

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΙΩΑΝΝΗΣ ΨΙΜΟΥΛΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ
ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΒΙΟΥΜΕΝΑ (BIOFILM) ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ**

**Investigation on the activity of Greek bee bread against the formation of bacterial
biofilm**

ΛΑΡΙΣΑ 2024

**Διερεύνηση της δράσης του ελληνικού μελισσόψωμου έναντι του σχηματισμού
βιοϋμένα (βιοφίλμ) βακτηρίων**

**Investigation on the activity of Greek bee bread against the formation of bacterial
biofilm**

Ιωάννης Ψιμούλης του Παναγιώτη

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Μόσιαλος Δημήτριος (επιβλέπων): Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

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

Πατεράκη Χρυσάνθη: Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας τη χρονική περίοδο από τον Οκτώβριο 2021 μέχρι τον Φεβρουάριο 2022. Η πειραματική διαδικασία έλαβε χώρα στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής Βακτηριολογίας - Ιολογίας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Μόσιαλο Δημήτριο, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε αλλά και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αναθέτοντας μου αυτή την εργασία, αλλά και την πολύτιμη καθοδήγησή του, χωρίς την οποία, η εκπόνηση και ολοκλήρωση τόσο της πειραματικής διαδικασίας όσο και της συγγραφής θα ήταν ακατόρθωτη. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τα άλλα δυο μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον κύριο Αμούτζια Γρηγόριο, Καθηγητή Βιοπληροφορικής με έμφαση στην Μικροβιολογία του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και την κυρία Πατεράκη Χρυσάνθη Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Διδάκτορα του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Διδάρα Ασούτη Νικόλαο για την καθοδήγηση του στο εργαστήριο και κατά τη συγγραφή της εργασίας. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε οικογένεια και φίλους, που με στήριξαν, δίνοντάς μου κουράγιο, ώστε να συνεχίσω με όρεξη και μεγαλύτερη αυτοπεποίθηση.

Περίληψη

Ορισμένα βακτήρια έχουν τη δυνατότητα να δημιουργούν προστατευτικές δομές πάνω σε επιφάνειες και σε ιστούς κατά τη διάρκεια λοιμώξεων. Αυτές οι δομές ονομάζονται βιοϋμένες ή βιοφίλμ και δίνουν στα βακτήρια ισχυρή ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά και μεγάλη αντοχή στο ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, καθώς και προστασία από απολυμαντικά και άλλους αντιμικροβιακούς χημικούς παράγοντες. Τα βακτήρια με ικανότητα σχηματισμού βιοϋμένων απασχολούν ένα διαρκώς αυξανόμενο πλήθος μελετών τα τελευταία χρόνια. Τόσο στη βιομηχανία τροφίμων όσο και στην ιατρική υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την εύρεση νέων στρατηγικών για την πρόληψη του σχηματισμού βιοφίλμ ή την εκρίζωση υπάρχοντος βιοφίλμ.

Η παρούσα μελέτη έχει ως στόχο την διερεύνηση της αναστολής του σχηματισμού βιοφίλμ και της εκρίζωσης υπάρχοντων βιοϋμένων χρησιμοποιώντας εκχύλισμα μελισσόψωμου. Το μελισσόψωμο είναι η γύρη που επεξεργάζονται οι μέλισσες και αποθηκεύουν στην κυψέλη. Είναι ένα μείγμα γύρης, αδενικών εκκρίσεων από τις μέλισσες και μελιού ή νέκταρ. Ενώ αποθηκεύεται, το μελισσόψωμο υφίσταται ζύμωση και μερική πέψη των κόκκων γύρης. Το μείγμα του μελισσόψωμου μπορεί να επιδεικνύει αντιμικροβιακές ικανότητες λόγω των συστατικών του, τα οποία ποικίλουν στη συγκέντρωση ανάλογα με την προέλευση της γύρης, αλλά συνήθως περιλαμβάνουν φλαβονοειδή και άλλες φαινολικές ενώσεις, καθώς και ένζυμα από τις εκκρίσεις των μελισσών και εκκρίσεις από τη μικροβιοτική κοινότητα στο μελισσόψωμο.

