica* L. Οι ερευνητές έδειξαν ότι οι πληθυσμοί και η ποικιλομορφία των μυκήτων μειώθηκαν με την πάροδο των εβδομάδων. Τα κυρίαρχα είδη μυκήτων που εντόπισαν στο ΜΨ ήταν ζυμομύκητες του γένους *Zygosaccharomyces* και νηματώδεις μύκητες του γένους *Cladosporium*.

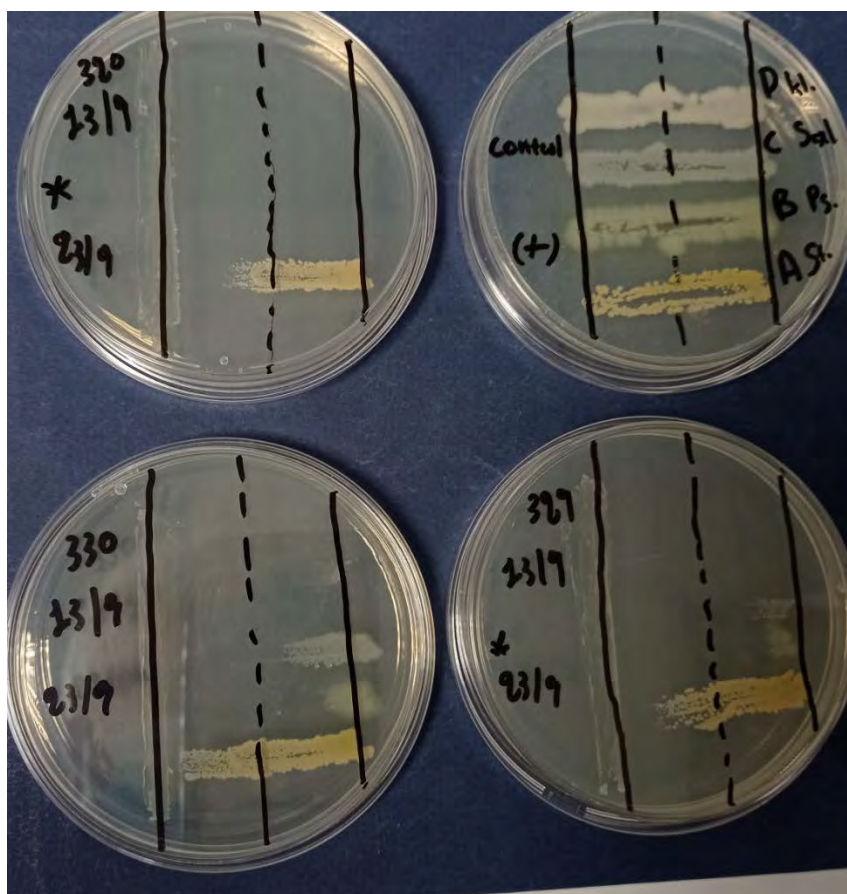
Ομοίως, οι Detry et al [40], απομόνωσαν ζυμομύκητες από δείγματα ΜΨ ηλικίας 7 ημερών και 20 ημερών που συλλέχθηκαν από μελισσοκομεία στο Βέλγιο. Τα απομονωμένα στελέχη ταυτοποιήθηκαν με PCR και η ανάλυση έδειξε ότι τα 252 ταυτοποιημένα στελέχη ανήκαν ως επί το πλείστον στα γένη *Starmerella*, *Metschnikowia* και *Zygosaccharomyces*. Η αφθονία των ζυμών μειώθηκε με την αποθήκευση. Το *Starmerella (Candida) apis* ήταν το πιο κυρίαρχο είδος στο φρέσκο ΜΨ, ενώ τα *Zygosaccharomyces* spp. απομονώθηκαν από πιο ώριμο ΜΨ.

ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟ ΚΑΙ ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΜΕΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΤΟΥ ΜΨ

Τα δείγματα ΜΨ S5, S11 και S12 (πίνακας 23), χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση βακτηρίων και ζυμών όπως περιγράφεται παραπάνω. Τα βακτήρια που απομονώθηκαν δοκιμάστηκαν όσον αφορά την αντιβακτηριακή τους δράση έναντι των *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* sub. *Typhimurium* (*S. Typhimurium*) και *K. pneumoniae* καθώς επίσης και για το ενζυμικό βιοσυνθετικό δυναμικό τους και συγκεκριμένα για την ικανότητά τους να εκκρίνουν κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, αμυλάσες, πρωτεϊνάσες και οξειδάσες, μεταξύ των οποίων και λακκάσες ικανές να αποικοδομούν χρωστικές. Επιλέχθηκαν για ταυτοποίηση κυρίως στελέχη που εμφάνισαν αντιβακτηριακή δράση έναντι τουλάχιστον δύο παθογόνων βακτηρίων και επίσης είχαν τη δυνατότητα να εκκρίνουν διαφορετικά ένζυμα. Επιλέξαμε επιπλέον για ταυτοποίηση επτά βακτήρια που ασκούν αντιβακτηριακή δράση έναντι ενός παθογόνου και τρία που δεν ασκούν καμία αντιβακτηριακή δράση αλλά είναι σε θέση να εκκρίνουν διαφορετικά ένζυμα. Τα βακτήρια ταυτοποιήθηκαν μέσω αλληλούχησης του 16S rRNA γονιδίου. Τα ταυτοποιημένα βακτηριακά στελέχη, η αντιμικροβιακή τους ικανότητα και το βιοσυνθετικό τους δυναμικό απεικονίζονται στους Πίνακες 30 και 31. Ταυτοποιήθηκαν έντεκα στελέχη *Apilactobacillus kunkeei*, ένα στέλεχος *Fructobacillus fructosus*, ένα στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa*, ένα στέλεχος *Staphylococcus hominis*, πέντε στελέχη *Bacillus thuringiensis*, τρία στελέχη *Bacillus cereus*, τρία στελέχη *Bacillus siamensis*, δύο στελέχη *Bacillus licheniformis*, τρία στελέχη *Bacillus subtilis*, πέντε στελέχη *Bacillus safensis*, ένα στέλεχος *Bacillus halotolerans*, ένα στέλεχος *Bacillus pumilus* ένα στέλεχος *Bacillus aerophilus* και 10 στελέχη *Bacillus* spp.

ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΤΟΥ ΜΨ ΕΝΑΝΤΙ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Από ένα σύνολο 309 απομονωθέντων βακτηρίων, 42 εμφάνισαν αντιβακτηριακή δράση έναντι του στελέχους 1552 του *S. aureus* MRSA, 34 έναντι του ανθεκτικού στην καρβαπενέμη στελέχους της *P. aeruginosa* 1773, 47 έναντι της *S. Typhimurium* και 43 έναντι της *K. pneumoniae*. Τα απομονωμένα στελέχη *Apilactobacillus* και *Fructobacillus* έδειξαν υψηλή αντιβακτηριακή δράση έναντι των Gram-αρνητικών παθογόνων που κυμαίνεται μεταξύ 1,8-3,5 cm απόσταση αναστολής (πίνακας 30). Παρουσιάζουν όμως χαμηλότερη αντιβακτηριακή δράση κατά του *S. aureus*. Οι βάκιλλοι εμφανίζουν αντιβακτηριακή δράση κυρίως κατά του *S. aureus*, αλλά μερικά από αυτά τα στελέχη ασκούν επίσης αντιβακτηριακή δράση έναντι των Gram-αρνητικών παθογόνων (πίνακας 31). Υποθέτουμε ότι η αντιβακτηριακή δράση του ΜΨ πηγάζει από τη συνεργική δράση φυτικών μεταβολιτών όπως π.χ. οι πολυφαινόλες αλλά και από αντιμικροβιακές ενώσεις που παράγονται από τα μικρόβια του ΜΨ [17], (Κεφ. Β.2 της παρούσας διατριβής).



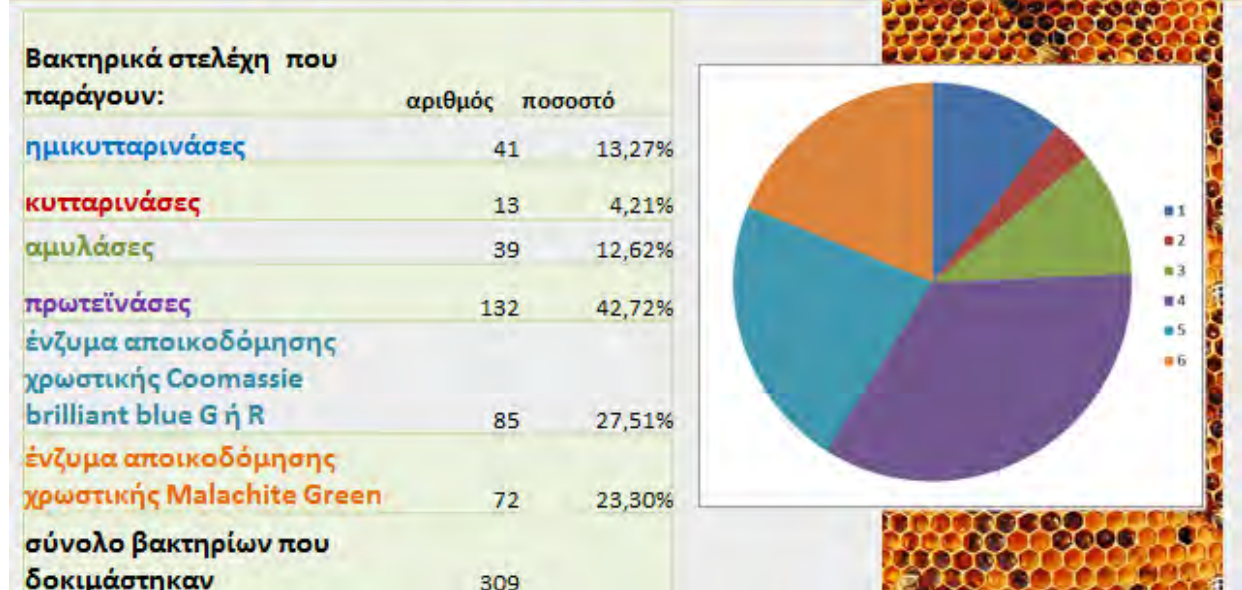
Φωτογραφία 11. Αντιβακτηριακή δοκιμή απιλακτοβακίλλων του μελισσόψωμου (320, 330, 329) έναντι τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων. Πάνω δεξιά ο θετικός μάρτυρας (control +: τρυβλίο χωρίς επίστρωση βακτηρίου από το ΜΨ). Α: *S. aureus*, Β: *P. aeruginosa*, C: *S. Typhimurium*, D: *K. pneumoniae*. Φωτογραφία: Νίκος Ασούτης Διδάρας

Στη φωτογραφία 11 φαίνονται οι δοκιμές τριών στελεχών απιλακτοβακίλλων του μελισσόψωμου έναντι των τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων. Αφορούν τα τρυβλία στο κάτω μέρος της φωτογραφίας και το ένα πάνω αριστερά. Πάνω δεξιά φαίνεται ο θετικός μάρτυρας (τρυβλίο χωρίς επίστρωση βακτηρίου από το ΜΨ Α: *S. aureus*, Β: *P. aeruginosa*, C: *S. Typhimurium*, D: *K. pneumoniae*). Σε όλα τα τρυβλία έχουν επιστρωθεί και τα τέσσερα παθογόνα βακτήρια με τη σειρά που αυτά φαίνονται στον θετικό μάρτυρα. Τα βακτηριακά στελέχη του ΜΨ έχουν επιστρωθεί πριν την επίστρωση των παθογόνων και σε κάθετη κατεύθυνση ως προς αυτά (συνεχής γραμμή στο αριστερό τμήμα κάθε τρυβλίου). Μπορούμε να παρατηρήσουμε την ισχυρή αντιβακτηριακή δράση των βακτηρίων του ΜΨ έναντι των παθογόνων. Ειδικότερα σε κάποιες περιπτώσεις (αριθμός βακτηρίου 320) δεν αναπτύσσονται καθόλου τα *Gram*- (*P. aeruginosa*, *S. Typhimurium*, και *K. pneumoniae*). Λιγότερο επηρεάζεται ο *S. aureus*.

ΕΝΖΥΜΙΚΟ ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΜΨ

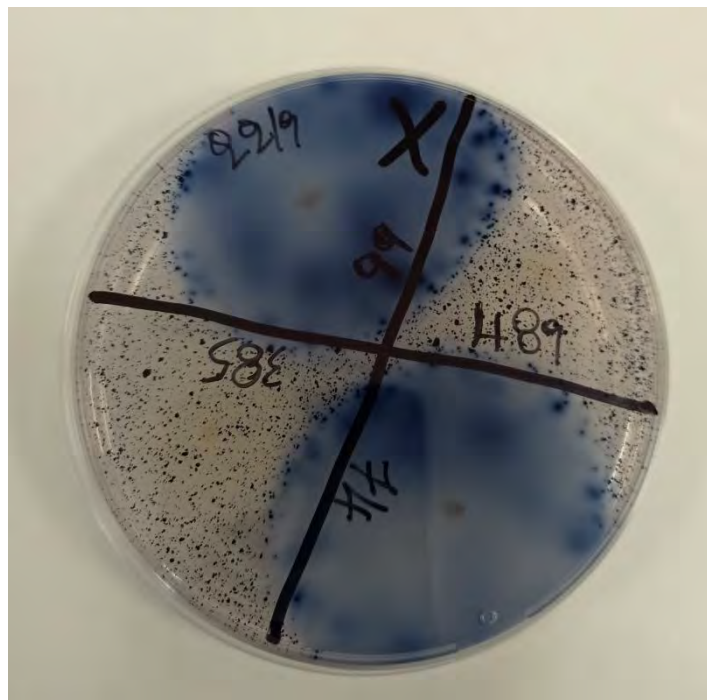
Από ένα σύνολο 309 απομονωθέντων βακτηρίων, τα 41 (13,27%) εμφάνισαν θετικό φαινότυπο ως προς την έκκριση ημικυτταρινασών, 13 (4,21%) από αυτά έδειξαν θετικό φαινότυπο όσον αφορά την έκκριση κυτταρινασών, 39 (12,62%) από αυτά έδειξαν θετικό φαινότυπο όσον αφορά την έκκριση αμυλασών, 132 (42,72%) από αυτά έδειξαν θετικό φαινότυπο όσον αφορά την έκκριση πρωτεϊνών, 85 (27,51%) από αυτά έδειξαν θετικό φαινότυπο όσον αφορά την έκκριση ενζύμων αποικοδόμησης χρωστικής Coomassie brilliant blue G ή R και 72 (23,3%) από αυτούς έδειξαν θετικό φαινότυπο όσον αφορά την έκκριση ενζύμων αποικοδόμησης χρωστικής Malachite Green (Εικόνα 6).

Βιοσυνθετική ικανότητα του μικροβιώματος του ελληνικού ΜΨ



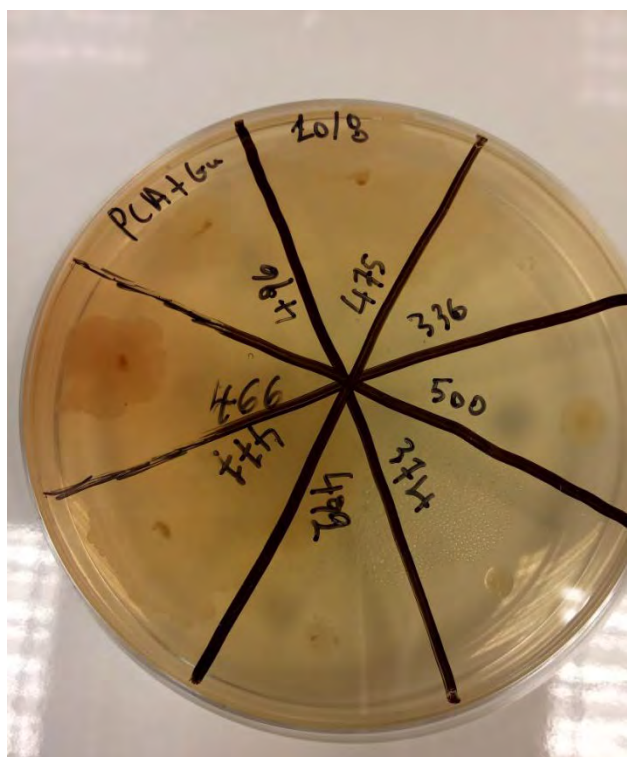
Εικόνα 7. Βιοσυνθετική ικανότητα βακτηριακών στελεχών μελισσόψωμου

Όλα τα ταυτοποιημένα στελέχη παρήγαγαν περισσότερα από ένα ένζυμα (Πίνακας 31). Προκειμένου να διαπιστώσουμε εάν σε φυσικές συνθήκες παράγονται στο ΜΨ κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες δοκιμάστηκαν για αυτό το σκοπό τα δείγματα ΜΨ από τα οποία απομονώθηκαν βακτήρια. Η ενεργότητα κυτταρινάσης και ημικυτταρινάσης ανιχνεύθηκε στα πρωτεϊνικά κλάσματα του μελισσόψωμου γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι το μικροβίωμά του συμμετέχει στη διάσπαση (πρόπεψη) των γυρεοκόκκων.