Σε αυτή την εργασία, διερευνήθηκαν για πρώτη φορά οι ικανότητες του μελισσόψωμου στην αναστολή της ανάπτυξης βιοϋμένων και στη διατάραξη ή εκρίζωση των ήδη σχηματισμένων βιοϋμένων από τις καλλιέργειες των παθογόνων βακτηρίων *Staphylococcus aureus* και *Acinetobacter baumannii*. Υγρές καλλιέργειες των παθογόνων επωάστηκαν για 24 ώρες με διαφορετικές συγκεντρώσεις δειγμάτων μελισσόψωμου, ποικίλης βοτανικής προέλευσης από διάφορα μέρη της Ελλάδος. Από τα αποτελέσματα βρέθηκε ότι το μελισσόψωμο, ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, είναι ικανό να αναστέλλει μεγάλο ποσοστό του σχηματισμού βιοϋμένων. Η δράση κατά των ήδη σχηματισμένων βιοϋμένων είναι διαφορετική, ωστόσο παραμένει σημαντική σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Σε πολλές περιπτώσεις η δράση του μελισσόψωμου είναι μεγαλύτερη σε σχέση με άλλα μελισσοκομικά προϊόντα.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Abstract.....	6
1 Εισαγωγή.....	8
1.1 Μελισσόψωμο	
1.1.1 Τι είναι το μελισσόψωμο.....	8
1.1.2 Συστατικά μελισσόψωμου.....	9
1.1.3 Ιδιότητες μελισσόψωμου.....	15
1.1.4 Δράση κατά των παθογόνων.....	16
1.2 Βιοϋμένες	
1.2.1 Τι είναι οι βιοϋμένες.....	19
1.2.2 Σχηματισμός βιοϋμένων.....	20
1.2.3 Ρύθμιση βιοϋμένων.....	22
1.2.4 Ο ρόλος των βιοϋμένων στην ανθεκτικότητα των βακτηρίων.....	24
1.3 Βακτήρια υπό μελέτη	
1.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	27
1.3.2 <i>Acinetobacter baumannii</i>	28
2 Σκοπός της μελέτης.....	29
3 Υλικά και μέθοδοι	
3.1 Υλικά.....	29
3.2 Μέθοδοι.....	31
4 Αποτελέσματα και συζήτηση	
4.1 Αποτελέσματα.....	36
4.2 Συζήτηση.....	43
5 Βιβλιογραφία.....	47

1 Εισαγωγή

1.1 ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟ

1.1.1 Τι είναι το μελισσόψωμο

Ως μελισσόψωμο ορίζεται η γύρη που συλλέγεται και αποθηκεύεται στην κυψέλη των μελισσών. Αρχικά οι μέλισσες τροφосυλλέκτες συλλέγουν γύρη από άνθη και με την επιστροφή τους στην κυψέλη εναποθέτουν σφαιρίδια γύρης σε κενά κελιά της κηρήθρας. Για τον σχηματισμό των σφαιριδίων, οι τροφосυλλέκτες χρησιμοποιούν νέκταρ το οποίο εξεμούν και αναμειγνύουν με τους κόκκους γύρης στο στόμα τους. Στη συνέχεια μέλισσες μέσης ηλικίας προσθέτουν μέλι και τις αδενικές τους εκκρίσεις στο μίγμα και το συμπιέζουν μέσα στα κελιά με το κεφάλι τους, ενώ ταυτόχρονα εμβολιάζουν το μείγμα με το μικροβίωμά τους. Η εναπόθεση αυτή γίνεται μεταξύ των κελιών μελιού και των κελιών γόνου, δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο μια ζώνη μελισσόψωμου η οποία είναι στη διάθεση των εργατριών μελισσών για άμεση κατανάλωση. (Didaras Asoutis et al., 2020) Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, στο εσωτερικό των κελιών γίνεται ζύμωση στερεάς κατάστασης πιθανά από λακτοβάκιλλους και ζυμομύκητες του μικροβιώματος. Λόγω της παραγωγής γαλακτικού οξέος από τη ζύμωση, μειώνεται το pH και επάγεται μικροβιακή διαδοχή στο μίγμα. Έτσι ξεκινά η αργή διαδικασία ωρίμανσης του μελισσόψωμου. Η ωρίμανση του μελισσόψωμου συμπεριλαμβάνει την ενζυμική πρόπεψη των γυρεόκοκκων. Η ποικιλόμορφη μικροβιακή χλωρίδα, η οποία χρησιμεύει και ως τροφή για τις μέλισσες, παράγει όχι μόνο ένζυμα αλλά και αμινοξέα, βιταμίνες και αντιμικροβιακές ενώσεις, ενισχύοντας έτσι τη βιοδραστικότητα του μελισσόψωμου. Οι μέλισσες προτιμούν να τρέφονται με το ωριμασμένο μελισσόψωμο αντί για την ακατέργαστη γύρη. (Didaras Asoutis et al., 2021)

Αυτή η τροφή διαφέρει από τη γύρη, διότι επεξεργάζεται από τις μέλισσες και υπόκειται ζύμωση. Τα τοιχώματα του κόκκου γύρης αποτελούνται από δύο στρώματα: το εξωτερικό είναι κατασκευασμένο από ένα ανθεκτικό βιοπολυμερές που ονομάζεται σποροπολενίνη, ενώ η εσωτερική επιφάνεια είναι κατασκευασμένη από ελαστικά μικροϊνίδια κυτταρίνης και πηκτίνη. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης γύρης που καταλύεται από ένζυμα μελισσών και μικροοργανισμούς διασπώνται τα εξωτερικά περιβλήματα των γυρεόκοκκων και αυξάνεται η βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών. Συγκεκριμένα, το τελικό προϊόν διαφέρει από την φρέσκια συλλεγμένη γύρη κατά 19,91% περισσότερο σε περιεκτικότητα ακατέργαστης πρωτεΐνης (crude protein). Επίσης το ολικό περιεχόμενο φαινολών και φλαβονοειδών