Φωτογραφία 12. Διάσπαση κόκκων ημικυτταρίνης και απελευθέρωση μπλε χρωστικής Φωτογραφία: Νίκος Ασούτης Διδάρας

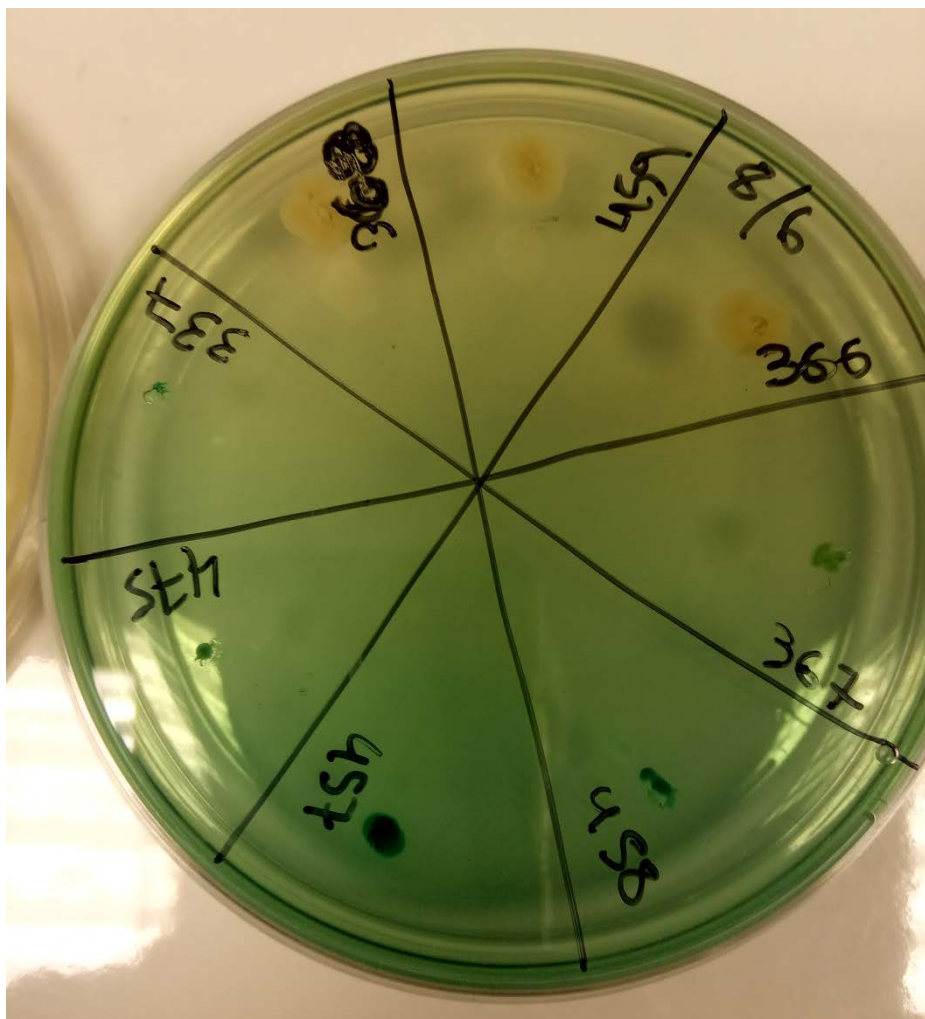
Τμήματα των αντίστοιχων γονιδίων ενισχύθηκαν για να διερευνηθεί το γονιδιακό δυναμικό των βακτηρίων που σχετίζεται με την παραγωγή λακκάσης και ημικυτταρινάσης. Το γονίδιο ενδοξυλανάσης (τμήμα 336 bp) ενισχύθηκε από βακτηριακά στελέχη με έντονα θετικό φαινότυπο όσον αφορά την έκκριση ημικυτταρινάσης. Από τα 35 στελέχη που δοκιμάστηκαν, 20 από αυτά βρέθηκαν θετικά (ενισχύθηκε το τμήμα των 336 bp) και 15 από αυτά βρέθηκαν αρνητικά, υποδεικνύοντας έτσι ότι υπάρχουν διάφορα ένζυμα ικανά να αποδομήσουν ημικυτταρινάσες και έχουν διαφορετικούς τρόπους δράσης [59]. Τα ενισχυμένα τμήματα από 4 τυχαία στελέχη θετικά για το τμήμα των 336 bp της ενδοξυλανάσης [ON911245 (*Bacillus* sp.), ON911255 (*Bacillus* sp.), ON911280 (*B. safensis*) και ON911281 (*B. safensis*)] αναλύθηκαν ως προς την αλληλουχία τους. Οι αλληλουχίες που υποβλήθηκαν σε BlastN (Megablast) ταυτοποιήθηκαν ως τμήματα γονιδίου ενδοξυλανάσης.



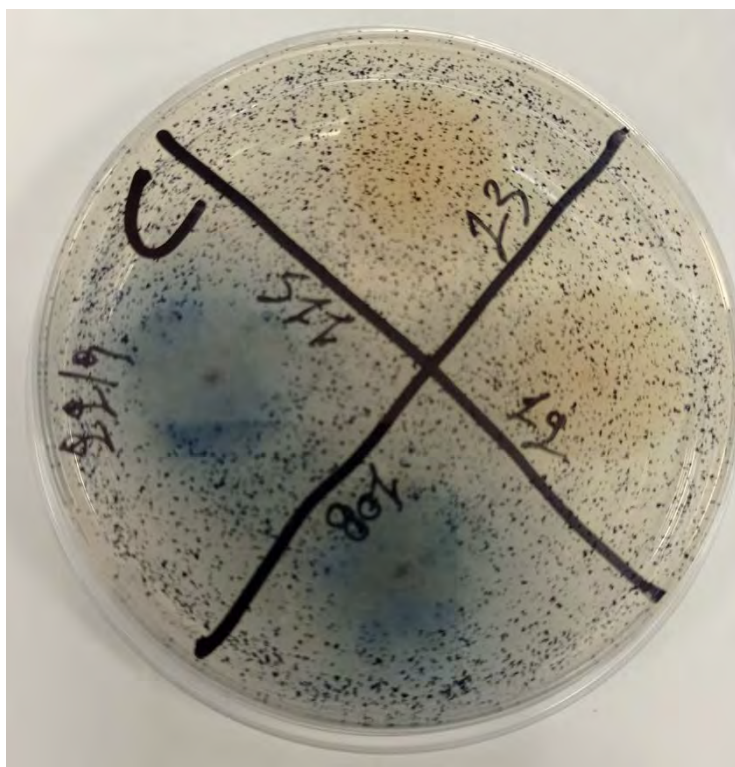
Φωτογραφία 13. Παραγωγή καφέ χρωστικής από τη διάσπαση της γουαϊακόλης. Φωτογραφία: Νίκος Ασούτης Διδάρας

Τμήμα που αντιστοιχεί στο γονίδιο της λακκάσης (μεγέθους 142 bp) ενισχύθηκε από στελέχη που εμφάνισαν φαινότυπο όσον αφορά την αποικοδόμηση χρωστικών. Από τα 55 στελέχη που εξετάστηκαν, τα 22 από αυτά βρέθηκαν θετικά (το τμήμα των 142 bp ενισχύθηκε) και τα 33 από αυτά βρέθηκαν αρνητικά. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν τη δραστηριότητα και άλλων ενζύμων εκτός από τη λακκάση (οξειδοαναγωγή του χαλκού) όπως η υπεροξειδάση της λιγνίνης (lignin peroxidase), η υπεροξειδάση του μαγγανίου (manganese peroxidase), η πολύπλευρη υπεροξειδάση (versatile peroxidase) και η υπεροξειδάση χρωστικής (dye peroxidase) [60]]. Το υπόστρωμα Guaiacol (2-μεθοξυφαινόλη) χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της δραστηριότητας της λακκάσης. Οι θετικές αποικίες εμφάνισαν καφέ χρώμα με ταυτόχρονη μικρή αλλαγή στο χρώμα του υποστρώματος. Υποθέτουμε ότι τα θετικά για λακκάση στελέχη μπορεί να παράγουν λακκάσες δεσμευμένες στη μεμβράνη. Τα ενισχυμένα τμήματα από 3 τυχαία στελέχη θετικά ως προς την ενίσχυση του τμήματος των 142 bp της λακκάσης [ON911251 (*B. subtilis*), ON911253 (*B. cereus*) και ON911267 (*B. thuringiensis*)] αναλύθηκαν ως προς την αλληλουχία τους. Οι αλληλουχίες που υποβλήθηκαν σε BlastN (Megablast) ταυτοποιήθηκαν πράγματι ως τμήματα του γονιδίου της λακκάσης.

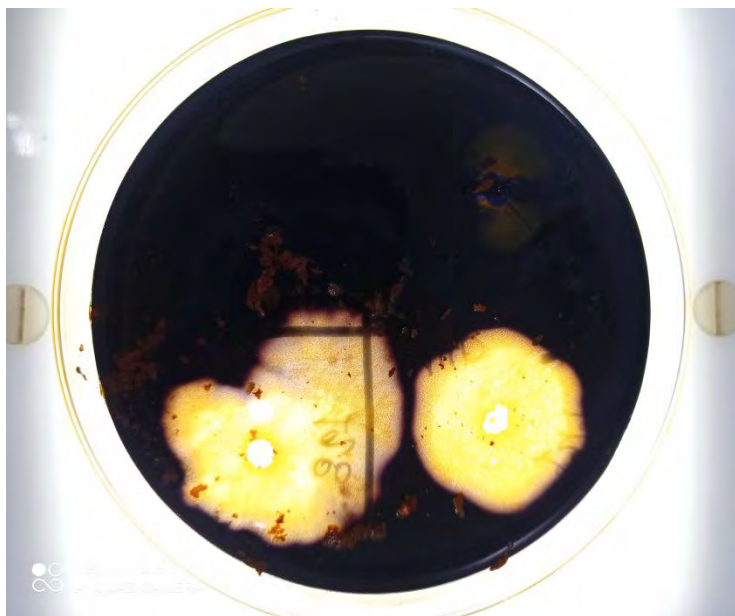
Η παραγωγή ενζύμων αποικοδόμησης λιγνίνης από τα βακτήρια του ΜΨ τους παρέχει την ικανότητα να αποικοδομούν την εξίνη (το εξωτερικό στρώμα των γυρεοκόκκων), ένα πολύ ανθεκτικό βιοπολυμερές που αποτελείται κυρίως από λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας και φαινολικές ενώσεις [61]. Η παραγωγή κυτταρινασών είναι επίσης κρίσιμη για την αποικοδόμηση της ιντίνης (το εσωτερικό στρώμα των γυρεοκόκκων) η οποία αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη [62]. Η ικανότητα των βακτηρίων του ΜΨ να διασπούν τους γυρεόκοκκους είναι απαραίτητη προκειμένου να απελευθερωθούν τα θρεπτικά συστατικά τους και οι βιοδραστικές ενώσεις που εμπεριέχονται σε αυτούς. Επιπλέον βιοδραστικές ενώσεις μπορεί να προκύπτουν και από τα παραγώμενα θραύσματα των στιβάδων των γυρεοκόκκων (δομές με φαινολικούς δακτυλίους, ξυλοσακχαρίτες, λιπαρά οξέα κ.α.).



Φωτογραφία 14. Διάσπαση χρωστικής Malachite Green. Φωτογραφία: Νίκος Ασούτης Διδάρας



Φωτογραφία 15. Διάσπαση κόκκων κυτταρίνης και απελευθέρωση χρωστικής. Φωτογραφία: Νίκος Ασούτης Διδάρας



Φωτογραφία 16. Διάσπαση αμύλου από βακτηριακή αμυλάση (φωτεινές περιοχές). Το αδιάσπαστο άμυλο παραμένει σκούρο (χρώση ιωδίου). Φωτογραφία: Νίκος Ασούτης Διδάρας

Πίνακας 30. Αντιβακτηριακή δράση στελεχών *Apilactobacillus* και *Fructobacillus*

Στέλεχος	Βακτήρια	Bp	% ομοιότητα	δράση έναντι του <i>S.aureus</i> cm	δράση έναντι της <i>P.aeruginosa</i> cm	δράση έναντι της <i>S. Typhimurium</i> cm	δράση έναντι της <i>K.pneumoniae</i> cm	Αριθμός Πρόσβασης
NADBB5	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	1446	99.79	0.8±0.1	3±0.8	2.7±0.9	3±0.7	ON911239
NADBB7	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	1452	100.00	0.6±0.1	3±0.8	2.7±0.9	3.1±0.7	ON911241
NADBB9	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	1424	99.86	0	3±0.1	2.7±0.4	3.2±0.2	ON911243
NADBB20	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	1447	100.00	0.7±0.1	2.4±1.4	3.4±0.7	3.5±0.5	ON911252
NADBB27	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	1412	99.79	0.9±0	2.7±1.2	3.4±0.4	2.8±1	ON911258
NADBB30	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	1433	99.86	0.7±0.3	3±0.8	2.8±1	3±0.9	ON911261
NADBB34	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	1413	100.00	0.9±0.2	2.9±1	3.3±0.8	3±1.3	ON911265
NADBB35	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	1208	100.00	1.6±0.4	3.3±0.8	3.2±1.2	3.4±0.8	ON911266
NADBB37	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	1446	100.00	1.1±0.2	3.4±0.9	3±1.3	3.3±0.9	ON911268
NADBB38	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	1443	100.00	1.1±0.1	3.3±1	3.1±1.2	3.3±0.9	ON911269
NADBB39	<i>Fructobacillus fructosus</i>	1393	99.43	0	2.4±0.4	1.8±0.3	2.7±0.6	ON911270
NADBB48	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	1447	100.00	1.1±0.4	3.3±1	3±1.2	3.3±0.9	ON911279

Πίνακας 31. Αντιβακτηριακή δράση και βιοσυνθετικό δυναμικό βακτηρίων απομονωμένων από ΜΨ

Στέλεχος	Βακτήριο	Bp	% ομοιότητα	Αντιβακτηριακή δράση	Βιοσυνθετικό δυναμικό	Αριθμός πρόσβασης
NADBB1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1400	100.00	1*,3*	A*, P*, R, G, <u>L</u>	ON911235
NADBB2	<i>Bacillus sp.</i>	1395	100.00	1***,3***,4***	X, <u>X</u> , A, P, G, M	ON911236
NADBB3	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1400	99.93	1*,3*,4***	A, P, G, M, <u>L</u>	ON911237
NADBB4	<i>Bacillus cereus</i>	1404	100.00	1***,2***,3***	A*, P, R, G, <u>L</u>	ON911238
NADBB6	<i>Bacillus siamensis</i>	1426	100.00	1**,3*,4*	C, X, A**, P, GUA λίγο	ON911240
NADBB8	<i>Bacillus sp.</i>	1416	100.00	1**,4***	X, A, G, M	ON911242
NADBB10	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1389	99.86	3**,4*	A, G, <u>L</u>	ON911244
NADBB11	<i>Bacillus sp.</i>	1417	99.93	1***,4***	X, <u>X</u> , <u>X</u> , A, P, G, M,	ON911245
NADBB13	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1390	99.93	3***	A, P**, R, G*, <u>L</u>	ON911246
NADBB14	<i>Bacillus sp.</i>	1376	99.93	1**,4*	C, X, <u>X</u> , P, R*	ON911247
NADBB16	<i>Bacillus licheniformis</i>	1400	99.57	1**,3*,4***	C*, A, P, G**, M	ON911248
NADBB17	<i>Bacillus subtilis</i>	1425	100.00	1**	C, X, A, P, M, <u>L</u>	ON911249

NADBB18	<i>Bacillus</i> sp.	1419	99.86	1**,3*,4*	A, P**, G, M*, <u>L</u>	ON911250
NADBB19	<i>Bacillus subtilis</i>	1423	100.00		C, X*, A, G, <u>L</u> , <u>L</u>	ON911251
NADBB21	<i>Bacillus cereus</i>	1398	99.93	3**	A*, P, R, G, <u>L</u> , <u>L</u>	ON911253
NADBB23	<i>Bacillus</i> sp.	1420	100.00	1**	X, <u>X</u> , P, G, M,	ON911254
NADBB24	<i>Bacillus</i> sp.	1414	100.00	1**,3***,4***	C, X**, <u>X</u> , <u>X</u> , P, G	ON911255
NADBB25	<i>Bacillus siamensis</i>	1410	100.00	1*	C, X, A**, P, M	ON911256
NADBB26	<i>Bacillus subtilis</i>	1392	100.00	1*,3*,4*	C, X, A, P, G, M	ON911257
NADBB28	<i>Bacillus</i> sp.	1418	99.93		A, G, M, <u>L</u>	ON911259
NADBB29	<i>Bacillus cereus</i>	1402	100.00	1**,2***,3***,4***	A, P, G**	ON911260
NADBB31	<i>Staphylococcus hominis</i>	1341	99.25		A, M*, <u>L</u>	ON911262
NADBB32	<i>Bacillus</i> sp.	1371	100.00	1***,3***,4***	C, X, <u>X</u> , P, G, M	ON911263
NADBB33	<i>Bacillus siamensis</i>	1417	99.86	1***,3***	C, X, A, P, M, G, <u>L</u>	ON911264
NADBB36	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1313	100.00	1*,3*,4*	A, P**, G, <u>L</u> , <u>L</u>	ON911267
NADBB40	<i>Bacillus safensis</i>	1416	100.00	1***,3**,4***	C, X, <u>X</u> , P, R**, G*, <u>L</u>	ON911271
NADBB41	<i>Bacillus</i> sp.	1419	99.93	1***,4***	C, X, <u>X</u> , P, G	ON911272
NADBB42	<i>Bacillus halotolerans</i>	1393	99.71	1**,3***,4***	C, X, A, P, G	ON911273
NADBB43	<i>Bacillus licheniformis</i>	1395	99.86	1*,4**	C*, A, P, G**, M	ON911274

NADBB44	<i>Bacillus safensis</i>	1383	100.00	1**,4**	X, P, R, G	ON911275
NADBB45	<i>Bacillus pumilus</i>	1391	100.00	1*	C, X, <u>X</u> , A, M;	ON911276
NADBB46	<i>Bacillus aerophilus</i>	1412	100.00	1**,3***	C, X, P, R, G*, M	ON911277
NADBB47	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1396	100.00	3***	A*, P*, R, G, <u>L</u>	ON911278
NADBB49	<i>Bacillus safensis</i>	1323	99.85	1*	X, <u>X</u> , <u>X</u> , P, G	ON911280
NADBB50	<i>Bacillus safensis</i>	1379	99.93	1**,3**,4**	X, <u>X</u> , <u>X</u> , P, G	ON911281

Ανίχνευση αντιβακτηριακής δράσης έναντι: 1: *S. aureus*, 2: *P. aeruginosa*, 3: *S. Typhimurium*, 4: *K. pneumoniae*, *: 3-7mm, **: 7-11mm, ***: >11mm

C: θετικός φαινότυπος για κυτταρίνη, X: θετικός φαινότυπος για ημικυτταρίνη,

X: αλληλούχηση τμήματος 336 bp της ενδοξυλανάσης,

X: ανίχνευση τμήματος του γονιδίου της ενδοξυλανάσης με τη χρήση PCR,

A: θετικός για αμυλάση φαινότυπος,

P: θετικός για πρωτεΐνη φαινότυπος,

R: αποδόμηση χρωστική coomassie brilliant blue red,

G: αποδόμηση χρωστικής coomassie brilliant blue green,

M: αποδόμηση χρωστικής malachite green,

L: αλληλούχηση τμήματος 142 bp του γονιδίου της λακκάσης,

L: ανίχνευση τμήματος του γονιδίου της λακκάσης με τη χρήση PCR.

Το μικροβίωμα του μελισσόψωμου μπορεί να διερευνηθεί περαιτέρω για την ταυτοποίηση και αξιοποίηση αντιμικροβιακών/αντι-ιικών ενώσεων και βιοτεχνολογικά σημαντικών ενζύμων αλλά και για τη δυνατότητα να δημιουργηθούν από αυτό καλλιέργειες εκκίνησης της ζύμωσης είτε της γύρης είτε και άλλων προϊόντων. Καθώς η συλλογή του μελισσόψωμου είναι ιδιαίτερα δύσκολη και η αφαίρεσή του από την κυψέλη μπορεί να στερήσει το μελίσσι από σημαντικά θρεπτικά συστατικά, η δυνατότητα να παραχθεί σε μεγάλη κλίμακα με τεχνητή ζύμωση της γύρης -που είναι πολύ πιο εύκολο να συλλεχθεί- έχει μεγάλη βιοτεχνολογική σημασία και μπορεί να οδηγήσει σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ Γ.1

1. Cardinal, S.; Danforth, B.N. Bees diversified in the age of eudicots. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2013, 280, 201226862.
2. Fan, T.-F.; Park, S.; Shi, Q.; Zhang, X.; Liu, Q.; Song, Y.; Chin, H.; Ibrahim, M.S.B.; Mokrzecka, N.; Yang, Y.; et al. Transformation of hard pollen into soft matter. *Nat. Commun.* 2020, 11, 1449.
3. Volkan Aylanc, Soraia I. Falcão, Seymanur Ertosun, Miguel Vilas-Boas, From the hive to the table: Nutrition value, digestibility and bioavailability of the dietary phytochemicals present in the bee pollen and bee bread, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 109, 2021, Pages 464-481, ISSN 0924-2244, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.042>.
4. Brodschneider, R.; Crailsheim, K. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 2010, 41, 278–294
5. Kostić, A.Ž.; Milinčić, D.D.; Barać, M.B.; Ali Shariati, M.; Tešić, Ž.L.; Pešić, M.B. The Application of Pollen as a Functional Food and Feed Ingredient—The Present and Perspectives. *Biomolecules* 2020, 10, 84. <https://doi.org/10.3390/biom10010084>
6. Kieliszek, M.; Piwowarek, K.; Kot, A.; Błazejak, S.; Chlebowska-Śmigiel, A.; Wolska, I. Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 2018, 71, 170–180.
7. Mărgăoan, R.; Stranț, M.; Varadi, A.; Topal, E.; Yücel, B.; Cornea-Cipcigan, M.; Campos, M.G.; Vodnar, D.C. Bee Collected Pollen and Bee Bread: Bioactive Constituents and Health Benefits. *Antioxidants* 2019, 8, 568
8. Bakour, M.; Fernandes, A.; Barros, L.; Soković, M.; Ferreira, I.; Badiaa, L. Bee bread as a functional product: Chemical composition and bioactive properties. *LWT* 2019, 109
9. Pełka, K., Otlowska, O., Worobo, R. W., & Szweda, P. (2021). Bee Bread Exhibits Higher Antimicrobial Potential Compared to Bee Pollen. *Antibiotics*, 10(2), 125. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020125>
10. Jelena Ćirić, Nils Haneklaus, Sara Rajić, Tatjana Baltić, Ivana Branković Lazić, Vesna Đorđević, Chemical composition of bee bread (perga), a functional food: A review, *Journal of Trace Elements and Minerals*, Volume 2, 2022, 100038, ISSN 2773-0506, <https://doi.org/10.1016/j.jtemin.2022.100038>.
11. Baky, M.H.; Abouelela, M.B.; Wang, K.; Farag, M.A. Bee Pollen and Bread as a Super-Food: A Comparative Review of Their Metabolome Composition and Quality Assessment in the Context of Best Recovery Conditions. *Molecules* 2023, 28, 715.
12. Vásquez, A.; Olofsson, T.C. The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *J. Apic. Res.* 2009, 48, 189–195.
13. Campos, M.; Frigerio, C.; Lopes, J.; Bogdanov, S. What is the future of Bee-Pollen? *J. ApiProduct ApiMedical Sci.* 2010, 2, 131–144.
14. Anđelković, B.; Jevtić, G.; Mladenović, M.; Marković, J.; Petrović, M.; Nedić, N. Quality of pollen and honey bee bread collected in spring. *J. Hyg. Eng. Des.* 2012, 1, 275–277
15. Bakour, M.; Laaroussi, H.; Ousaaid, D.; El Ghouizi, A.; Es-Safi, I.; Mechchate, H.; Lyoussi, B. Bee Bread as a Promising Source of Bioactive Molecules and Functional Properties: An Up-To-Date Review. *Antibiotics* 2022, 11, 203. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020203>

16. Didaras, N.A.; Karatasou, K.; Dimitriou, T.G.; Amoutzias, G.D.; Mossialos, D. Antimicrobial Activity of Bee-Collected Pollen and Beebread: State of the Art and Future Perspectives. *Antibiotics* 2020, 9, 811. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110811>
17. Didaras, N.A.; Kafantaris, I.; Dimitriou, T.G.; Mitsagga, C.; Karatasou, K.; Giavasis, I.; Stagos, D.; Amoutzias, G.D.; Hatjina, F.; Mossialos, D. Biological Properties of Bee Bread Collected from Apiaries Located across Greece. *Antibiotics* 2021, 10, 555
18. Saraiva, M.A.; Zemolin, A.P.; Franco, J.L.; Boldo, J.T.; Stefenon, V.M.; Triplett, E.W.; de Oliveira Camargo, F.A.; Roesch, L.F. Relationship between honeybee nutrition and their microbial communities. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2015, 107, 921–933. [Google Scholar] [CrossRef]
19. Dharampal, P.S.; Carlson, C.; Currie, C.R.; Steffan, S.A. Pollen-borne microbes shape bee fitness. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2019, 286, 20182894
20. Gilliam, M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997, 155, 1–10.
21. Kaškonienė, V.; Adaškevičiūtė, V.; Kaškonas, P.; Mickienė, R.; Maruška, A. Antimicrobial and antioxidant activities of natural and fermented bee pollen. *Food Biosci.* 2020, 34, 100532
22. Peřka, K.; Worobo, R.W.; Walkusz, J.; Szweda, P. Bee Pollen and Bee Bread as a Source of Bacteria Producing Antimicrobials. *Antibiotics* 2021, 10, 713. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060713>
23. Didaras, N.A.; Dimitriou, T.; Daskou, M.; Karatasou, K.; Mossialos, D. In vitro assessment of the antiviral activity of Greek bee bread and bee collected pollen against enterovirus D68. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 2021,
24. Dimitriou TG, Asoutis Didaras N, Barda C, Skopeliti D, Kontogianni K, Karatasou K, Skaltsa H, Mossialos D. Antiviral Activity of Beebread, Bee-Collected Pollen and Artificially Fermented Pollen against Influenza A Virus. *Foods*. 2023; 12(10):1978. <https://doi.org/10.3390/foods12101978>
25. Martinson, V.G.; Danforth, B.N.; Minckley, R.L.; Rueppell, O.; Tingek, S.; Moran, N.A. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Mol. Ecol.* 2011, 20, 619–628
26. Vásquez, A.; Forsgren, E.; Fries, I.; Paxton, R.J.; Flaberg, E.; Szekely, L.; Olofsson, T.C. Symbionts as major modulators of insect health: Lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS ONE* 2012, 7, e33188
27. Killer, J.; Dubná, S.; Sedláček, I.; Švec, P. *Lactobacillus apis* sp. nov., from the stomach of honeybees (*Apis mellifera*), having an in vitro inhibitory effect on the causative agents of American and European foulbrood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014
28. Di Cagno, R.; Filannino, P.; Cantatore, V.; Gobbetti, M. Novel solid-state fermentation of bee-collected pollen emulating the natural fermentation process of bee bread. *Food Microbiol.* 2019,
29. Ghosh, S.; Namin, S.M.; Jung, C. Differential Bacterial Community of Bee Bread and Bee Pollen Revealed by 16S rRNA High-Throughput Sequencing. *Insects* 2022, 13, 863. <https://doi.org/10.3390/insects13100863>
30. Gilliam, M. Microbiology of pollen and bee bread: The yeasts. *Apidologie* 1979, 10, 43–53
31. Gilliam, M. Microbiology of pollen and bee bread: The genus bacillus. *Apidologie* 1979, 10, 269–274.
32. Donkersley, P.; Rhodes, G.; Pickup, R.; Jones, K.; Wilson, K. Bacterial communities associated with honeybee food stores are correlated with land use. *Ecol. Evol.* 2018, 8, 4743–4756
33. Disayathanoowat, T.; Li, H.; Supapimon, N.; Suwannarach, N.; Lumyong, S.; Chantawannakul, P.; Jun, G. Microorganisms Different Dynamics of Bacterial and Fungal Communities in Hive-Stored Bee Bread and Their Possible Roles: A Case Study from Two Commercial Honey Bees in China. *Microorganisms* 2020, 8, 264
34. Barene, I.; Daberte, I.; Siksna, S. Investigation of bee bread and development of its dosage forms. *Medicinos Teorija ir Praktika* 2014, 21, 16–22
35. Dranca, F.; Ursachi, F.; Oroian, M. Bee Bread: Physicochemical Characterization and Phenolic Content Extraction Optimization. *Foods* 2020, 9, 1358. <https://doi.org/10.3390/foods9101358>
36. Olofsson, T.C.; Vásquez, A. Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Curr. Microbiol.* 2008, 57, 356–363.

37. Reis, J.A., Paula, A.T., Casarotti, S.N. et al. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Eng Rev* 4, 124–140 (2012). <https://doi.org/10.1007/s12393-012-9051-2>
38. S. RAMACHANDRAN et al.: Gluconic Acid: A Review, *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2) 185–195 (2006)
39. Sinpoo, Chainarong & Williams, Geoffrey & Chantawannakul, Panuwan. (2017). Dynamics of fungal communities in corbicular pollen and bee bread. *Chiang Mai Journal of Science.* 44. 1244-1256.
40. Detry, R.; Simon-Delso, N.; Bruneau, E.; Daniel, H.-M. Specialisation of Yeast Genera in Different Phases of Bee Bread Maturation. *Microorganisms* 2020, 8, 1789. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111789>
41. Fernandes, Tatiana & Silveira, Wendel & Lopes, Maria & Zucchi, Tiago. (2014). Oligonucleotide primers for specific detection of actinobacterial laccases from superfamilies I and K. *Antonie van Leeuwenhoek.* 106. 10.1007/s10482-014-0193-5.
42. Ausec, L., Berini, F., Casciello, C., Cretoiu, M. S., van Elsas, J. D., Marinelli, F., & Mandic-Mulec, I. (2017). The first acidobacterial laccase-like multicopper oxidase revealed by metagenomics shows high salt and thermo-tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(15), 6261-6276. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8345-y>
43. Sheng, Ping & Li, Yushan & Marshall, Sean & Zhang, Hongyu. (2015). High Genetic Diversity of Microbial Cellulase and Hemicellulase Genes in the Hindgut of *Holotrichia parallela* Larvae. *International journal of molecular sciences.* 16. 16545-59. 10.3390/ijms160716545.
44. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al., Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol.* 2019 Aug;37(8):852-857. doi: 10.1038/s41587-019-0209-9. Erratum in: *Nat Biotechnol.* 2019 Sep;37(9):1091. PMID: 31341288; PMCID: PMC7015180.
45. Callahan, B., McMurdie, P., Rosen, M. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 13, 581–583 (2016). <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
46. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2012, 41, D590–D596
47. Tsavea, E.; Mossialos, D. Antibacterial activity of honeys produced in Mount Olympus area against nosocomial and foodborne pathogens is mainly attributed to hydrogen peroxide and proteinaceous compounds. *J. Apic. Res.* 2019, 58, 756–763.
48. Pham, Van Hong Thi, Jaisoo Kim, Soonwoong Chang, and Donggyu Bang. 2023. "Investigating Bio-Inspired Degradation of Toxic Dyes Using Potential Multi-Enzyme Producing Extremophiles" *Microorganisms* 11, no. 5: 1273. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051273>
49. Semira Nureddin Yassin, Tamene Milkessa Jiru, Meera Indracanti, "Screening and Characterization of Thermostable Amylase-Producing Bacteria Isolated from Soil Samples of Afdera, Afar Region, and Molecular Detection of Amylase-Coding Gene", *International Journal of Microbiology*, vol. 2021, Article ID 5592885, 14 pages, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5592885>
50. Maski, Soufiane & Ngom, Serigne Inssa & Rached, Bahia & Chouati, Taha & Benabdelkhalek, Mohamed & Fahime, Elmostafa & Amar, Mohamed & Béra-Maillet, Christel. (2021). Hemicellulosic biomass conversion by Moroccan hot spring *Bacillus paralicheniformis* CCMM B940 evidenced by glycoside hydrolase activities and whole genome sequencing. *3 Biotech.* 11. 379. 10.1007/s13205-021-02919-0.
51. Subramanian V, Farmer SJ, Heiland KL, Moore KT, Wall TAV, Sun W, Chaudhari YB, Himmel ME, Decker SR. A multi-plex protein expression system for production of complex enzyme formulations in *Trichoderma reesei*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2023 Feb 13;49(6):kuac027. doi: 10.1093/jimb/kuac027. PMID: 36513366; PMCID: PMC9923369.

52. Sheikhi F, Roayaei Ardakani M, Enayatizamir N, Rodriguez-Couto S. The Determination of Assay for Laccase of *Bacillus subtilis* WPI with Two Classes of Chemical Compounds as Substrates. *Indian J Microbiol.* 2012 Dec;52(4):701-7. doi: 10.1007/s12088-012-0298-3. Epub 2012 Aug 29. PMID: 24293734; PMCID: PMC3516662.
53. Fernandes, Tatiana & Silveira, Wendel & Lopes, Maria & Zucchi, Tiago. (2014). Oligonucleotide primers for specific detection of actinobacterial laccases from superfamilies I and K. *Antonie van Leeuwenhoek.* 106. 10.1007/s10482-014-0193-5.
54. Ausec, Luka & Elsas, Jan & Mandic-Mulec, Ines. (2011). Two- and three-domain bacterial laccase-like genes are present in drained peat soils. *Soil Biology and Biochemistry.* 43. 975-983. 10.1016/j.soilbio.2011.01.013.
55. Sheng P, Li Y, Marshall SDG, Zhang H. High Genetic Diversity of Microbial Cellulase and Hemicellulase Genes in the Hindgut of *Holotrichia parallela* Larvae. *International Journal of Molecular Sciences.* 2015; 16(7):16545-16559. <https://doi.org/10.3390/ijms160716545>
56. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018, 35, 1547–1549
57. Li, Xiangzhen & Rui, Junpeng & Mao, Yuejian & Yannarell, Anthony & Mackie, Roderick. (2014). Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. *Soil Biology and Biochemistry.* 68. 392-401. 10.1016/j.soilbio.2013.10.017.
58. Dimov, Svetoslav G., Lyuben Zagorchev, Mihail Iliev, Tereza Dekova, Ralitzia Ilieva, Meglena Kitanova, Dimitrina Georgieva-Miteva, Martin Dimitrov, and Slavic Peykov. 2021. "A Snapshot Picture of the Fungal Composition of Bee Bread in Four Locations in Bulgaria, Differing in Anthropogenic Influence" *Journal of Fungi* 7, no. 10: 845. <https://doi.org/10.3390/jof7100845>
59. Malgas, S., Mafa, M.S., Mkabayi, L. et al. A mini review of xylanolytic enzymes with regards to their synergistic interactions during hetero-xylan degradation. *World J Microbiol Biotechnol* 35, 187 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2765-z>
60. Wang X, Yao B, Su X. Linking Enzymatic Oxidative Degradation of Lignin to Organics Detoxification. *Int J Mol Sci.* 2018 Oct 28;19(11):3373. doi: 10.3390/ijms19113373. PMID: 30373305; PMCID: PMC6274955.
61. Glinkerman CM, Lin S, Ni J, Li FS, Zhao X, Weng JK. Sporopollenin-inspired design and synthesis of robust polymeric materials. *Commun Chem.* 2022 Sep 12;5(1):110. doi: 10.1038/s42004-022-00729-w. PMID: 36697794; PMCID: PMC9814627.
62. Iravani S, Varma RS. Plant Pollen Grains: A Move Towards Green Drug and Vaccine Delivery Systems. *Nanomicro Lett.* 2021 May 15;13(1):128. doi: 10.1007/s40820-021-00654-y. PMID: 34138347; PMCID: PMC8124031.

Γ.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΑΠΟ *Vairimorpha (Nosema) ceranae* ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ ΤΗΣ ΜΕΛΙΣΣΑΣ (*Apis mellifera*) ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ

Γ.2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ευρωπαϊκή μέλισσα (*Apis mellifera*) είναι ένα έντομο ζωτικής σημασίας για το περιβάλλον και τον άνθρωπο, όχι μόνο λόγω της χρήσης των μελισσοκομικών προϊόντων στη διατροφή του ανθρώπου, στη μελισσοθεραπεία και στη βιομηχανία καλλυντικών, αλλά κυρίως για τον ρόλο της μέλισσας στην επικονίαση των καλλιεργειών και την επισιτιστική ασφάλεια καθώς και στη διατήρηση της βιοποικιλότητας των φυτών [1]. Ωστόσο, τις τελευταίες δύο δεκαετίες, οι απώλειες μελισσών έχουν αυξηθεί σημαντικά, ιδιαίτερα στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική, ενώ από την άλλη πλευρά, οι μονοκαλλιέργειες που απαιτούν επικονίαση έχουν επεκταθεί σημαντικά [2,3]. Οι απώλειες αποδίδονται σε διάφορους παράγοντες, όπως η Βαρρόωση [4], αναδυόμενα παθογόνα που προκαλούν ασθένειες, απώλειες οικοτόπων, κλιματική κρίση και διατροφικές ελλείψεις, χρήση φυτοφαρμάκων, που επηρεάζουν αρνητικά την υγεία των μελισσών [5,6].

Ένας παθογόνος παράγοντας που σχετίζεται με τις απώλειες των μελισσών και το Σύνδρομο Κατάρρευσης είναι το ενδοκυτταρικό μικροσπορίδιο *Vairimorpha (Nosema) ceranae*, η οποία προκαλεί την ασθένεια Νοζέμωση (Nosemosis) [7]. Η *V. ceranae* αποικίζει το μέσο έντερο της μέλισσας, προκαλώντας καταστροφή του επιθηλιακού ιστού και διαταραχή της κυτταρικής ανανέωσης [8]. Άλλα κοινά συμπτώματα περιλαμβάνουν την καταστολή των ανοσολογικών αποκρίσεων, αλλοιωμένο μεταβολισμό (με αποτέλεσμα ενεργειακό στρες) και τροποποίηση των επιπέδων των φερομονών που παράγονται από τις εργάτριες και τη βασίλισσα [9]. Αυτά τα συμπτώματα συνολικά οδηγούν σε μειωμένη παραγωγή μελιού και γύρης, πρόωρη μετάπτωση των παραμάνων εργατριών σε συλλέκτριες και κυρίως αυξημένη θνησιμότητα μελισσών [10]. Συχνά, σε συνδυασμό με άλλους στρεσογόνους παράγοντες, η Νοσέμωση καταλήγει σε σημαντική εξασθένηση της αποικίας ή και σε ξαφνική κατάρρευσή της.