καθώς και η αντιοξειδωτική ικανότητα του μελισσόψωμου αυξάνεται κατά 1,27 - 2,40 φορές σε σχέση με την γύρη, που δεν έχει υποστεί ζύμωση. (Didaras Asoutis et al., 2020) Η συλλογή του μελισσόψωμου από την κυψέλη είναι δυσκολότερη σε σχέση με την συλλογή γύρης με αποτέλεσμα να μην είναι διαθέσιμο στην αγορά. Το μελισσόψωμο, ωστόσο έχει πιο ισχυρή δράση από τη γύρη και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μικρότερες δόσεις ή να χορηγηθεί για μικρότερες χρονικές περιόδους. (Didaras Asoutis et al., 2021)

Συμπερασματικά η ζύμωση του μίγματος μελισσόψωμου, καθώς και η μερική πέψη των γυρεόκοκκων από τα επιπρόσθετα ένζυμα των εκκρίσεων της μέλισσας και από το φυσικό μικροβίωμα του μελισσόψωμου, συντηρούν το προϊόν για μεγαλύτερη χρονική διάρκεια και αναβαθμίζουν τη θρεπτική του αξία. (Martha Gilliam, 1997)

1.1.2 Συστατικά μελισσόψωμου

Το μελισσόψωμο έχει χαρακτηριστεί ως η «τέλεια τροφή» σε διάφορες περιπτώσεις λόγω της ποικιλίας και της περιεκτικότητας του σε θρεπτικά συστατικά. Περιέχει 250 διαφορετικές ενώσεις μακροθρεπτικών και μικροθρεπτικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των οποίων είναι βιταμίνες, αμινοξέα, λιπαρά οξέα και φαινολικές ενώσεις. Είναι δύσκολο να γενικευτούν οι θρεπτικές αξίες του μελισσόψωμου. Διάφοροι παράγοντες, όπως η βοτανική και γεωγραφική προέλευση, η κλιματική κατάσταση, ο τύπος του εδάφους, οι δραστηριότητες των μελισσοκόμων ή οι επεξεργασίες αποθήκευσης στην εμπορική παραγωγή συμβάλλουν σε αυτές τις προκλήσεις. (Mohammad et al., 2021) Το μελισσόψωμο περιέχει περίπου 20% πρωτεΐνες, 3% λιπίδια, 24%-35% υδατάνθρακες και περίπου 3% μέταλλα και βιταμίνες. Υπάρχουν επίσης πλήρως ισορροπημένες πρωτεΐνες που περιέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα, βιταμίνες (C, B1, B2, E, K, βιοτίνη, νικοτινικό και φολικό οξύ), παντοθενικό οξύ, χρωστικές και άλλες βιολογικά ενεργές ενώσεις, όπως πολυφαινόλες (φαινολικό οξύ και φλαβονοειδή), καροτενοειδή, στερόλες και ένζυμα (σακχαράση, αμυλάση, φωσφατάσες). Επιπλέον, το μελισσόψωμο περιέχει περισσότερα από 25 διαφορετικά μικρο- και μακροθρεπτικά, όπως σίδηρο, ασβέστιο, φωσφόρο, κάλιο, χαλκό, ψευδάργυρο, σελήνιο και μαγνήσιο. (Rodica Mărgăoan et al., 2019)

Πρωτεΐνη και ελεύθερα αμινοξέα

Το μελισσόψωμο περιέχει μεγάλες ποσότητες (20%) από εύκολα αφομοιώσιμες πρωτεΐνες και όλα τα απαραίτητα για τον άνθρωπο αμινοξέα. Αυτά περιλαμβάνουν 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. (Didaras Asoutis et al.,