Το μικροβίωμα του εντέρου παίζει καθοριστικό ρόλο στην υγεία και την ασθένεια της μέλισσας, συμβάλλοντας σε διάφορες λειτουργίες όπως ο μεταβολισμός, η ανοσολογική απόκριση, η προστασία από παθογόνα, η ανάπτυξη των ατόμων με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση της αποικίας [11]. Το οπίσθιο έντερο της ενήλικης εργάτριας του είδους *A. mellifera* αποικίζεται από συγκεκριμένους βακτηριακούς φυλότυπους που συνιστούν το βασικό (πυρηνικό) βακτηρίωμα του, οι οποίοι υπάρχουν συνήθως και σε άλλα κοινωνικά είδη μελισσών (άλλα είδη *Apis*, μέλισσες χωρίς κεντρί, βομβίνοι) [12]. Αυτοί οι φυλότυποι είναι οι *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola*, *Bifidobacterium* sp. και *Lactobacillus Firm-4* και *Firm-5*. Υπάρχουν αρκετοί άλλοι φυλότυποι που σχετίζονται συχνά με την *A. mellifera* και το περιβάλλον της κυψέλης, αν και δεν ανευρίσκονται αναγκαστικά στο έντερο όλων των ενηλίκων μελισσών σε μια αποικία. Αυτό το επικουρικό (auxiliary) βακτηρίωμα περιλαμβάνει τα: *Bartonella apis*, *Frischella perrara*, *Alpha 2.2* (γνωστό ως *Parasaccharibacter apium*) και *Commensalibacter* sp. (αναφέρεται επίσης ως *Alpha 2.1*) [12].

Αξίζει να σημειωθεί ότι η δομή του μικροβιώματος του εντέρου της μέλισσας ποικίλλει ανάλογα με την ηλικία και το στάδιο ανάπτυξης [13]. Επίσης στις νεοεκκολαπτόμενες μέλισσες και στις νεαρές παραμάνες παρατηρείται αφθονία πολλών διαφορετικών μικροβιακών ομάδων σε σύγκριση με τις ενήλικες εργάτριες, στις οποίες συνήθως εστιάζονται οι έρευνες που αφορούν το μικροβίωμα του εντέρου τις μέλισσες [13].

Το μυκοβίωμα του εντέρου της *A. mellifera* είναι λιγότερο ταυτοποιημένο και εμφανίζεται πιο μεταβλητό μεταξύ των μελών της ίδιας αποικίας συγκρινόμενο με το βακτηρίωμα τους [14]. Πρόσφατες μελέτες που χρησιμοποιούν μεταταξινομική προσέγγιση αποκάλυψαν ότι τα κυρίαρχα φύλα ήταν τα Ascomycota και τα Basidiomycota [15, 16].

Αν και η μικροχλωρίδα του πεπτικού συστήματος της μέλισσας έχει μελετηθεί διεξοδικά, λίγα είναι γνωστά για τις πιθανές αλληλεπιδράσεις της με τη *V. ceranae*. Ομοίως, δεν είναι γνωστό το πώς μπορούν να επηρεαστούν οι μικροβιακές κοινότητες του ΜΨ από το συγκεκριμένο παθογόνο.

Περαιτέρω, η διάγνωση και ιδιαίτερα η πρόγνωση της εξέλιξης της Νοζέμωσης εξακολουθεί να αποτελεί πρόκληση για τους ειδικούς αλλά και για τους μελισσοκόμους εφόσον σχετίζεται με την επιβίωση των μελισσιών τους [17]. Σε αυτή τη μελέτη, χρησιμοποιήσαμε μια μεταταξινομική προσέγγιση για να διερευνήσουμε πώς η *V. ceranae* μπορεί να επηρεάσει το μικροβίωμα του εντέρου (βακτήρια και μύκητες) των ενήλικων μελισσών της *A. mellifera*, καθώς και το μικροβίωμα του ΜΨ, σε φυσικά μολυσμένες αποικίες που επιδεικνύουν σοβαρή μόλυνση από *V. ceranae* (αριθμός σπορίων >2.500.000 ανά μέλισσα) σε σύγκριση με αποικίες με πολύ χαμηλό φορτίο σπορίων (<40.000 ανά μέλισσα).

Γ.2.2. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

ΤΟΠΟΘΕΣΙΑ ΜΕΛΕΤΗΣ, ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΡΙΘΜΟΥ ΣΠΟΡΙΩΝ

Σε αυτή τη μελέτη, οι αποικίες μελισσών από τις οποίες λήφθηκαν τα δείγματα εμφάνιζαν φυσική μόλυνση με *V. ceranae* και διατηρούνται στο μελισσοκομείο του Τμήματος Μελισσοκομίας του Ινστιτούτου Επιστήμης των Ζώων του Ελληνικού Αγροτικού Οργανισμού ΔΗΜΗΤΡΑ (Αγ. Μάμας Χαλκιδικής, Βόρεια Ελλάδα). Οι συγκεκριμένες αποικίες (περισσότερες από 100) διατηρούνται μόνο για πειραματικούς σκοπούς [18]. Συλλέχθηκαν δείγματα ενήλικων μελισσών από όλες τις αποικίες στο μελισσοκομείο, και προσδιορίστηκε ο αριθμός των σπορίων *Nosema* ανά δείγμα μελισσών για κάθε αποικία. Έξι αποικίες συνολικά, τρεις με χαμηλό αριθμό σπορίων *Nosema* και τρεις με υψηλό αριθμό σπορίων, επιλέχθηκαν και σχηματίστηκαν δύο ομάδες Α και Β, αντίστοιχα. Προκειμένου να μετρηθούν τα επίπεδα σπορίων της *V. ceranae* και να εξαχθεί DNA, συλλέχθηκαν 120 μέλισσες (17 Μαΐου 2021) από τα εξωτερικά πλαίσια κάθε κυψέλης. Οι μισές (60 μέλισσες) αποθηκεύτηκαν σε αιθανόλη στους 4°C και χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταταξινομική ανάλυση. Οι υπόλοιπες (60 μέλισσες) χρησιμοποιήθηκαν για την καταμέτρηση των σπορίων. Η ανίχνευση και η μέτρηση των σπορίων πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με μια τροποποιημένη μέθοδο που περιγράφηκε από τους Cantwell and Fries [19, 20]. Αρχικά αφαιρέθηκαν οι κοιλιές των μελισσών και εμποτίστηκαν με 5 ml απεσταγμένο νερό, στη συνέχεια το υγρό διηθήθηκε μέσα από ένα λεπτό βαμβακερό πλέγμα και το πλέγμα ξεπλύθηκε με 4 ml αποσταγμένου νερού. Στη συνέχεια, λήφθηκε δείγμα 3 ml και φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά σε 800x g. Τέλος, το υπερκείμενο απορρίφθηκε, 3 ml νερού προστέθηκαν στο ίζημα και το δείγμα ομογενοποιήθηκε με ανακίνηση. Τα σπόρια μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας μια αντικειμενοφόρο πλάκα αιμοκυτταρομέτρου. Κάθε σπόριο *V. ceranae* (το πλέγμα του αιμοκυτταρομέτρου αποτελείται από 25 × 16 = 400 μικρά τετράγωνα) αντιστοιχούσε κατά μέσο όρο σε 1500 σπόρια ανά μέλισσα. Οι μετρήσεις αναφέρονται στον αριθμό των σπορίων ανά μέλισσα.

ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ *V. ceranae*

Η παρουσία και η διαφοροποίηση της *V. ceranae* από τη *V. apis* επιβεβαιώθηκε στα δείγματά μας με τη χρήση διπλής (duplex) PCR, ενισχύοντας ταυτόχρονα δύο περιοχές του 16S rRNA γονιδίου. Χρησιμοποιήθηκαν δύο σετ εκκινητών: 218 MITOC FOR/REV που ενισχύουν ένα τμήμα 218 bp όσον αφορά τη *V. ceranae* και 321 APIS FOR/REV που ενισχύει ένα τμήμα 321 bp για την *V. apis* [21]. Εν συντομία, το DNA ενισχύθηκε σε ένα μίγμα αντίδρασης 50 μl που περιλαμβάνει 1 mM dNTPs (Invitrogen, Waltham, MA, USA), 1x ρυθμιστικό διάλυμα Α (Nippon Genetics, Τόκιο, Ιαπωνία), 2 mM MgCl₂ (Nippon Genetics), 20 pmol από κάθε εκκινητή, 2U Fastgene Taq Polymerase (Nippon Genetics) και διπλά απεσταγμένο νερό ελεύθερο νουκλεάσης μέχρι συμπλήρωσης του τελικού όγκου των 50 μL. Οι συνθήκες του θερμικού κυκλοποιητή ήταν 3 λεπτά στους 95°C για την αρχική αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA ακολουθούμενη από 40 κύκλους αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδισμό των εκκινητών στους 50° C για 30 δευτερόλεπτα και επέκταση στους 72° C για 1 λεπτό, με τελική επέκταση 2 λεπτών στους 72° C. Τα ενισχυμένα τμήματα (αμπλικόνια) οπτικοποιήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης 1,5% (w/v) (Nippon Genetics) υπό υπεριώδες φως.

ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA ΑΠΟ ΜΨ

Ολικό DNA εκχυλίστηκε χρησιμοποιώντας ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο από τους Casas et al [22] το οποίο μας έδωσε τη δυνατότητα να εκχυλίσουμε επαρκή ποσότητα και αποδεκτής ποιότητας DNA. Αρχικά 180 mg ΜΨ από κάθε δείγμα τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια Eppendorf των 1,5 ml και αναμίχθηκαν με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-EDTA (1 mM tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 7,0) που περιείχε 300 µg/ml Πρωτεΐνωση K (Blirt, Gdansk, Πολωνία). Μετά από ανάμιξη τα δείγματα επώαστηκαν για 30 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια 500 µl από κάθε δείγμα μεταφέρθηκαν σε ένα καθαρό, αποστειρωμένο σωληνίσκο των 2 ml. Ακολούθως, 1,5 ml χαοτροπικό διάλυμα λύσης [GuSCN 4 M, N-lauroyl sarcosine 0,5%, διθειοθρεϊτόλη (DTT) 1 mM, κιτρικό τρινάτριο 25 mM] προστέθηκε σε κάθε δείγμα. Ακολούθησε έντονη ανάδευση και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη λύση, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε τρεις διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στα 10.000× g: για 10, 5 και 5 λεπτά αντίστοιχα. Μετά από κάθε φυγοκέντρηση, μόνο το μισό από το αρχικό υπερκείμενο μεταφέρονταν σε καθαρό σωλήνα, ενώ το ανώτερο στρώμα και το ίζημα απορρίπτονταν. Τελικά, 250 µl του υπερκειμένου αναμίχθηκαν με 6,3 µl γλυκογόνου (5 mg/ml) και επώαστηκαν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η καθίζηση του DNA έλαβε χώρα χρησιμοποιώντας ίσο όγκο ψυχρής ισοπροπυλικής αλκοόλης. Το ξηρό ίζημα διαλύθηκε σε 63 µl αποστειρωμένου διπλά απεσταγμένου νερού και τα εκχυλίσματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA ΑΠΟ ΜΕΛΙΣΣΕΣ

Δέκα μέλισσες ανά δείγμα πλύθηκαν (ξεχωριστά η κάθε μια) δύο φορές χρησιμοποιώντας καθαρή αιθανόλη για την απομάκρυνση τυχόν επιφανειακών επιμολύνσεων. Στη συνέχεια, η κάθε κοιλιά αποκολλήθηκε χρησιμοποιώντας στείρα εργαστηριακή λαβίδα. Οι κοιλιές λειοτριβήθηκαν με τη χρήση καθαρού αποστειρωμένου πλαστικού εμβόλου σε 200 µl ρυθμιστικό διάλυμα Tris-EDTA (1 mM tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 7,0) που περιείχε 300 µg/ml πρωτεΐνωση K (Blirt, Gdansk, Πολωνία). Τα δείγματα επώαστηκαν για 30 λεπτά στους 37°C και η υπόλοιπη διαδικασία ήταν πανομοιότυπη με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω για την εκχύλιση DNA από ΜΨ.

ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΜΕΣΩ PCR ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΕΠΟΜΕΝΗΣ ΓΕΝΙΑΣ (NGS)

Το εκχυλισμένο ολικό DNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την ενίσχυση της περιοχής V3-V4 του 16S rRNA γονιδίου. Οι εκκινητές 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGAGCA-3') και 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR. Αντιστοίχως για τους μύκητες ενισχύθηκε η περιοχή ITS1 χρησιμοποιώντας τους εκκινητές ITS1-1F-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') και ITS1-1F-R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'). Η ποιότητα των ενισχυμένων τμημάτων αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης και φωτομέτρηση σε nanodrop. Στη συνέχεια, τα προϊόντα PCR χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή βιβλιοθήκης. Ακολούθησε αλληλούχηση και προς τις δύο κατευθύνσεις σε πλατφόρμα Illumina MiSeq PE250 (Illumina, San Diego, CA, USA) από τη Novogene Ltd (Cambridge, UK). Όλη η διαδικασία της NGS υλοποιήθηκε από τη Novogene Ltd. Οι αναγνώσεις των αλληλουχιών κατατέθηκαν στη βάση δεδομένων NCBI Sequence Read Archive (SRA) (Αριθμός πρόσβασης: PRJNA888378).

ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η βιοπληροφορική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοπληροφορικής του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και από την εταιρεία Novogene Ltd (Cambridge, UK). Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό FLASH [23] για την αντιστοίχιση των αλληλουχιών διαφορετικής κατεύθυνσης. Για το φιλτράρισμα ποιότητας χρησιμοποιήθηκε το QIIME1 [24] και η ανίχνευση χιμαιρικών αλληλουχιών επιτεύχθηκε με τον αλγόριθμο UCHIME [25].

Στη συνέχεια, οι αλληλουχίες ομαδοποιήθηκαν (97% ταυτότητα) χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο UPARSE [26]. Στις αντιπροσωπευτικές αλληλουχίες αντιστοιχήθηκαν τα ταξινομικά τους επίπεδα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο QIIME1 Mothur με χρήση της βάσης δεδομένων SILVA138 [27] όσον αφορά τις 16S rRNA περιοχές και τη UNITE8 [28] για τις ITS περιοχές. Για τις μετρήσεις ποικιλότητας χρησιμοποιήθηκαν το scikit-bio και το QIIME1. Από τις Λειτουργικές Ταξινομικές Μονάδες (Operating Taxonomic Units, OTUs) αποκλείστηκαν αλληλουχίες μιτοχονδριακής και χλωροπλαστικής προέλευσης. Σε μεταγενέστερες αναλύσεις, OTU με συχνότητες μικρότερες του 1% επί του συνόλου των αλληλουχιών ομαδοποιήθηκαν όλες μαζί σε μια κατηγορία που ονομάζεται «others». Στατιστική ανάλυση του αριθμού των OTU και της σχετικής αφθονίας τους μεταξύ των δειγμάτων κάθε ομάδας (A, B, C και D) διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας αμφίπλευρη T δοκιμή (two-tailed T-test with unequal variance) (Microsoft Excel).

Γ.2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΠΟΡΙΩΝ ΤΗΣ *V. ceranae*

Τα δεδομένα της μέτρησης των σπορίων της *V. ceranae* παρουσιάζονται στον Πίνακα 32.

Πίνακας 32. Αριθμός κυψέλης, μέσος αριθμός σπορίων ανά μέλισσα, προσδιορισμός δείγματος και ομαδοποίηση δειγμάτων για μεταταξινομική ανάλυση

ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Αριθμός κυψέλης	<i>V. ceranae</i> μέσος όρος σπορίων ανά μέλισσα	Αριθμός δείγματος κατά την μεταταξινομική ανάλυση	Ομάδες δειγμάτων
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕΛΙΣΣΩΝ	11 μέλισσες	6.000	A1	A
	14 μέλισσες	24.000	A2	
	15 μέλισσες	39.000	A3	
	12 μέλισσες	4,500,000	B1	B
	27 μέλισσες	2,800,000	B2	
	112 μέλισσες	4,200,000	B3	
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ	11 ΜΨ		C1	C
	14 ΜΨ	-	C2	
	15 ΜΨ		C3	
	12 ΜΨ		D1	D
	27 ΜΨ	-	D2	
	112 ΜΨ		D3	

Αποικίες που έχουν μετρήσεις σπορίων >2.500.000 ανά μέλισσα θεωρήθηκαν πολύ μολυσμένες ενώ οι αποικίες που παρουσίαζαν πολύ χαμηλό αριθμό σπορίων (<40.000 ανά μέλισσα) θεωρήθηκαν χαμηλής μόλυνσης. Η διαφοροποίηση των σπορίων της *V. ceranae* από αυτά της *V. apis* με τη χρήση κλασικής μικροσκοπίας θεωρείται ιδιαίτερα δύσκολη. Για αυτό το σκοπό έγινε μοριακή ταυτοποίηση τους με τη χρήση διπλής PCR. Σε όλες τις μέλισσες της ομάδας Β ενισχύθηκε η περιοχή που αντιστοιχεί στη *V. ceranae* αλλά όχι στη *V. apis*. Δεν ανιχνεύθηκε προϊόν PCR σε μέλισσες της ομάδας Α που παρουσίαζαν χαμηλό αριθμό σπορίων. Ομοίως, κανένα προϊόν PCR δεν ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα ΜΨ που δοκιμάστηκαν.

ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΕΠΟΜΕΝΗΣ ΓΕΝΙΑΣ NGS - ΜΟΝΑΔΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΕΣ ΜΟΝΑΔΕΣ (OTUS) ΚΑΙ ΔΕΙΚΤΕΣ Α-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ (ALPHA DIVERSITY)

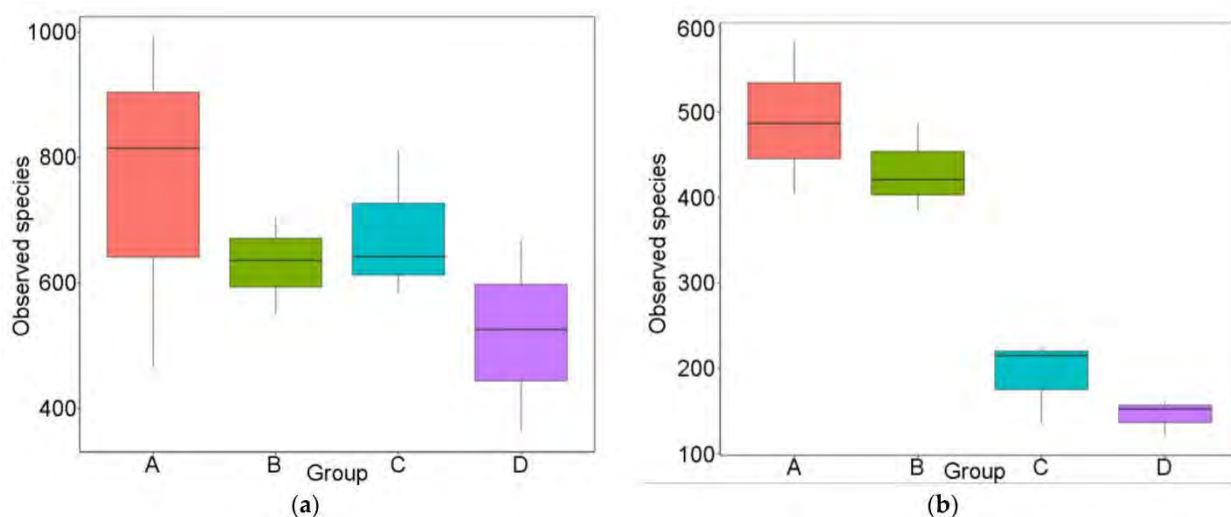
Η ομάδα Α (group A1-A3) περιλαμβάνει δείγματα μελισσών με χαμηλό αριθμό σπορίων *V. ceranae* ενώ η ομάδα Β (group B1-B3) περιλαμβάνει δείγματα μελισσών που έδειξαν υψηλό αριθμό σπορίων *V. ceranae*. Η ομάδα C (group C1-C3) περιλαμβάνει δείγματα ΜΨ που συλλέχθηκαν από αποικίες με χαμηλό αριθμό σπορίων *V. ceranae* ενώ η ομάδα D (group D1-D3) περιλαμβάνει δείγματα ΜΨ που συλλέχθηκαν από αποικίες με υψηλό αριθμό σπορίων *V. ceranae* (Πίνακας 32). Οι αναγνωρισμένες μοναδικές λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (OTUs) και οι τιμές των δεικτών της α-ποικιλότητας ήταν υψηλότερες όσον αφορά τα βακτήρια (αν και όχι στατιστικά σημαντικές— p -value > 0,05) σε δείγματα της ομάδας Α (Δείκτης Shannon = 4,357 [3,898–4,667], δείκτης Simpson = 0,9056 [0,891–0,918], δείκτης $chaol$ = 831.139 [536.734– 1079.531]) από ό,τι στα δείγματα της ομάδας Β (δείκτης Shannon = 4.190 [3.989–4.316], δείκτης Simpson = 0,9053 [0,896–0,911], δείκτης $chaol$ = 691,179 [593,327–762,569]) (Εικόνα 8α, Πίνακας 33). Η ανάγνωση των αλληλουχιών εντός των ομάδων Α και Β ήταν πολύ υψηλή, όπως αντικατοπτρίζεται από το δείκτη Goods coverage index ο οποίος πλησιάζει τη μονάδα 0,998–0,999 (Πίνακας 33). Οι παρατηρούμενες μοναδικές λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (OTUs) και οι τιμές των δεικτών της α-ποικιλότητας ήταν επίσης υψηλότερες—όσον αφορά τα βακτήρια- (αν και όχι στατιστικά σημαντικές - τιμή p > 0,05) στα δείγματα της ομάδας C (δείκτης Shannon = 3,937 [2,384 – 5,395], δείκτης Simpson [0]. 0,629 – 0,927], δείκτης $chaol$ = 746.520 [649.729 – 863.944]) σε σύγκριση με τα δείγματα της ομάδας D (δείκτης Shannon = 3.357 [2.222 – 3.995], δείκτης Simpson = 0.791 – 0.773 = 0.791 – 0. 52 [417.338 - 746.887]) (Εικόνα 9α, Πίνακας 33). Η ανάγνωση των αλληλουχιών εντός των ομάδων C και D ήταν πολύ υψηλή, όπως αντικατοπτρίζεται από το δείκτη Goods coverage index ο οποίος πλησιάζει τη μονάδα έως 0,999 (Πίνακας 33).

Πίνακας 33. Δείκτες α-ποικιλότητας και δείκτης goods coverage για τη 16S περιοχή

Δείγμα	Δείκτης Shannon	Δείκτης Simpson	Δείκτης $chaol$	Δείκτης A-oods coverage
A1	4.508	0.908	1079.531	0.998
A2	4.667	0.918	877.153	0.999
A3	3.898	0.891	536.734	0.999
B1	4.266	0.911	717.643	0.999
B2	4.316	0.909	762.569	0.999
B3	3.989	0.896	593.327	0.999
C1	2.384	0.629	725.889	0.998
C2	4.034	0.875	649.729	0.999
C3	5.395	0.927	863.944	0.999
D1	3.995	0.877	599.333	0.999
D2	2.222	0.590	417.338	0.999
D3	3.854	0.854	746.887	0.999

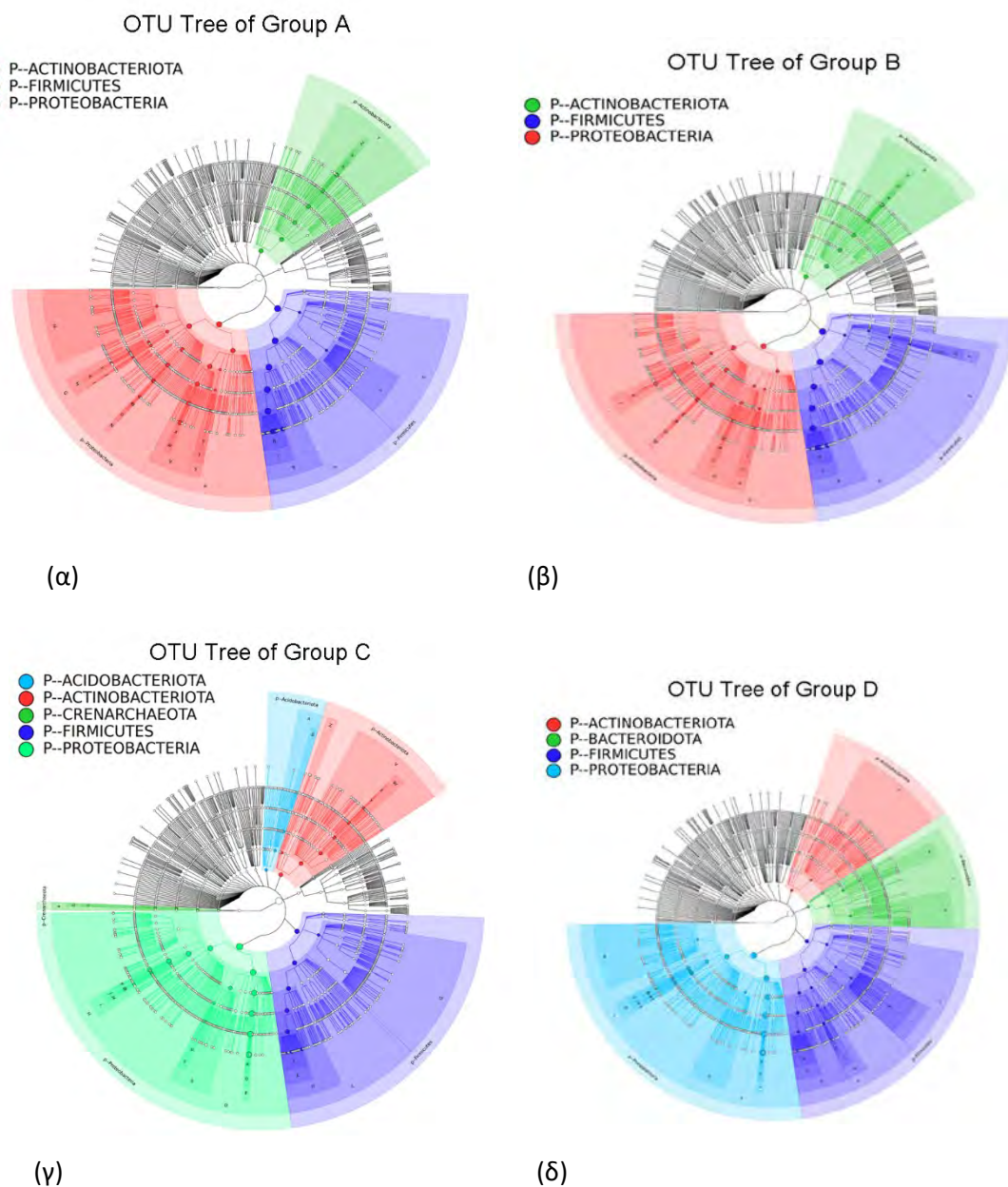
Πίνακας 34. Δείκτες α- ποικιλότητας και δείκτης goods coverage για την ITS περιοχή

Δείγμα	Δείκτης Shannon	Δείκτης Simpson	Δείκτης chao1	Δείκτης goods coverage
A1	3.960	0.848	626.272	0.999
A2	2.981	0.788	448.036	0.999
A3	3.708	0.844	518.474	0.999
B1	3.489	0.858	413.750	0.999
B2	2.400	0.664	451.800	0.999
B3	2.609	0.726	543.289	0.999
C1	3.465	0.850	245.023	1.000
C2	2.626	0.799	153.000	1.000
C3	3.126	0.826	226.810	1.000
D1	2.742	0.749	166.032	1.000
D2	3.109	0.843	172.111	1.000
D3	2.298	0.709	125.038	1.000



Εικόνα 8. Λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (OTUs): (a) βακτηριακά είδη (Observed species) και (b) μυκητιακά είδη (Observed species) είδη στις ομάδες (Group) A, B, C και D.

Όσον αφορά τους μύκητες, οι παρατηρούμενες μοναδικές λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (OTUs) και οι τιμές των δεικτών της α-ποικιλότητας ήταν κάπως υψηλότερες (όχι στατιστικά σημαντικές— p -value > 0,05) στα δείγματα της ομάδας A (Δείκτης Shannon = 3,549 [2,981–3,96], δείκτης Simpson = 0,826 [0,788–0,848], δείκτης chao1 = 530.927 [448.036–626.272]) σε σύγκριση με τα δείγματα της ομάδας B (δείκτης Shannon = 2,83 [2,4–3,489], δείκτης Simpson = 0,749 [0,664–0,858], δείκτης chao1 = 469,613 [413,75–543,289]) (Εικόνα 8b, Πίνακας 34). Η ανάγνωση των αλληλουχιών εντός των ομάδων A και B ήταν επίσης πολύ υψηλή, όπως αντικατοπτρίζεται από το δείκτη Goods coverage ο οποίος πλησιάζει τη μονάδα έως 0,999 (Πίνακας 34).



Εικόνα 9. Κατασκευή δέντρου απεικόνισης OTU για κάθε ομάδα δειγμάτων (A: δείγματα μελισσών που έχουν χαμηλό αριθμό σπορίων *V. ceranae*. B: δείγματα μελισσών που έχουν υψηλό αριθμό σπορίων *V. ceranae*. C: μελισσόψωμο που συλλέχθηκε από αποικίες με χαμηλό αριθμό σπορίων *V. ceranae* και D: μελισσόψωμο που συλλέχθηκε από αποικίες με υψηλό αριθμό σπορίων *V. ceranae*), που βασίζεται στην V3–V4 περιοχή του 16S rRNA, (α–δ), αντίστοιχα. Το μέγεθος των κύκλων αντιπροσωπεύει την αφθονία των ειδών. Διαφορετικά χρώματα αντιπροσωπεύουν διαφορετικά φύλα.

Παρόμοια περίπτωση παρατηρήθηκε για τις μοναδικές λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (OTUs) όσον αφορά τους μήκητες και τις τιμές των δεικτών της α-ποικιλότητας σε δείγματα της ομάδας C (μεγαλύτερη ποικιλομορφία αν και στατιστικά μη σημαντική- p -value > 0,05) (δείκτης Shannon = 3,072 [2,626–3,465], δείκτης Simpson = 0,825 [0,799–0,850], δείκτης $chao1$ = 208.277 [153.000–245.023]) σε σύγκριση με δείγματα της ομάδας D (δείκτης Shannon = 2,71 [2.298–3.109], δείκτης Simpson = 0.767 [0.709–0.843], δείκτης $chao1$ = 154.393 [125.038-172.111]) (Εικόνα 9β, Πίνακας 34). Η ανάγνωση των αλληλουχιών εντός των ομάδων C και D ήταν πολύ υψηλή, όπως αντικατοπτρίζεται από το δείκτη Goods coverage index ο οποίος πλησιάζει τη μονάδα (Πίνακας 34).

Συνολικά, ήταν προφανές ότι η ποικιλότητα των μυκήτων ήταν πολύ χαμηλότερη στα δείγματα ΜΨ σε σύγκριση με τα δείγματα μελισσών, όπως αντικατοπτρίζεται στα μοναδικά OTUs (διαφορά στατιστικά σημαντική p -value < 0,05).

ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ OTUs ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΟΣ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

Στις μέλισσες, τα πιο άφθονα γένη ήταν τα *Lactobacillus*, *Gilliamella*, *Snodgrassella*, *Bartonella* και *Bifidobacterium*. Η σχετική αφθονία της *Bartonella* εμφάνισε υψηλή διακύμανση μεταξύ των τριών δειγμάτων στην ομάδα A (1–22%). Τα γένη *Frischella*, *Commensalibacter* και *Escherichia-Shigella* εντοπίστηκαν επίσης σε όλα τα δείγματα αλλά σε σημαντικά μικρότερη σχετική αφθονία (περίπου 3–4% συνολικά). Δύο γένη, τα *Serratia* και *Thiothrix*, έδειξαν >1% σχετική αφθονία μόνο στο δείγμα A2 (1,2% και 1,5%, αντίστοιχα). Κανένα βακτηριακό γένος δεν μπόρεσε να αναγνωριστεί ως δείκτης για συγκεκριμένη ομάδα (υπάρχει στη μια ομάδα και απουσιάζει στην άλλη), ώστε κατά αυτό τον τρόπο να διαφοροποιηθούν τα δείγματα των μελισσών.

Ομοίως, κανένα μυκητιακό γένος δεν είναι ειδικό (υπάρχει σε μία ομάδα και απουσιάζει στην άλλη) μεταξύ των δειγμάτων μελισσών (δείγματα A1–3 και B1–3). Τα μυκητιακά γένη *Lachancea*, *Alternaria*, *Mycosphaerella*, *Stemphylium* και *Chaetomium* εμφάνισαν υψηλά επίπεδα διακύμανσης όσον αφορά τη σχετική αφθονία τους μεταξύ των τριών δειγμάτων της ομάδας A (μέλισσες με χαμηλό αριθμό σπορίων *V. ceranae*), που κυμαίνεται μεταξύ 4–95%, 0,13–19,8%, 0,3–17,48%, 0,03–17,45% και 0,01–10,59%, αντίστοιχα.

Όσον αφορά τα γένη *Lactobacillus*, *Acidothermus* και *Buchnera* διαπιστώθηκε υψηλή μεταβλητότητα όσον αφορά τη σχετική αφθονία τους μεταξύ των τριών δειγμάτων στην ομάδα C, που κυμαίνεται μεταξύ 0,69–24,5%, 0–28,45% και 0,01–32,38%, αντίστοιχα. Ομοίως, όσον αφορά την ομάδα D, η σχετική αφθονία του γένους *Arsenophonus* ήταν εξαιρετικά μεταβλητή, κυμαινόμενη από 1,75% έως 26,79%.

Είναι ενδιαφέρον ότι το γένος *Rosenbergiella* spp. εμφανίζει σημαντική σχετική αφθονία (φτάνοντας έως και 10%) στα δείγματα μελισσόψωμου που συλλέχθηκαν από τις αποικίες που εμφανίζουν μεγάλο αριθμό σπορίων *V. ceranae* (ομάδα D) σε σύγκριση με αυτά που προέκυψαν από λιγότερο μολυσμένες αποικίες (σχετική αφθονία 0–0,77% στην ομάδα C).

Η βιοπληροφορική ανάλυση των μυκητιακών αλληλουχιών ITS αποκάλυψε ότι τα *Podosphaera* spp. υπάρχουν μόνο στην ομάδα C και απουσιάζουν στην ομάδα D. Επιπλέον τα είδη *Blumeria* spp. εμφανίστηκαν πιο άφθονα στην ομάδα C (1,48–3,45%) σε σύγκριση με την ομάδα D (0–1,03%) (p -value < 0,05).

Τα γένη των μυκήτων *Mycosphaerella* και *Saccharomyces* εμφάνισαν υψηλή μεταβλητότητα όσον αφορά τη σχετική αφθονία μεταξύ των τριών δειγμάτων της ομάδας C, που κυμαίνεται μεταξύ 22,37–55,57% και 0,38–21,69%, αντίστοιχα. Η *Thecaphora* παρουσίασε υψηλή μεταβλητότητα μεταξύ των δειγμάτων στην ομάδα D, με σχετική αφθονία που κυμαίνεται μεταξύ 0–41,67%.

Συνολικά, η μεταβλητότητα της σχετικής αφθονίας των αλληλουχιών ITS ήταν σημαντικά υψηλότερη (t-test p-value < 0,003) από τη μεταβλητότητα της σχετικής αφθονίας των αλληλουχιών V3–V4 του 16S rRNA, όπως φαίνεται στον Πίνακα 35. Η αυξημένη μεταβλητότητα της σχετικής αφθονίας των αλληλουχιών ITS σε σχέση με αυτή των αλληλουχιών V3–V4 του 16S rRNA, ουσιαστικά μας δείχνει ότι στα δείγματά μας υπάρχει μεγαλύτερη ποικιλότητα μυκητιακών ταξινομικών κατηγοριών σε σύγκριση με τα βακτηριακά.