2020) Η προέλευση των αμινοξέων στο μελισσόψωμο μπορεί να αποδοθεί τόσο σε φυτική (νέκταρ, μελίτωμα και κύρια γύρη) όσο και σε ζωική (εκκρίσεις μελισσών). Δεδομένου ότι η κύρια πηγή είναι η γύρη, το προφίλ αμινοξέων ή ορισμένα χαρακτηριστικά των αμινοξέων μπορεί να είναι σημαντικά για τη βοτανική ταξινόμηση του μελισσόψωμου. Για παράδειγμα, η τρυπτοφάνη θεωρείται ένας πολλά υποσχόμενος βιοδείκτης των προϊόντων της μέλισσας που σχετίζονται με τις ακακίες και η αργινίνη είναι δείκτης για τα προϊόντα κυψέλης με βάση τη κασταλιά. Εκτός από το ρόλο τους στην πιστοποίηση των προϊόντων της μέλισσας, τα αμινοξέα που περιέχονται στο μελισσόψωμο έχουν τεκμηριωθεί προηγουμένως ότι έχουν φυσιολογικούς ρόλους ζωτικής σημασίας στο ανθρώπινο σώμα. Αντίστοιχα, η μεθειονίνη, ένα απαραίτητο αμινοξύ, υπάρχει σε υψηλή περιεκτικότητα σε λειτουργικά τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων των προϊόντων της μέλισσας, συμμετέχει στην αντίδραση μεθυλίωσης του DNA και στη σύνθεση πρωτεϊνών, δρα ως πρόδρομος της γλουταθειόνης (GSH) και δρα ως ισχυρός αντιοξειδωτικός παράγοντας εξαλείφοντας την περίσσεια δραστικών μορφών οξυγόνου. (ROS) και έτσι προστατεύει τους ιστούς από το οξειδωτικό στρες. Η αργινίνη, ένα απαραίτητο αμινοξύ της γλυκονογένεσης, έχει ανοσορυθμιστικές δράσεις, συμπεριλαμβανομένης της ενίσχυσης των λειτουργιών των T κυττάρων (CD8+) και των μακροφάγων. (Bakour et al., 2022)

Σάκχαρα

Οι μέλισσες χρησιμοποιούν σάκχαρα για να παράγουν την απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωσή τους. Έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες για την περιεκτικότητα σε ζάχαρη του μελισσόψωμου. Για παράδειγμα, οι εργάτριες μέλισσες χρειάζονται περίπου 4 mg/ημέρα σακχάρων για να καλύψουν την καθημερινή τους ενέργεια. Το μελισσόψωμο έχει μικρότερες συγκεντρώσεις υδατανθράκων από τη φρέσκια γύρη λόγω της γαλακτικής ζύμωσης. Η φρουκτόζη είναι συνήθως το κύριο αντιπροσωπευτικό σάκχαρο με συγκέντρωση $11,8 \pm 0,6$ g/100 g, ακολουθούμενη από γλυκόζη ($5,7 \pm 0,4$ g/100 g) και μικρή ποσότητα τρεχαλόζης ($0,92 \pm 0,01$ g/100 g). Σε άλλα δείγματα έχουν βρεθεί διαφορετικές περιεκτικότητες υδατανθράκων. Σε μια μελέτη ένα προφίλ σακχάρων αποκάλυψε ότι η γλυκόζη ήταν το κύριο ελεύθερο σάκχαρο που περιέχεται σε τέσσερα μάλαισιανά πολυανθικά δείγματα μελισσόψωμου. Οι τιμές κυμαίνονταν μεταξύ $10,270 \pm 0,140$ g/100 g και $12,397 \pm 0,980$ g/100 g. Η δεύτερη υψηλότερη περιεκτικότητα σε σάκχαρο ήταν η σακχαρόζη, που κυμαινόταν από $0,595 \pm 0,000$ g/100 g έως $2,094$ g/100 g. Στη συνέχεια η φρουκτόζη, που κυμαίνεται από $0,396 \pm 0,000$ έως $1,488 \pm 0,140$ g/100 g και μαλτόζη, που κυμαινόταν από $0,694 \pm 0,140$ έως $1,994 \pm 0,000$ g/100 g. Αυτή η υψηλή μεταβλητότητα μπορεί να εξηγηθεί από πολλούς παράγοντες, όπως ο χρόνος συγκομιδής, η βοτανική προέλευση και ο μεταβολισμός των σακχάρων από βακτήρια γαλακτικού οξέος (Meriem Bakour et al., 2022)

Λιπαρά οξέα

Μία μελέτη εντόπισε 37 λιπαρά οξέα σε 8 δείγματα BB από την Τουρκία και βρήκε ότι η αναλογία ακόρεστων προς κορεσμένα κυμαινόταν μεταξύ 1,38 και 2,39, υποδεικνύοντας ότι το μελισσόψωμο είναι μια καλή πηγή ακόρεστων λιπαρών οξέων. Η συνολική περιεκτικότητα σε ακόρεστα λιπαρά οξέα ήταν υψηλότερη από αυτή των κορεσμένων λιπαρών οξέων σε όλα τα δείγματα μελισσόψωμου, εκτός από το δείγμα εσπεριδοειδών. Τα λιπαρά οξέα είναι σημαντικά θρεπτικά συστατικά που παίζουν μεγάλο ρόλο στη γονιμότητα και την υγεία των μελισσών. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), ειδικά τα ωμέγα-3, είναι σημαντικά για τη διατροφή και την υγεία του ανθρώπου, καθώς μειώνουν τα επίπεδα τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης στο αίμα. Επιπλέον, παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδεις και αντιθρομβωτικές ιδιότητες. Τα ωμέγα-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα παίζουν επίσης ρόλο στην πρόληψη και θεραπεία του καρκίνου. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα δεν μπορούν να συντεθούν ενδογενώς στο ανθρώπινο σώμα και πρέπει να λαμβάνονται από τα τρόφιμα. Τα λιπαρά οξέα είναι γνωστοί αντιμικροβιακοί παράγοντες. (Karlan et al., 2016)