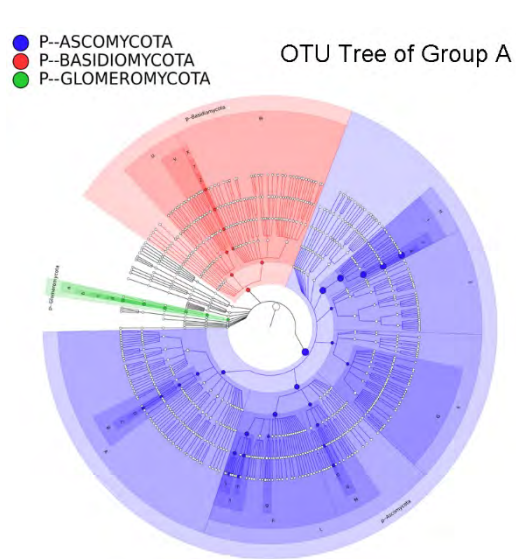
Πίνακας 35. Μέση μεταβλητότητα των ταξινομικών κατηγοριών στις τέσσερις ομάδες δειγμάτων (A–D) με βάση το 16S rRNA και την περιοχή ITS

Ομάδες	16S rRNA (βακτήρια)	ITS (μύκητες)
A	13,926	43,700
B	11,244	36,593
C	20,711	25,942
D	6,329	39,886

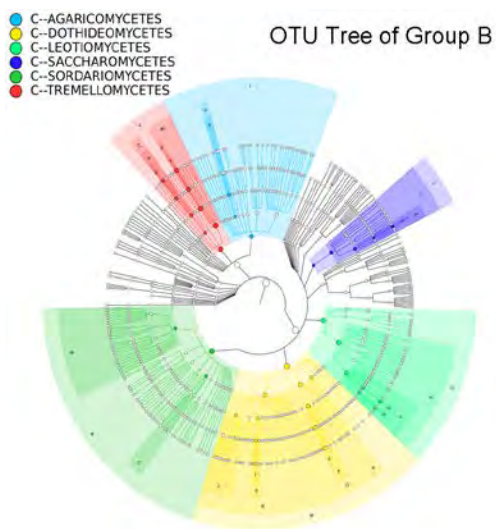
Τα δέντρα απεικόνισης των OTUs για τις ομάδες A και B για το 16S rRNA γονίδιο δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές (Εικόνα 9 α,β). Από την άλλη τα δέντρα απεικόνισης των OTUs για τις ομάδες C και D όσον αφορά την περιοχή 16S rRNA, έδειξε ότι τα Bacteroidota ήταν άφθονα στην ομάδα D αλλά όχι στην ομάδα C. Αντίθετα, τα Acidobacteriota και Crenarchaeota ήταν άφθονα στην ομάδα C αλλά όχι στην ομάδα D (Εικόνα 9 γ,δ).

Τα δέντρα απεικόνισης των OTUs για τις ομάδες A και B, που αφορούν την περιοχή ITS των μυκήτων, έδειξαν ότι τα φύλα Ascomycota και Basidiomycota ήταν άφθονα στην ομάδα A. Επίσης τα Glomeromycota εντοπίστηκαν στην ομάδα A. Στην ομάδα B, μόνο ορισμένες κλάσεις των Ascomycota (Dothideomycetes, Leotiomycetes, Saccharomycetes, Sordariomycetes) και από τα Basidiomycota τα Agaricomycetes και Tremellomycetes ήταν πιο άφθονα (Εικόνα 10 α,β).

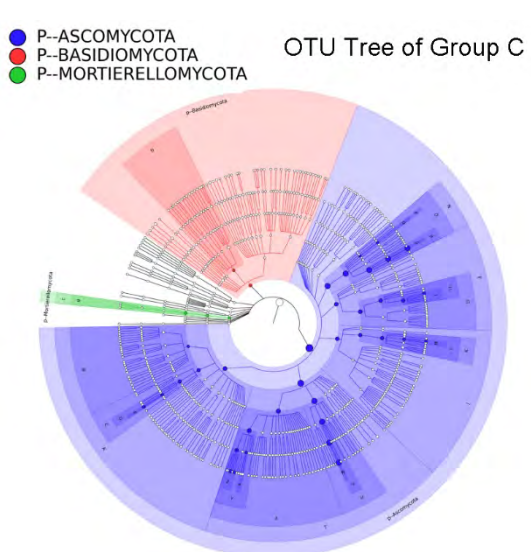
Τέλος τα δέντρα απεικόνισης των OTUs για τις ομάδες C και D, που δημιουργούνται για την ITS μυκητιακή περιοχή, δείχνουν ότι τα phyla Ascomycota και Basidiomycota ήταν άφθονα στην ομάδα C, όπως στην περίπτωση της ομάδας A. Τα Morterellomycota επίσης ταυτοποιήθηκαν στην ομάδα C. Στην ομάδα D, μόνο ορισμένες κλάσεις των Ascomycota (Dothideomycetes, Leotiomycetes, Saccharomycetes, Sordariomycetes, Pezizomycetes) και από τα Basidiomycota τα Ustilaginomycetes ήταν πιο άφθονα (Εικόνα 10 γ,δ).



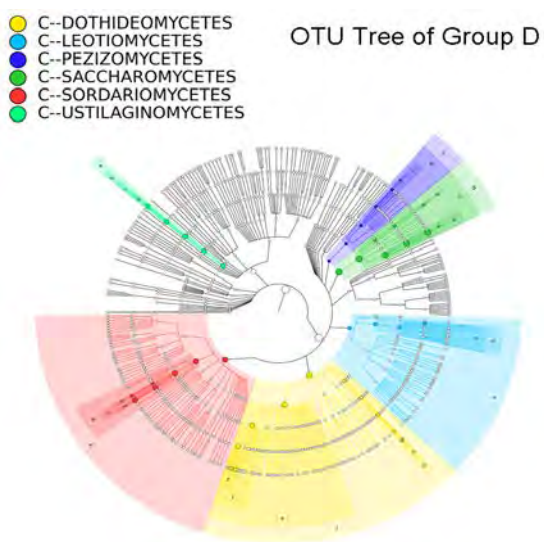
(α)



(β)



(γ)



(δ)

Εικόνα 10. Κατασκευή δέντρου απεικόνισης OTU για κάθε ομάδα δειγμάτων (Α–Δ), που δημιουργήθηκε με βάση την ITS περιοχή μυκήτων, (α–δ) αντίστοιχα. Το μέγεθος των κύκλων δείχνει την αφθονία των ειδών. Διαφορετικά χρώματα αντιπροσωπεύουν διαφορετικές ταξινομικές μονάδες.

Γ.2.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η Νοζέμωση είναι μια ευρέως διαδεδομένη ασθένεια στις ενήλικες μέλισσες, που προκαλείται από μικροσπορίδια της *Vairimorpha (Nosema) apis* (Zander) και *Vairimorpha (Nosema) ceranae* (Fries) [29]. Πρόσφατα οι Tokarev et al. [30] πρότειναν τον επαναπροσδιορισμό του γένους *Nosema* (τώρα ονομάζεται *Vairimorpha*) με βάση μοριακή φυλογενετική ανάλυση. Η *Vairimorpha apis* είναι ένα κοινό παράσιτο στην ευρωπαϊκή μέλισσα (*Apis mellifera*) ενώ η *Vairimorpha (Nosema) ceranae* μόλυνε αποικίες της *A. mellifera* σχετικά πρόσφατα και προήλθε από την ασιατική μέλισσα (*Apis cerana*). Εντοπίστηκε για την πρώτη φορά στην Ευρώπη το 2004 [31] και εξαπλώθηκε στη Νότια και Βόρεια Αμερική [32,33], Αφρική και Ασία [34]. Η νοζέμωση σχετίζεται με διάφορους προδιαθεσικούς ή συνεργιστικούς παράγοντες όπως η κλιματική κρίση αλλά και η έκθεση σε νεονικοτινοειδή φυτοφάρμακα [35 - 38]. Η μετάδοση των σπορίων και η εξάπλωση της μόλυνσης από *Nosema* μέσα στην αποικία λαμβάνει χώρα μεταξύ των ενήλικων μελισσών κατά τη διάρκεια της σίτισης (μέσω της τροφάλαξης) αλλά και τον καθαρισμό των κελλιών των κηρηθρών. Επιπλέον, το αποθηκευμένο μέλι στην κυψέλη, το νερό που μεταφέρεται από τις συλλέκτριες μέλισσες και ο μελισσοκομικός εξοπλισμός συμβάλλουν στη μετάδοση της ασθένειας από άτομο σε άτομο αλλά και μεταξύ των αποικιών.

Η σοβαρότητα της μόλυνσης από *Nosema* spp. σε μια αποικία για τους περισσότερους ερευνητές είναι συνάρτηση του αριθμού των σπορίων ανά μέλισσα που καταμετρούνται στο υπό εξέταση δείγμα [39]. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι υψηλοί αριθμοί σπορίων του *V. ceranae* βρίσκονται συχνά σε ασυμπτωματικές αποικίες. Άρα τα καταμετρημένα σπόρια δεν μπορούν να αποτελούν από μόνα τους κριτήριο υγείας ή προγνωστικό δείκτη επιβίωσης της αποικίας [40]. Η πρόγνωση της εξέλιξης της Νοζέμωσης, ειδικά αυτή που προκαλείται από τη *V. ceranae*, είναι κρίσιμης σημασίας τόσο για την υγεία των μελισσών όσο και για τη βιωσιμότητα της μελισσοκομίας. Τα κλινικά συμπτώματα της Νοζέμωσης που προκαλούνται από τη *V. ceranae* ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό και κυμαίνονται από την καθυστερημένη ανάπτυξη των αποικιών ή την αργή προοδευτική μείωση του πληθυσμού τους έως την ξαφνική κατάρρευση της αποικίας. Αυξημένος αριθμός σπορίων βρίσκεται σε αποικίες που έχουν καταρρεύσει. Ωστόσο, δεν είναι γνωστό εάν η σοβαρή μόλυνση από *V. ceranae* είναι η κύρια αιτία κατάρρευσης ή αποτελεί και αυτή έναν από τους παράγοντες καταπόνησης που οδηγούν συνεργιστικά στην κατάρρευση της αποικίας. Η προσβολή από *V. ceranae* προκαλεί καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου, κακή διατροφή, μειωμένη διάρκεια ζωής των ενήλικων μελισσών και ασθενέστερη απόκριση του ανοσοποιητικού [10]. Μια πιθανή αιτία αυτών των ευρημάτων θα μπορούσε να οφείλεται σε μια ανισορροπία (δυσβίωση) στο μικροβίωμα του εντέρου της ενήλικης μέλισσας ή και στο μικροβίωμα του ΜΨ ακόμη και στα αρχικά στάδια της Νοζέμωσης, όταν ο αριθμός των σπορίων είναι χαμηλός έως μεσαίος, όπως στη μελέτη μας.

Η ανάλυση της α-ποικιλότητας αποκάλυψε μια σαφή τάση μείωσης του αριθμού των παρατηρούμενων μικροβιακών ειδών (βάση των αντίστοιχων μοναδικών OTUs που αφορούν σε βακτηριακές και μυκητιακές αλληλουχίες) σε δείγματα μελισσών και ΜΨ που προέρχονται από αποικίες με υψηλό αριθμό σπόρων *V. ceranae* σε σύγκριση με εκείνες με χαμηλό αριθμό σπορίων (Εικόνα 8 και πίνακες 33, 34). Μια αξιοσημείωτη εξαίρεση ήταν το δείγμα A3, του οποίου η βακτηριακή ποικιλότητα ήταν η χαμηλότερη από όλα τα δείγματα μελισσών (Πίνακας 33).

Η μείωση της μικροβιακής ποικιλότητας παρόλη τη σαφή τάση που παρατηρήθηκε δεν ήταν στατιστικά σημαντική και απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων μελισσών και ΜΨ που πρέπει να αναλυθούν προκειμένου να επιβεβαιωθεί η υπόθεσή μας. Ο μηχανισμός που εξηγεί αυτή τη μείωση της μικροβιακής ποικιλότητας δεν έχει διευκρινιστεί. Ωστόσο, η μειωμένη μικροβιακή ποικιλότητα μπορεί να οδηγήσει σε δυσβίωση, η οποία με τη σειρά της μπορεί να διευκολύνει την εξέλιξη της μόλυνσης από *V. ceranae* σύμφωνα με τους Maes et al. [41]. Ως εκ τούτου, θα μπορούσε να επηρεάσει τη σοβαρότητα της ασθένειας και να χρησιμεύσει ως προγνωστικός δείκτης για την επιβίωση της αποικίας.

Η μείωση της μικροβιακής ποικιλότητας θα μπορούσε εν μέρει να αποδοθεί στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), η οποίες είναι γνωστό ότι επηρεάζουν το μικροβίωμα του εντέρου μελισσών μολυσμένων με *V. ceranae* [42]. Οι ROS μπορούν να βλάψουν τόσο τα κύτταρα του ξενιστή όσο και τα μικροβιακά κύτταρα. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν επίσης ότι στο μέσο έντερο μελισσών μολυσμένων από *V. ceranae* παράγονται και ενώσεις που προσφέρουν προστασία έναντι των ROS [42-44].

Είναι ενδιαφέρον ότι σπόρια της *V. ceranae* δεν ανιχνεύθηκαν σε κανένα δείγμα ΜΨ, ακόμη και σε αυτά που συλλέχθηκαν από αποικίες με υψηλούς αριθμούς σπορίων στις μέλισσες. Παρόλα αυτά η μικροβιακή ποικιλομορφία μειώθηκε στην ομάδα D των δειγμάτων του ΜΨ που προήλθε από μέλισσα με υψηλό αριθμό σπορίων. Επομένως, υποθέτουμε ότι η μόλυνση από *V. ceranae* μπορεί να επηρεάσει έμμεσα το μικροβίωμα του ΜΨ επιδρώντας στην υγεία των μελισσών. Μέσω αυτής της αρνητικής για την υγεία τους επίδραση μπορεί να προκαλείται μεταβολή της σύνθεσης του μικροβιώματος του πεπτικού συστήματος της μέλισσας και κατά συνέπεια επηρεάζεται και το μικροβίωμα που η ίδια τελικά εμβολιάζει στην τροφή της. Κατά τη συλλογή και αποθήκευση της γύρης, οι μέλισσες προσθέτουν σε αυτή μικρές ποσότητες αναρροφημένου νέκταρος από τον προστόμαχό τους καθώς και αδενικές εκκρίσεις ώστε στη συνέχεια μέσω της ζύμωσης η γύρη αυτή (ΓΜ) να μετασχηματίζεται σε ΜΨ στα κελιά που οι μέλισσες το έχουν αποθηκεύσει. Επομένως, είναι εύλογο ότι οι μέλισσες με υψηλούς αριθμούς σπορίων *V. ceranae* ενοφθαλμίζουν τη ΓΜ με τροποποιημένες μικροβιακές κοινότητες, μειωμένης ποικιλότητας σε σύγκριση με εκείνες τις μέλισσες με χαμηλό αριθμό σπορίων.

Κατά αυτόν τον τρόπο μπορεί να επηρεάζεται η διαδικασία της ζύμωσης της ΓΜ, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε μικροβιακές κοινότητες που χαρακτηρίζονται από χαμηλότερη ποικιλομορφία. Όσον αφορά τη σχετική αφθονία συγκεκριμένων γενών (βακτηριακών και μυκητιακών), δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή μεταξύ της ομάδας A και της ομάδας B. Προηγούμενη μελέτη ανέφερε μια ουδέτερη ή ακόμη και θετική επίδραση της μόλυνσης από *V. ceranae* στο βασικό βακτηρίωμα (core bacteriome) του εντέρου της μέλισσας [45]. Οι Zhang et al. ανασκόπησαν παρόμοιες μελέτες και συνέκριναν αυτά τα δεδομένα με τα δικά τους ευρήματα. Συνολικά, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η λοίμωξη από *V. ceranae* δεν επηρεάζει αρνητικά την ομοιοστάση της μέλισσας και το βασικό βακτηρίωμά της [48]. Παρόμοια ευρήματα προκύπτουν και από την παρούσα μελέτη όπου το βασικό βακτηρίωμα των μελισσών εμφανίζεται σταθερό, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε καλύτερη πρόγνωση και δυνητικά χαμηλότερη θνησιμότητα. Ωστόσο, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί περαιτέρω έρευνα προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι οι μέλισσες που παρουσιάζουν σοβαρή Νοζέμωση, από αποικίες που έχουν καταρρεύσει είτε πρόκειται να καταρρεύσουν, εμφανίζουν ή όχι δυσβίωση που σχετίζεται με την κατάρρευση του βασικού βακτηριώματος του εντέρου τους.

Όσον αφορά το μυκοβίωμα του εντέρου της μέλισσας, παρατηρήθηκε μεγάλη μεταβλητότητα μεταξύ των δειγμάτων, ακόμη και μέσα στην ίδια ομάδα, γεγονός που δεν επέτρεψε αξιόπιστες συγκρίσεις με προηγούμενες πρόσφατες μελέτες [15,16]. Είναι προφανές ότι μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων μελισσών που θα προέρχονται από μια μεγαλύτερη δεξαμενή αποικιών θα πρέπει να αναλυθεί για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Ωστόσο, αποδείχθηκε ότι το μυκοβίωμα εμφανίζει σημαντική ποικιλότητα και θα πρέπει να είναι το επίκεντρο μελλοντικών μελετών, οι οποίες επί του παρόντος επικεντρώνονται κυρίως στο βακτηρίωμα του εντέρου.

Στα δείγματα του ΜΨ, διαπιστώθηκαν ορισμένες σημαντικές διαφορές που αφορούν τη σχετική αφθονία συγκεκριμένων μυκητιακών και βακτηριακών γενών. Για παράδειγμα, η *Rosenbergiella* spp. ήταν σχετικά άφθονη (φτάνοντας έως και το 10% των αντίστοιχων OTUs) σε δείγματα ΜΨ που συλλέχθηκαν από τις μολυσμένες αποικίες (ομάδα D) σε σύγκριση με τις λιγότερο μολυσμένες (0-0,77% στην ομάδα C). Τα είδη *Rosenbergiella* spp. εντοπίζονται στο νέκταρ των φυτών που εξαρτώνται από την επικοινωνία. Επίσης παράγουν μεταβολίτες όπως D-γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ κ.α. που υπάρχουν στο νέκταρ. Ανάλογα με τη σύνθεσή του, το νέκταρ μπορεί να επηρεάσει τη διάρκεια ζωής των εντόμων [46]. Ομοίως, τα βακτήρια και οι μεταβολίτες που αυτά παράγουν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του ΜΨ υποθέτουμε ότι μπορούν να επηρεάσουν τη διάρκεια ζωής των μελισσών. Ωστόσο αυτή η υπόθεση πρέπει να επιβεβαιωθεί από περαιτέρω έρευνα.

Το γένος *Podosphaera* απουσίαζε σε δείγματα ΜΨ που συλλέχθηκαν από αποικίες της ομάδας D, ενώ το γένος *Blumeria* εμφάνισε σημαντικά μειωμένη σχετική αφθονία στην ίδια ομάδα. Είναι ενδιαφέρον ότι και τα δύο γένη περιλαμβάνουν είδη που είναι γνωστά παθογόνα των φυτών και προκαλούν μηκυτιάσεις των φύλλων. Η *Blumeria graminis* προσβάλλει τα δημητριακά και οι *Podosphaera astericola* και *Podosphaera pannosa* επηρεάζουν κυρίως τα *Prunus* spp. [47].

Είναι γνωστό ότι η γύρη που συλλέγεται από τις μέλισσες υφίσταται ζύμωση που οδηγεί σε περαιτέρω μείωση του pH και στην παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων, αποτρέποντας έτσι την ανάπτυξη παθογόνων. Η χαμηλότερη σχετική αφθονία ή η απουσία αυτών των μυκήτων σε δείγματα ΜΨ που συλλέχθηκαν από αποικίες που ανήκουν στην Ομάδα D θα μπορούσε να αποδοθεί στην έμμεση επίδραση της *V. ceranae* στη ζύμωση του ΜΨ. Η νοσέμωση πιθανώς μπορεί να αλλάξει τις μικροβιακές κοινότητες που εμβολιάζει μια εργάτρια μέλισσα στο ΜΨ. Στην περίπτωση αυτή, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του ΜΨ, θα αναμενόταν ότι και το βακτηρίωμα που ανιχνεύεται μπορεί να είναι διαφορετικό στην ομάδα C σε σύγκριση με εκείνο της ομάδας D. Επιπλέον, οι εμφανείς διαφορές μεταξύ των ομάδων (Α και Β, C και D) σε επίπεδο φύλου και τάξης θα μπορούσε να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες για την πρόγνωση της λοίμωξης από *V. ceranae*, αν και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.



Φωτογραφία 17. Μελίσσι που κατέρρευσε μετά από νόσηση που προκάλεσε η *V. ceranae* Credit: Randy Oliver Πηγή: <https://scientificbeekeeping.com/>

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ Γ.2

1. Papa, G.; Maier, R.; Durazzo, A.; Lucarini, M.; Karabagias, I.K.; Plutino, M.; Bianchetto, E.; Aromolo, R.; Pignatti, G.; Ambrogio, A.; et al. The Honey Bee *Apis mellifera*: An Insect at the Interface between Human and Ecosystem Health. *Biology* 2022, 11, 233.
2. Neumann P., Carreck N.L. Honey bee colony losses. *J. Apic. Res.* 2010;49:1–6. doi: 10.3896/IBRA.1.49.1.01.
3. van Engelsdorp, D.; Meixner, M.D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.* 2010, 103, S80–S95.
4. Morfin, Nuria & Goodwin, Paul & Guzman, Ernesto. (2023). *Varroa destructor* and its impacts on honey bee biology. *Frontiers in Bee Science*. 1. 10.3389/frbee.2023.1272937.
5. Hristov P, Shumkova R, Palova N, Neov B. Factors Associated with Honey Bee Colony Losses: A Mini-Review. *Vet Sci.* 2020 Oct 30;7(4):166. doi: 10.3390/vetsci7040166. PMID: 33143134; PMCID: PMC7712510.
6. Goulson, D.; Nicholls, E.; Botías, C.; Rotheray, E.L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 2015, 347, 1255957
7. Higes, M.; Martín-Hernández, R.; Meana, A. *Nosema ceranae* in Europe: An emergent type C nosemosis. *Apidologie* 2010, 41, 375–392
8. Dussaubat, C.; Brunet, J.-L.; Higes, M.; Colbourne, J.K.; Lopez, J.; Choi, J.-H.; Martín-Hernández, R.; Botías, C.; Cousin, M.; McDonnell, C.; et al. Gut Pathology and Responses to the Microsporidium *Nosema ceranae* in the Honey Bee *Apis mellifera*. *PLoS ONE* 2012, 7, e37017.
9. Paris, L.; El Alaoui, H.; Delbac, F.; Diogon, M. Effects of the gut parasite *Nosema ceranae* on honey bee physiology and behavior. *Curr. Opin. Insect Sci.* 2018, 26, 149–154.
10. Martín-Hernández, R.; Bartolomé, C.; Chejanovsky, N.; Le Conte, Y.; Dalmon, A.; Dussaubat, C.; García-Palencia, P.; Meana, A.; Pinto, M.A.; Srooker, V.; et al. *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: A 12 years postdetection perspective. *Environ. Microbiol.* 2018, 20, 1302–1329.
11. Raymann, K.; Moran, N.A. The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Curr. Opin. Insect Sci.* 2018, 26, 97–104.
12. Kwong, W.K.; Medina, L.A.; Koch, H.; Sing, K.-W.; Soh, E.J.Y.; Ascher, J.S.; Jaffé, R.; Moran, N.A. Dynamic microbiome evolution in social bees. *Sci. Adv.* 2017, 3, e1600513.
13. Dong, Z.-X.; Li, H.-Y.; Chen, Y.-F.; Wang, F.; Deng, X.-Y.; Lin, L.-B.; Zhang, Q.-L.; Li, J.-L.; Guo, J. Colonization of the gut microbiota of honey bee (*Apis mellifera*) workers at different developmental stages. *Microbiol. Res.* 2020, 231, 126370.
14. Yun, J.-H.; Jung, M.-J.; Kim, P.S.; Bae, J.-W. Social status shapes the bacterial and fungal gut communities of the honey bee. *Sci. Rep.* 2018, 8, 2019.
15. Kakumanu, M.L.; Reeves, A.M.; Anderson, T.D.; Rodrigues, R.R.; Williams, M.A. Honey Bee Gut Microbiome Is Altered by In-Hive Pesticide Exposures. *Front. Microbiol.* 2016, 7, 1255.
16. Paris, L.; Peghaire, E.; Moné, A.; Diogon, M.; Debroas, D.; Delbac, F.; El Alaoui, H. Honeybee gut microbiota dysbiosis in pesticide/parasite co-exposures is mainly induced by *Nosema ceranae*. *J. Invertebr. Pathol.* 2020, 172, 107348.
17. Mazur, E.D.; Gajda, A.M. Nosemosis in Honeybees: A Review Guide on Biology and Diagnostic Methods. *Appl. Sci.* 2022, 12, 5890.
18. Charistos, L.; Parashos, N.; Hatjina, F. Long term effects of a food supplement HiveAlive™ on honey bee colony strength and *Nosema ceranae* spore counts. *J. Apic. Res.* 2015, 54, 420–426
19. Cantwell, G.E. Standard methods for counting *Nosema* spores. *Am. Bee J.* 1970, 110, 222–223

20. Fries, I.; Chauzat, M.P.; Chen, Y.P.; Doublet, V.; Genersch, E.; Gisder, S.; Higes, M.; McMahon, D.P.; Martín-Hernández, R.; Natsopoulou, M.; et al. Standard methods for *Nosema* research. *J. Apic. Res.* 2015, 52, 1–28.
21. Martín-Hernández, R.; Meana, A.; Prieto, L.; Salvador, A.M.; Garrido-Bailón, E.; Higes, M. Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73, 6331–6338.
22. Casas, I.; Powell, L.; Klapper, P.E.; Cleator, G.M. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Methods* 1995, 53, 25–36.
23. Magoc, T.; Salzberg, S.L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 2011, 27, 2957–2963.
24. Caporaso, J.G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F.D.; Costello, E.K.; Fierer, N.; Peña, A.G.; Goodrich, J.K.; Gordon, J.I.; et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 2010, 7, 335–336.
25. Edgar, R.C.; Haas, B.J.; Clemente, J.C.; Quince, C.; Knight, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 2011, 27, 2194–2200.
26. Edgar, R.C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods* 2013, 10, 996–998.
27. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2012, 41, D590–D596.
28. Kõljalg, U.; Nilsson, R.H.; Abarenkov, K.; Tedersoo, L.; Taylor, A.F.S.; Bahram, M.; Bates, S.T.; Bruns, T.D.; Bengtsson-Palme, J.; Callaghan, T.M.; et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Mol. Ecol.* 2013, 22, 5271–5277.
29. Fries, I.; Feng, F.; Da Silva, A.; Slemenda, S.B.; Pieniazek, N.J. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *Eur. J. Protistol.* 1996, 32, 356–365.
30. Tokarev, Y.S.; Huang, W.-F.; Solter, L.F.; Malysh, J.M.; Becnel, J.J.; Vossbrinck, C.R. A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics. *J. Invertebr. Pathol.* 2020, 169, 107279.
31. Higes, M.; Martín, R.; Meana, A. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J. Invertebr. Pathol.* 2006, 92, 93–95.
32. Calderón, R.A.; Sanchez, L.A.; Yañez, O.; Fallas, N. Presence of *Nosema ceranae* in Africanized honey bee colonies in Costa Rica. *J. Apic. Res.* 2008, 47, 328–329.
33. Chen, Y.; Evans, J.D.; Smith, I.B.; Pettis, J.S. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J. Invertebr. Pathol.* 2008, 97, 186–188.
34. Chen, Y.; Evans, J.D.; Zhou, L.; Boncristiani, H.; Kimura, K.; Xiao, T.; Litkowski, A.M.; Pettis, J.S. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 2009, 101, 204–209.
35. Alaux, C.; Brunet, J.-L.; Dussaubat, C.; Mondet, F.; Tchamitchan, S.; Cousin, M.; Brillard, J.; Baldy, A.; Belzunces, L.P.; Le Conte, Y. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 2010, 12, 774–782.
36. Doublet, V.; Natsopoulou, M.E.; Zschiesche, L.; Paxton, R.J. Within-host competition among the honey bees pathogens *Nosema ceranae* and Deformed wing virus is asymmetric and to the disadvantage of the virus. *J. Invertebr. Pathol.* 2015, 124, 31–34.

37. Vidau, C.; Diogon, M.; Aufauvre, J.; Fontbonne, R.; Viguès, B.; Brunet, J.-L.; Texier, C.; Biron, D.G.; Blot, N.; El Alaoui, H.; et al. Exposure to Sublethal Doses of Fipronil and Thiacloprid Highly Increases Mortality of Honeybees Previously Infected by *Nosema ceranae*. *PLoS ONE* 2011, 6, e21550.
38. Zheng, H.-Q.; Gong, H.-R.; Huang, S.-K.; Sohr, A.; Hu, F.-L.; Chen, Y.P. Evidence of the synergistic interaction of honey bee pathogens *Nosema ceranae* and Deformed wing virus. *Vet. Microbiol.* 2015, 177, 1–6.
39. World Organisation for Animal Health. Nosemosis of honey bees. In *Terrestrial Manual*; WOA: Paris, France, 2018; pp. 744–749. ISBN 978-92-95108-18-9.
40. Meana, A.; Martín-Hernández, R.; Higes, M. The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. *J. Apic. Res.* 2010, 49, 212–214.
41. Maes, P.W.; Rodrigues, P.A.P.; Oliver, R.; Mott, B.M.; Anderson, K.E. Diet-related gut bacterial dysbiosis correlates with impaired development, increased mortality and *Nosema* disease in the honeybee (*Apis mellifera*). *Mol. Ecol.* 2016, 25, 5439–5450.
42. Herb, M.; Schramm, M. Functions of ROS in Macrophages and Antimicrobial Immunity. *Antioxidants* 2021, 10, 313.
43. Armitage, S.A.; Genersch, E.; McMahon, D.P.; Rafaluk-Mohr, C.; Rolff, J. Tripartite interactions: How immunity, microbiota and pathogens interact and affect pathogen virulence evolution. *Curr. Opin. Insect Sci.* 2022, 50, 100871.
44. Zug, R.; Hammerstein, P. Wolbachia and the insect immune system: What reactive oxygen species can tell us about the mechanisms of Wolbachia–host interactions. *Front. Microbiol.* 2015, 6, 1201. [Google Scholar] [CrossRef][Green Version]
45. Zhang, Y.; Su, M.; Wang, L.; Huang, S.; Su, S.; Huang, W.-F. *Vairimorpha* (*Nosema*) *ceranae* Infection Alters Honey Bee Microbiota Composition and Sustains the Survival of Adult Honey Bees. *Biology* 2021, 10, 905.
46. Lenaerts, M.; Goelen, T.; Paulussen, C.; Herrera-Malaver, B.; Steensels, J.; Van den Ende, W.; Verstrepen, K.J.; Wäckers, F.; Jacquemyn, H.; Lievens, B. Nectar bacteria affect life history of a generalist aphid parasitoid by altering nectar chemistry. *Funct. Ecol.* 2017, 31, 2061–2069.
47. Linde, M.; Shishkoff, N. Powdery Mildew. In *Encyclopedia of Rose Science*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2003; pp. 158–165.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στο πλαίσιο αυτής της διατριβής διερευνήθηκε για πρώτη φορά η **βιοδραστικότητα του ελληνικού ΜΨ και η πιθανή συσχέτισή της με τη βοτανική του προέλευση**. Με βάση τα αποτελέσματα των ερευνών όπως παρουσιάστηκαν στο κεφάλαιο Β, τα συμπεράσματα συνοψίζονται ως εξής:

1. Το ελληνικό ΜΨ συνολικά εμφανίζει σημαντική αντιοξειδωτική δράση που συσχετίζεται ισχυρά με τη βοτανολογική προέλευση των δειγμάτων. Ορισμένα δείγματα μελισσόψωμου εμφάνισαν ιδιαίτερα υψηλή δράση στην εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών, τέτοια που το κατατάσσουν μεταξύ των πιο ισχυρών αντιοξειδωτικών τροφίμων.
2. Το ελληνικό ΜΨ έχει την ικανότητα τόσο να αναστέλλει την ανάπτυξη όσο και να σκοτώνει σημαντικά παθογόνα βακτήρια ορισμένα από τα οποία εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Επίσης, έχει την ικανότητα να αναστέλλει τη δημιουργία βιοϋμένων παθογόνων βακτηρίων αλλά και να συμβάλλει στην εκρίζωσή τους, δυνατότητα που για πρώτη φορά διερευνήθηκε πειραματικά.
3. Παρατηρήθηκε ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των τιμών MIC και MBC έναντι του *S. aureus* και της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε γύρη Brassicaceae και αντίστοιχα μεταξύ των τιμών MIC και MBC έναντι της *P. aeruginosa* και της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε γύρη Ericaceae. Η υψηλή περιεκτικότητα σε γύρη Fabaceae συσχετίζεται με τις τιμές MIC έναντι της *P. aeruginosa*. Στην βοτανική προέλευση θα μπορούσε να αποδοθεί η διαφορετική αντιβακτηριακή δράση ανάλογα με το παθογόνο. Περαιτέρω έρευνα θα μπορούσε να αποκαλύψει τους πιθανούς αντιμικροβιακούς παράγοντες στη γύρη αυτών των οικογενειών.
4. Για πρώτη φορά διερευνήθηκε και αποδείχθηκε η αντι-ικκή δράση του ΜΨ και της ΓΜ. Η *in vitro* αντι-ικκή δράση του ελληνικού ΜΨ είναι σημαντική έναντι και των δύο ιών που εξετάσαμε, του εντεροϊού D68 και του ιού της γρίπης Α H1N1. Επιπλέον δείχθηκε ότι η αντι-ικκή δράση δεν οφείλεται μόνο στις πολυφαινόλες της γύρης, που είναι γνωστές αντι-ικκές ενώσεις, αλλά κυρίως σε άγνωστες πρωτεϊνικής φύσης ενώσεις. Ωστόσο παρατηρήθηκε αρνητική ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των τιμών IC₅₀ έναντι του εντεροϊού D68 και της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε γύρη Brassicaceae και ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε γύρη Rosaceae και των τιμών SI. Μελλοντικές μελέτες θα δείξουν αν υπάρχουν αντι-ικοί παράγοντες στη γύρη αυτών των οικογενειών και θα αποκαλύψουν τη φύση τους. Ακόμη για πρώτη φορά δείχθηκε ότι η τεχνητή ζύμωση της ΓΜ μεταβάλλει την *in vitro* αντι-ικκή δράση της έναντι του ιού της γρίπης Α H1N1.
5. Επιπλέον για πρώτη φορά διερευνήθηκε η επίδραση της διατροφής με τεχνητά ζυμωμένη γύρη, από μικροοργανισμούς που ανήκουν στο μικροβίωμα του ΜΨ, στη διάρκεια ζωής των εργατριών μελισσών στο εργαστήριο, με θετικά αποτελέσματα. Η έρευνα πρέπει να συνεχιστεί στην κατεύθυνση αυτή περιλαμβάνοντας εκτός από τη διάρκεια ζωής των μελισσών και άλλους βιολογικούς δείκτες, με απώτερο στόχο τη δημιουργία ενός πρεβιοτικού/προβιοτικού συμπληρώματος διατροφής που θα ενίσχυε την υγεία και την μακροβιότητα των μελισσών.

6. Συνολικά αποδεικνύεται ότι το ελληνικό μελισσόψωμο είναι ένα σπουδαίο λειτουργικό τρόφιμο. Οι μελέτες μας πάνω στη βιοδραστηριότητά του έγιναν με τη χρήση απλού εναιωρήματος των δειγμάτων σε νερό, ώστε να αξιολογήσουμε τι πραγματικά είναι διαθέσιμο στον καταναλωτή ή στη μέλισσα, λαμβάνοντας υπόψη τη χαμηλή πεπτικότητα των γυρεοκόκκων.
7. Επιπλέον οι αντιβακτηριακές και αντι-ιικές του ιδιότητες το καθιστούν πιθανή πηγή νέων αντιβιοτικών ή αντι-ικών ουσιών. Η έρευνα προς αυτή την κατεύθυνση καθίσταται επιτακτική αν λάβουμε υπόψη την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά που σταδιακά εμφανίζουν διάφορα παθογόνα βακτήρια αλλά και την επιδημική ή πανδημική εξάπλωση παθογόνων ιών για τους οποίους δε διαθέτουμε θεραπευτικά μέσα.

Το μικροβίωμα του μελισσόψωμου διερευνήθηκε στα διάφορα στάδια ωρίμασής του. Η ταυτοποίηση έγινε με τη χρήση μεταταξινομικών μεθόδων (NGS) και περιγράφηκε η δυναμική εξέλιξη των μικροβιακών κοινοτήτων που το απαρτίζουν (βακτήρια και μύκητες) στο χρονικό διάστημα από την είσοδο της γύρης στην κυψέλη μέχρι την ωρίμανση του ΜΨ.