Υδάτινο περιεχόμενο και pH

Το μελισσόψωμο έχει αποδειχθεί ότι έχει υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία. Αυτό αποδίδεται στις υγροσκοπικές ιδιότητες της γύρης, που προσελκύει νερό από το περιβάλλον. Το μελισσόψωμο συσσωρεύει νερό από το περιβάλλον και επίσης μέσω της προσθήκης σάλιου μέλισσας και μελιού, με αποτέλεσμα ένα κολλώδες τελικό προϊόν. Το φρέσκο μελισσόψωμο έχει ενεργότητα νερού κατάλληλη για να παρέχει ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη ωφέλιμων βακτηρίων και μυκήτων που, βοηθούν στην ωρίμανση του μελισσόψωμου, αλλά και για την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών. Γι' αυτό τον λόγο οι συνθήκες αποθήκευσης του μελισσόψωμου είναι πολύ σημαντικές για τη συντήρηση. Το ώριμο μελισσόψωμο είναι πιο όξινο από τη γύρη των μελισσών. Η τιμή του pH πέφτει καθώς η περιεκτικότητα σε γαλακτικό οξύ στο μελισσόψωμο γίνεται υψηλότερη (3,06%-3,20%) από τη γύρη των μελισσών (0,56%). (Mohammad et al., 2021) Το pH της γύρης που συλλέγεται από τις μέλισσες κυμαίνεται από 3,8-6,3 και το pH του μελισσόψωμου από 3,8-4,3. (Didaras Asoutis et al., 2020)

Μέταλλα και ανόργανα άλατα

Η γύρη περιέχει πάνω από 25 διαφορετικά μικρο- και μακροστοιχεία όπως σίδηρο, ασβέστιο, φώσφορο, κάλιο, χαλκό, ψευδάργυρο, σελήνιο και μαγνήσιο. Τα κυρίαρχα μέταλλα στο μελισσόψωμο ήταν το κάλιο και ακολουθούν ο φώσφορος, το ασβέστιο, το μαγνήσιο, ο σίδηρος, το νάτριο, ο ψευδάργυρος και το μαγγάνιο. Η τέφρα ξηρής ουσίας στη γύρη βρέθηκε να είναι $2,5 \pm 0,4$ g. Η τέφρα στο μελισσόψωμο κυμαινόταν μεταξύ 1,9 και 2,54% και $3,32 \pm 0,08\%$. Η περιεκτικότητα σε τέφρα βρέθηκε αυξημένη

κατά 7,54% στο μελισσόψωμο σε σύγκριση με τη γύρη που συλλέχθηκε από μέλισσες. Επιπλέον, η περιεκτικότητα μελισσόψωμου σε ασβέστιο, κάλιο, φώσφορο, μαγνήσιο και σίδηρο ήταν αυξημένη σε σύγκριση με τη γύρη 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 μελισσόψωμο. (Didaras Asoutis et al., 2020) Τα μέταλλα από το έδαφος μεταφέρονται στα φυτά από τις ρίζες τους και στο μελισσόψωμο μέσω της γύρης των λουλουδιών, του νέκταρ ή του μελιτώματος. Το μελισσόψωμο είναι ένα από τα πλουσιότερα προϊόντα κυψέλης σε μακρο και μικροστοιχεία. Η περιεκτικότητα σε ανόργανα άλατα του μελισσόψωμου μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες, δηλαδή τα συγκεκριμένα φυτά από τα οποία συλλέγουν γύρη και νέκταρ οι μέλισσες, την τοποθεσία ανάπτυξης τους και την εποχή συγκομιδής της γύρης. Επιπλέον, οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη συλλογή δειγμάτων και την αποθήκευση θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη συγκέντρωση και την ανόργανη σύνθεση του μελισσόψωμου (Bakour et al., 2022)