Διερευνήθηκε επίσης η αντιβακτηριακή και βιοσυνθετική δράση βακτηρίων που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από δείγματα ΜΨ. Με βάση τα αποτελέσματα των ερευνών όπως παρουσιάστηκαν στο κεφάλαιο Γ, τα συμπεράσματα συνοψίζονται ως εξής:

1. Το μικροβίωμα του ΜΨ περιλαμβάνει τόσο περιβαλλοντικά όσο και μικρόβια μελισσών. Στην αρχή της ωρίμανσης του ΜΨ η μικροβιακή ποικιλότητα είναι μεγαλύτερη. Η βακτηριακή ποικιλότητα αυξάνεται συνεχώς από την ημέρα 1 έως την ημέρα 27, ενώ στη συνέχεια μειώνεται σταδιακά (ημέρα 27 έως ημέρα 41). Η ποικιλότητα των μυκήτων, μειώνεται σταδιακά από την ημέρα 1 έως την ημέρα 27. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι κατά την ωρίμανση του ΜΨ, η ποικιλότητα του μικροβιώματος μεταβάλλεται δυναμικά καταλήγοντας σε μια ως επι το πλείστον σταθερή δομή μικροβιακών κοινοτήτων στο ώριμο ΜΨ.
2. Ορισμένα βακτήρια του ΜΨ ασκούν ισχυρή αντιβακτηριακή δράση έναντι *Gram+* και *Gram-* παθογόνων βακτηρίων, και είναι πιθανό να συμβάλλουν στην αντιμικροβιακή του δράση και τη δυνατότητα του να συντηρείται επί μακρόν στο περιβάλλον της κυψέλης.
3. Ορισμένα βακτήρια του ΜΨ εμφανίζουν σημαντική βιοσυνθετική δράση και είναι ικανά να παράγουν κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, αμυλάσες, πρωτεάσες και οξειδάσες που διασπούν χρωστικές, μεταξύ αυτών και λακκάσες. Τα ένζυμα αυτά είναι ιδιαίτερος χρήσιμα για τη διάσπαση των γυρεοκόκκων και η ύπαρξή τους αποτελεί σαφή ένδειξη ότι στο ΜΨ λαμβάνει χώρα πρόπεψη της γύρης.
4. Η έρευνά μας έδειξε ότι η τεχνητή ζύμωση της γύρης με μικροοργανισμούς του μικροβιώματος του ΜΨ μπορεί να αυξάνει και την αντι-ιική του δράση και την αντιβακτηριακή του δράση, αναδεικνύοντας έτσι τη συμβολή του μικροβιώματος στη βιοδραστηριότητα του ΜΨ.
5. Διερευνήσαμε το κατά πόσον υπάρχουν μεταβολές στη δομή και την αφθονία των κοινοτήτων του μικροβιώματος του ΜΨ αλλά και του εντέρου των μελισσών σε μέλισσα που εμφάνιζαν υψηλή προσβολή από *Vairimorpha (Nozema) ceranae* σε σύγκριση με μέλισσα με πολύ χαμηλή προσβολή και την πιθανότητα να χρησιμοποιηθούν αυτές οι αλλαγές στο μικροβίωμα ως διαγνωστικοί ή προγνωστικοί δείκτες.

Διαπιστώθηκε μια εμφανής τάση μείωση της μικροβιακής ποικιλότητας στα μελίσσια με υψηλή προσβολή τόσο στο μικροβίωμα του εντέρου των μελισσών όσο και στο μικροβίωμα του ΜΨ. Η ανάλυση περισσότερων δειγμάτων είναι απαραίτητη για τη στατιστική επιβεβαίωση της παρατήρησης. Επίσης διαπιστώθηκε η ύπαρξη διαφορών όσον αφορά την παρουσία συγκεκριμένων μικροβιακών γενών μεταξύ των ομάδων C και D αλλά και διαφορές μεταξύ ομάδων A και B και των ομάδων C και D σε επίπεδο φύλλου ή κλάσης. Μελλοντικές μελέτες αξιοποιώντας και τα δικά μας ευρήματα πιθανό να μπορέσουν να καθορίσουν την πρόγνωση της ασθένειας και την επιβίωση ή όχι της αποικίας.

Συμπερασματικά το μικροβίωμα του ΜΨ συνιστά μια πιθανή πηγή νέων αντιβακτηριακών ουσιών και ενζύμων που μπορούν να βρουν σημαντικές βιοτεχνολογικές εφαρμογές σε ένα ευρύ φάσμα αντικειμένων, από τη βιομηχανία τροφίμων μέχρι τη βιοεξυγίανση. Ήδη διερευνήσαμε τη δυνατότητα τεχνητής ζύμωσης της ΓΜ με αυτόχθονα στελέχη του ΜΨ, που παρουσιάζει σημαντικό ενδιαφέρον μιας και το ΜΨ είναι πολύ πιο δύσκολο να συλλεχθεί απ' ό,τι η ΓΜ. Η παραγωγή προϊόντων με χαρακτηριστικά παρόμοια με το φυσικό ΜΨ και για τη μέλισσα και για τον άνθρωπο θα είχε σημαντικό ενδιαφέρον και επιστημονικό και εμπορικό. Επιπλέον, περαιτέρω έρευνα μπορεί να οδηγήσει σε προϊόντα με διαφορετικά χαρακτηριστικά ανάλογα με τη βοτανική προέλευση της γύρης και τα στελέχη βακτηρίων ή και ζυμών που θα χρησιμοποιηθούν ως καλλιέργειες (εκκίνησης ή προσθετικές) για ζύμωση είτε της γύρης είτε άλλων τροφίμων. Ο συνδυασμός με μέλι ή και άλλες πρώτες ύλες μπορεί να δημιουργήσει καινοτόμα λειτουργικά τρόφιμα ή ποτά ωφέλιμα για τον άνθρωπο, για τη μέλισσα ή και για άλλα ζώα, τα οποία μπορούν να ενισχύουν τον οργανισμό και να προάγουν την υγεία.



Φωτογραφία 18. Μελισσόψωμο ακριβώς πλάι στο γόνο για άμεση κατανάλωση από τις παραμάνες μελισσες. Credit: Randy Oliver Πηγή: <https://scientificbeekeeping.com/>

ABSTRACT

Bee collected pollen (BCP) is a well-known functional food, used by consumers as a nutritional supplement and also by apitherapists for its beneficial biological properties.

Bee bread (BB) is produced via solid state fermentation of BCP, which takes place in the cells of the honeycomb where BCP is stored. It is the main source of proteins, fats, vitamins and minerals for the bees and, like BCP, it also contains a plethora of phytochemicals (polyphenols, organic acids, fatty acids, phytosterols etc). BB is also considered a functional food with therapeutical applications in folk medicine and apitherapy.

Research on BB has been rather limited until now but research interest is growing regarding the antimicrobial properties of both BCP and BB, due to emerging microbial resistance to antibiotics. Both BCP and BB exert antimicrobial properties against various pathogens, such as bacteria and fungi. Like other bee products, the lack of antimicrobial resistance in BCP and BB can be attributed to the synergism of more than one antimicrobial compounds within these products. BCP and BB exert targeted action against pathogens and affect the host microbiome in a prebiotic manner.

The antimicrobial, antioxidant and nutritional properties of BCP and BB, are directly related to their composition, which is highly dependent on their botanical origin. Greek flora is renowned for its high biodiversity, representing 6,760 taxa, 1,442 of which endemic. The foremost aim of the research presented in this thesis, was to assess for the first time the bioactivity of Greek BB samples collected from different parts of Greece and further venture to correlate them to botanical origin.

In this study, 18 BB samples were collected during different seasons from different locations in Greece, as well as 2 BCP samples and their botanical origin was determined before bioactivity was tested. Of note, BB and BCP samples were used as mere water suspensions in order to assess the properties they exhibit when consumed as food (true bioavailability/true bioactivity).

Samples were analyzed for their antibacterial properties, antioxidant activity, total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC). The antimicrobial activity of each sample was tested against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *S. enterica ser. Typhimurium*. The results showed that all samples exert inhibitory and most of them bactericidal activity against at least two pathogens.

In addition, all samples demonstrated significant antioxidant activity with the *Castanea sativa* monofloral sample exhibiting the highest antioxidant values. Interestingly, no strong correlation was observed between antioxidant and antimicrobial activity, but statistical analysis revealed correlations between specific plant families and antimicrobial - antioxidant activity.

BB samples were further assessed for their ability to eradicate or inhibit the formation of biofilms, which are estimated to be involved in 80% of human body infections. BB samples tested against *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii* showed significant ability to both inhibit the formation and eradicate biofilms. The inhibition of biofilm formation depends on BB concentration and tested pathogen. Overall higher inhibition rates are observed against *A. baumannii*. For the eradication of *A. baumannii* biofilm, higher BB concentrations are required compared to those required for the eradication of *S. aureus* biofilm.

Antiviral activity of BB samples was tested *in vitro* against Enterovirus D68. A cell culture assay coupled with comparative real-time PCR analysis was performed using different sample concentrations to assess antiviral activity. The MTT method was applied to calculate sample toxicity levels in cell culture. The results demonstrate that greek BB and BCP exhibit strong antiviral activity against EV-D68, with IC₅₀ values ranging from 0.048 to 5.45 mg/ml. This was the first research worldwide to investigate the antiviral activity of BCP and BB and, following these encouraging results, we proceeded to assess the antiviral activity of BCP, BB and artificially fermented pollen against influenza A virus (IAV) H1N1.

In this second experiment, the protein, aqueous and n-butanol fractions of the samples were also tested to shed light into the nature of the antiviral agents. In addition, the antiviral activity of artificially fermented bee pollen with microorganisms isolated from BB, was evaluated. Antiviral activity against IAV (H1N1) was evaluated *in vitro* by cell culture assay and comparative real-time PCR analysis. IC₅₀ values ranged from 0.022 to 10.04 mg/ml and selectivity index (SI) values ranged from 1.06 to 338.64. Artificially fermented bee pollen samples AF5 and AF17 exhibited higher SI values than unfermented pollen, and protein fractions showed the highest SI values. In addition, chemical profiling of BCP and BB samples, analyzed using NMR and LC-MS, revealed the presence of specific metabolites (flavonoids) that may contribute to antiviral activity. The results indicate that the significant anti-IAV activity of the tested products could be attributed to chemical composition (particularly to yet unidentified protein compounds) and possibly to substances produced by the microbiome. Further research into the antiviral properties of Greek BCP and BB will further elucidate the mode of action and could lead to new treatments against IAV or other viral diseases.

The antimicrobial activity of strains isolated from BB microbiome, inoculated into double pasteurized pollen, as raw material for artificial solid state fermentation, was also evaluated. The technique of double pasteurization, with an intermediate incubation step, was chosen in order to eliminate the sporogenic bacteria, and this is the first research to use this technique in BCP fermentation.

The aim of the experiment was to produce a food with better antimicrobial activity than the original BCP and at the same time to reveal possible contribution of BB microbiome to antimicrobial activity. Artificially fermented pollen regained its antibacterial activity against pathogens which was lost after double pasteurization, indicating that BB microbiome contributes to antimicrobial activity. The type of starter culture and incubation conditions both influence the antibacterial activity of artificially fermented pollen.

Finally, in terms of bioactivity, artificially fermented BCP with BB microorganisms was evaluated for the first time, compared to the BCP that served as the raw material for fermentation, on the longevity of bees reared in cages in the laboratory, with promising results.

Apart from bioactivity, an equally important research objective of this thesis was the investigation of BB microbiome, during maturation (BCP from pollen trap, and 1- day, 11 -day, 27- day and 41- day-old BB) and to identify the most relatively abundant microbial groups using both Next Generation Sequencing (NGS) and microbial culture techniques. There are few studies on BB microbiome despite the abundant evidence regarding its biosynthetic and antimicrobial activity.

Our data demonstrate that BCP and BB microbiomes include both environmental and bee microbial communities. At the beginning of BB maturation microbial diversity is greater. Bacterial diversity increases steadily from day 1 to day 27, then gradually decreases (day 27 to day 41). The diversity of fungi gradually decreases from day 1 to day 27. These findings indicate that during BB maturation, microbial diversity fluctuates dynamically resulting in a rather stable microbial community structure in mature BB. During maturation, changes that affect microbial growth (production of microbial metabolites, microaerophilic or anoxic conditions, acidity, variable nutrient substrates and water availability), may occur, favouring specific communities over others.

Proteobacteria are the dominant phylum in BB representing over 60% of the total unique operational taxonomic units (OTUs). Their abundance increased rapidly within 24 h, reaching nearly 70%, and gradually decreased from day 11 to day 41, returning to approximately the initial relative abundance. The relative abundance of Firmicutes, which was the second most abundant phylum, increased by up to 20% in mature BB. The genus *Lactobacillus* increased rapidly within the first 24 hours, indicating the contribution of lactobacilli to the fermentation process especially in the early stages. It is worth noting that lactobacilli are also found in the mature 41-day-old BB, testifying to their adaptation to this environment. The activity of lactobacilli is important for BB preservation due to their antimicrobial activity.

Regarding fungi, Ascomycota was the most abundant phylum, accounting for almost 100% of the relevant OTUs in 27-day-old MPS. *Zygosaccharomyces* was the most abundant genus accounting for 99.58% of the relevant OTUs in 27-day-old MPS. Basidiomycota is the second most abundant fungal group, which gradually decreased from 20% of the relevant OTUs in 1-day pollen to 0% in 27-day BB.

Bacterial strains isolated from BB were tested for their antibacterial activity against the pathogens *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium* and *K. pneumoniae*. Of 309 bacterial isolates, 42 showed antibacterial activity against MRSA strain 1552 of *S. aureus*, 34 against carbapenem-resistant *P. aeruginosa* strain 1773, 47 against *S. Typhimurium* and 43 against *K. pneumoniae*. Four isolates exerted antibacterial activity against two of the pathogens, 38 against three pathogens and 23 against all four pathogens. Regarding yeasts, strains of *Z. siamensis* showed antibacterial activity against *S. Typhimurium*. Strains that exerted antibacterial activity against at least two pathogens and simultaneously produced various enzymes were selected for identification. Seven strains that exerted antibacterial activity against one pathogen and three strains that exerted no antibacterial activity but were able to produce various enzymes were identified.

Apilactobacillus and *Fructobacillus* strains exerted high antibacterial activity against *Gram*-negative pathogens but lower antibacterial activity against *Gram*-positive *S. aureus*. *Bacillus* isolates showed antibacterial activity mainly against *S. aureus*, although some exerted antibacterial activity against *Gram*-negative pathogens.

Bacteria isolated from BB showed a positive phenotype regarding the secretion of cellulases, amylases and proteinases. Furthermore, this is the first study to reveal positive phenotypes regarding the secretion of hemicellulases, Coomassie Brilliant Blue G or R dye-degrading enzymes, and Malachite Green dye-degrading enzymes from bacteria isolated from BB. Of 309 bacterial strains isolated from BB, 41 produced hemicellulases, 13 cellulases, 39 amylases, 132 proteinases, 85 Coomassie brilliant blue G or R dye-degrading enzymes, and 72 Malachite Green dye-degrading enzymes. All identified strains produced more than one of the above enzymes. The production of lignin-degrading enzymes (laccases or oxidases) by BB bacteria provides them with the ability to degrade exine (the outer layer of pollen grains). Similarly, the production of cellulases is crucial for the degradation of intin (the inner layer of pollen grains) which is mainly made of cellulose. The ability of BB bacteria to break down pollen grain walls facilitates the release of nutrients and bioactive compounds contained in pollen grains.

Finally, taking into account that bees have been facing multiple challenges, from climate crisis to pesticides and pathogens such as *Vairimorpha (Nosema) ceranae*, we tested whether any alterations in the structure and abundance of microbial communities in honeybee gut and BB microbiomes could serve as biomarkers of honey bee survival. The study implemented a meta-taxonomic approach to investigate whether *V. ceranae* affects the gut microbiome (bacteria and fungi) of adult *A. mellifera* honeybees as well as the BB microbiome stored in *A. mellifera* colonies experiencing severe *V. ceranae* infection (>2,500,000 spores per bee) compared to colonies showing very low spore counts (<40,000 per bee). The analysis revealed an overall decrease in microbial diversity reflected in the number of observed OTUs, both in bacteria and fungi, in both bee gut samples and BB samples. Further analysis showed that *Podosphaera* spp. was absent in BB samples collected from colonies with high spore counts, while the relative abundance of *Blumeria* spp. decreased significantly. Interestingly, the relative abundance of *Rosenbergiella* spp. increased in BB samples collected from colonies with high spore counts. Although further research is needed, overall reduced microbial diversity and relative abundance of certain microbial groups may serve as biomarkers of bee colony collapse.

In conclusion Greek BB is a highly bioactive functional food which can also serve as a source of novel antibacterial and antiviral compounds. BB can form the basis for producing innovative functional foods or drinks. Furthermore, the artificial fermentation of BCP with BB microorganisms is an important achievement on its own, since BB is much harder to collect than BCP. Artificially fermented pollen could further be used for the development of innovative functional foods/drinks and also prebiotic/probiotic preparations for honey bees that could enhance bee immunity, health and survival.

Δημοσιεύσεις που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή.

1. **Didaras NA**, Karatasou K, Dimitriou TG, Amoutzias GD, Mossialos D. Antimicrobial Activity of Bee-Collected Pollen and Beebread: State of the Art and Future Perspectives. *Antibiotics*. 2020; 9(11):811. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110811>
2. **Didaras NA**, Kafantaris I, Dimitriou TG, Mitsagga C, Karatasou K, Giavasis I, Stagos D, Amoutzias GD, Hatjina F, Mossialos D. Biological Properties of Bee Bread Collected from Apiaries Located across Greece. *Antibiotics*. 2021; 10(5):555. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050555>
3. **Asoutis Didaras, N.**, Dimitriou, T., Daskou, M., Karatasou, K. ., & Mossialos, D. **(2021)**. IN VITRO ASSESSMENT OF THE ANTIVIRAL ACTIVITY OF GREEK BEE BREAD AND BEE COLLECTED POLLEN AGAINST ENTEROVIRUS D68. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, e4859. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.4859>
4. Kontogiannis T, Dimitriou TG, **Didaras NA**, Mossialos D. Antiviral Activity of Bee Products. *Curr Pharm Des*. **2022**;28(35):2867-2878. doi: 10.2174/1381612828666220928110103. PMID: 36173050.
5. Georgi, I.; **Asoutis Didaras, N.**; Nikolaidis, M.; Dimitriou, T.G.; Charistos, L.; Hatjina, F.; Amoutzias, G.D.; Mossialos, D. The Impact of *Vairimorpha (Nosema) ceranae* Natural Infection on Honey Bee (*Apis mellifera*) and Bee Bread Microbiota. *Appl. Sci*. **2022**, 12, 11476. <https://doi.org/10.3390/app122211476>
6. Dimitriou, T.G.; **Asoutis Didaras, N.**; Barda, C.; Skopeliti, D.; Kontogianni, K.; Karatasou, K.; Skaltsa, H.; Mossialos, D. Antiviral Activity of Beebread, Bee-Collected Pollen and Artificially Fermented Follen against Influenza A Virus. *Foods* **2023**, 12, 1978. <https://doi.org/10.3390/foods12101978>