Τα ιχνοστοιχεία εμπλέκονται στη λειτουργία πολλών βιοχημικών και φυσιολογικών διεργασιών στον άνθρωπο. Για παράδειγμα, μια δίαιτα πλούσια σε κάλιο, ένα στοιχείο που παρουσιάζεται σε μεγάλο βαθμό σε δείγματα διαφορετικής ανθικής και γεωγραφικής προέλευσης, βελτιώνει την αρτηριακή πίεση και προλαμβάνει τις καρδιαγγειακές παθήσεις τόσο σε ανθρώπινα όσο και σε ζωικά μοντέλα. Ο φωσφόρος, το έκτο πιο άφθονο μέταλλο στο ανθρώπινο σώμα, σχετίζεται στενά με τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων, τη δραστηριότητα των ενζύμων, τη λειτουργία των σκελετικών και μη σκελετικών μυών, την ανοργανοποίηση των οστών, την ενέργεια και τον μεταβολισμό των λιπιδίων. Τα ιχνοστοιχεία, συμπεριλαμβανομένων των αντιοξειδωτικών ορυκτών, όπως ο ψευδάργυρος, ο σίδηρος, το μαγγάνιο, το σελήνιο και ο χαλκός, δρουν ως συμπαραγόντες πολλών αντιοξειδωτικών και μη αντιοξειδωτικών ενζύμων. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικά συστατικά του μεταβολισμού και της ακεραιότητας του ανθρώπινου σώματος. (Bakour et al., 2022)

Οργανικά οξέα

Τα οργανικά οξέα ευθύνονται για κάποιες ιδιότητες των μελισσοκομικών προϊόντων κατά των μικροβίων, καθώς και για την επίδραση τους στην πέψη. Χρησιμοποιούνται επίσης ως συντηρητικά τροφίμων. Τα πιο συχνά οργανικά οξέα στο μελισσόψωμο είναι το γλυκονικό, το φορμικό, το οξικό, το προπιονικό, το βουτυρικό αλλά και το οξαλοξικό. Η περιεκτικότητα σε οργανικό οξύ στο μελισσόψωμο ποικίλλει ανάλογα με τη βοτανική προέλευση (ηλικία, είδος και φυτικό ιστό). Το γλυκονικό οξύ, το κύριο οργανικό οξύ στο μελισσόψωμο, επέδειξε ισχυρή αντιβακτηριακή δράση κατά των αναερόβιων (*Porphoryomonas gingivalis*), των αρνητικών κατά Gram (*Escherichia coli*) και των θετικών κατά Gram βακτηρίων (*Staphylococcus aureus*), καθώς και πέτυχε αποτελεσματική διείσδυση σε βιοϋμένες. (Meriem Bakour et al., 2022)

Abstract

Some bacteria form protective structures on surfaces and in tissues during infections. These structures are called biofilms and provide high resistance to antibiotics and high tolerance towards the host's immune system, as well as protection from disinfectants and other antimicrobial chemicals. Bacteria which form biofilms have been the subject of an ever-increasing number of studies in recent years. Both in food industry and medicine, there is great interest in finding new strategies to inhibit biofilm formation or eradicate existing biofilm.

The present study aims to measure the inhibition of biofilm formation and the eradication of existing biofilms using bee bread extract. Bee bread is the pollen that bees process and store in the hive. It is a mixture of pollen, glandular secretions from bees, and honey or nectar. While stored, bee bread undergoes fermentation and partial digestion of the pollen grains. The bee bread mixture may exhibit antimicrobial abilities due to its components, which vary in concentration depending on the origin of the pollen but typically include flavonoids and other phenolic compounds, as well as enzymes from bee secretions and secretions from the microbial community in honey bread.

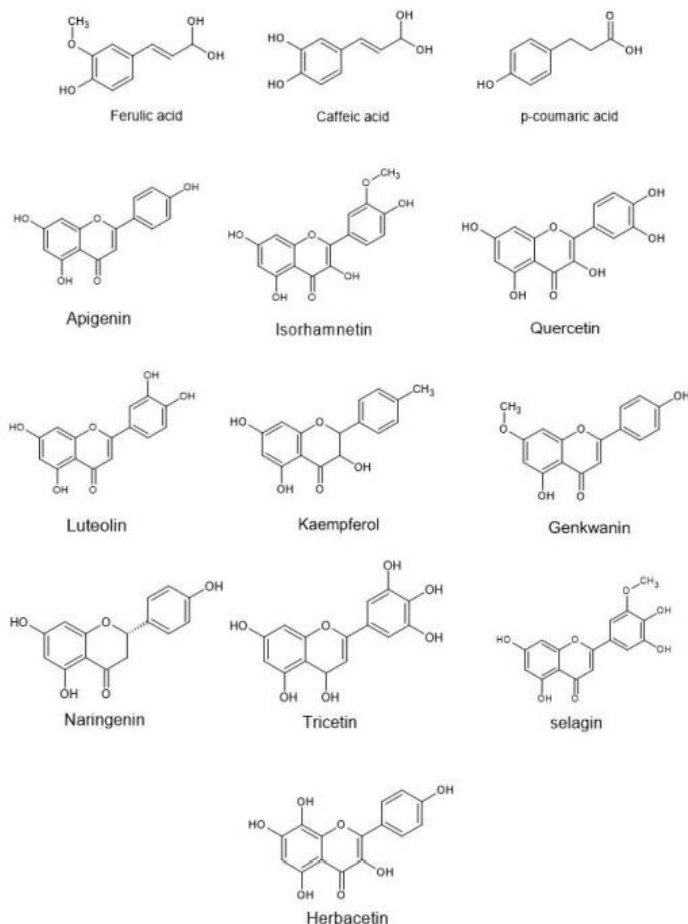
In this study, the ability of bee bread to inhibit the growth of biofilms and to disrupt or eradicate already formed biofilms from cultures of the pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii* was investigated for the first time. Liquid cultures of the pathogens were incubated for 24 hours with different concentrations of bee bread samples of various botanical origins from different parts of Greece. From the results, it was found that bee bread, even in very small concentrations, can inhibit a large percentage of biofilm formation. The action against already-formed biofilms is variable but remains significant at higher concentrations. In many cases, the effect of bee bread is greater than that of other bee products.

Βιταμίνες

Οι βιταμίνες είναι οργανικές ενώσεις που έχουν αρκετούς βιοχημικούς ρόλους στην ανάπτυξη, στη ρύθμιση του μεταβολισμού των ανόργανων συστατικών και στη διαφοροποίηση των κυττάρων. Ορισμένες βιταμίνες έχουν επίσης αντιοξειδωτική δράση και άλλες παίζουν το ρόλο των πρόδρομων ενζυμικών συμπαραγόντων. (Bakour et al., 2022) Το μελισσόψωμο είναι πλούσιο σε βιταμίνες του συμπλέγματος Β και βιταμίνη Κ, η οποία δεν υπάρχει στη φρέσκια γύρη, κάτι που υποδεικνύει την συνεισφορά του μικροβιώματος. Το μελισσόψωμο είναι πλούσιο σε α-τοκοφερόλη (80 ± 30 $\mu\text{g/g}$) και περιέχει σχετικά μικρές ποσότητες ($11,5 \pm 0,3$ $\mu\text{g/g}$) συνενζύμου Q10, ενός από τα πιο σημαντικά κυτταρικά αντιοξειδωτικά. (Didaras Asoutis et al., 2020) Άλλες βιταμίνες, οι οποίες βρίσκονται στο μελισσόψωμο είναι οι βιταμίνες Α, C, Ε, η δ-τοκοφερόλη, η θειαμίνη και η ριβοφλαβίνη. (Bakour et al., 2022)

Φαινολικές ενώσεις - φλαβονοειδή

Οι πολυφαινολικές ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από τα φυτά ως απόκριση σε διαφορετικές συνθήκες βιοτικού και αβιοτικού στρες. Η δομή τους αποτελείται από δακτυλίους βενζολίου με μία ή και περισσότερες από μία υδροξυλομάδες. Αυτές οι χημικές ενώσεις χωρίζονται σε δύο ομάδες: τα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά, όπως η βιταμίνη C και τα φαινολικά οξέα, και τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά, όπως τα καροτενοειδή, οι τοκοφερόλες και τα φλαβονοειδή. Η φύση του εδάφους, οι γεωγραφικές συνθήκες και τα είδη φυτών επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη φυτοχημική σύνθεση των εκχυλισμάτων μελισσόψωμου. Επιπλέον, ο διαλύτης και η μέθοδος εκχύλισης που χρησιμοποιείται επηρεάζουν την ποσότητα και την επιλεκτικότητα των συστατικών του εκχυλίσματος. Η υψηλή περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά στο μελισσόψωμο είναι υπεύθυνη για τις βιοδραστικότητά του. Τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα και άλλα αντιοξειδωτικά συστατικά αναγνωρίζονται ως αποτελεσματικά λειτουργικά μόρια, εμφανίζοντας πολυάριθμες βιοφαρμακολογικές δυνατότητες. Αρκετοί ερευνητές προτείνουν τη χρήση του μελισσόψωμου ως συντηρητικό τροφίμων και λειτουργικό συμπλήρωμα διατροφής ή ως θεραπευτική στρατηγική για την πρόληψη του οξειδωτικού στρες και των συναφών παθήσεων, όπως καρδιομεταβολικές, νευροεκφυλιστικές και καρκινικές ασθένειες. (Bakour et al., 2022)



Εικόνα 1: Χημικοί τύποι φαινολικών ενώσεων του μελισσόψωμου. (Mohammad et al., 2021)

Οι πολυφαινολικές ενώσεις παρέχουν το ξεχωριστό χρώμα των κόκκων γύρης (κίτρινο, καφέ, μαύρο, κόκκινο, μωβ κ.λπ.) και το χαρακτηριστικό οργανοληπτικό τους χαρακτηριστικό είναι η πικρή γεύση. Οι πολυφαινόλες, ως αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά, συμβάλλουν στην πρόληψη του καρκίνου και στη θεραπεία του διαβήτη, της αθηροσκλήρωσης και των καρδιαγγειακών παθήσεων, των αυτοάνοσων νοσημάτων, ακόμη και της άνοιας. Επιδεικνύουν επίσης ισχυρή αντιμικροβιακή δράση. Κάποια από τα πιο συχνά φλαβονοειδή σε δείγματα μελισσόψωμου είναι η κερσετίνη, η καμπφερόλη, η ισοραμνετίνη και τα παράγωγα γλυκοσιδίου ερβακετίνης, ενώ το β-κουμαρικό είναι ένα από τα κυρίως φαινολικά οξέα. (Didaras Nikos Asoutis et al., 2020) Σε ελληνικά δείγματα μελισσόψωμου το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, το οποίο μετρήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, κυμαίνεται από 6,49 έως 14,64 mg (ανάλογα του γαλλικού οξέος) / g δείγματος. Το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών, το οποίο μετρήθηκε με τη χρωματική μέθοδο χλωριούχου αργιλίου, κυμαίνεται από 2,56 έως 5,49 mg (ανάλογα κερσετίνης) / g δείγματος. (Didaras Nikos Asoutis et al., 2021)

Ένζυμα

Το μελισσόψωμο περιέχει υψηλές ποσότητες ενζύμων, από τα οποία η αμυλάση, η ιμπερτάση, οι φωσφατάσες, οι τρανσφεράσες και η οξειδάση της γλυκόζης είναι τα πιο σημαντικά. Η ιμπερτάση και η οξειδάση της γλυκόζης παράγονται κυρίως στους υποφαρυγγικούς αδένες και προστίθενται από τις μέλισσες. Ωστόσο, ορισμένα ένζυμα, όπως η καταλάση και η φωσφατάση, προέρχονται από το νέκταρ, το μελίτωμα ή τη γύρη. Έχουν επίσης βρεθεί ενζυμικοί συμπαράγοντες στο μελισσόψωμο, όπως η βιοτίνη, η γλουταθειόνη και το NAD. Αυτά τα ένζυμα μπορούν να μετατρέψουν ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους σε άλλα μόρια χαμηλού μοριακού βάρους, όπως πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες. Αυτό κάνει το μελισσόψωμο πιο εύπεπτο από τη γύρη των μελισσών. (Bakour et al., 2022)

Μικροβίωμα

Οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στο μελισσόψωμο προέρχονται από το σίελο της μέλισσας, που προστίθεται στη γύρη ως ακατέργαστη ύλη του μελισσόψωμου. Αυτό το μικροβίωμα παίζει σημαντικό ρόλο στη θρέψη της προνύμφης και στην υγεία της ενήλικης μέλισσας, συμπεριλαμβανομένου του να κάνει τους υδατάνθρακες πιο εύπεπτους και να παρέχει διαφορετικά θρεπτικά συστατικά με προστιθέμενη αξία. Επιπλέον, η ποικιλία του μελισσόψωμου σε μικροοργανισμούς μπορεί να του δώσει τις ιδιότητες ενός προβιοτικού προϊόντος. Κάποιοι μύκητες που βρίσκονται στο μελισσόψωμο είναι οι εξής: *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Monilinia*, *Sclerotinia*, *Ascosphaera*, *Toxicocladosporium*, *Botrytis*, *Pseudopithomyces*, *Camerosporium*, *Paraconiothyrium*, *Periconia*, *Septoriella*, *Podosphaera*, *Golovinomyces* και *Paraphaeosphaeria*. Το μικροβίωμα του μελισσόψωμου περιέχει επίσης λακτοβάκιλλους, όπως *Apilactobacillus kunkeei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Fructobacillus fructosus*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus musae* και *Lactobacillus crustorum*. (Bakour et al., 2022)

1.1.3 Βιοδραστικότητα του μελισσόψωμου

Αντιοξειδωτική ικανότητα

Τα αντιοξειδωτικά μόρια είναι ένα από τα πιο σημαντικά συστατικά του μελισσόψωμου. Αρκετές μελέτες έχουν αξιολογήσει την αντιοξειδωτική ικανότητα αυτών των μορίων χρησιμοποιώντας φασματοφωτομετρικές τεχνικές. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται επηρεάζουν τη βιοδραστικότητα του μελισσόψωμου. Το πιο ισχυρό εκχύλισμα είναι το αιθανολικό, ακολουθούμενο από το εξανοϊκό και μετά το υδατικό εκχύλισμα. (Bakour et al., 2022) Οι τιμές IC₅₀ των δοκιμών εξουδετέρωσης ριζών DPPH και ABTS•+ χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων ελληνικού μελισσόψωμου. Όσο χαμηλότερη είναι η τιμή IC₅₀, τόσο μεγαλύτερη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα. Όσον αφορά τον προσδιορισμό

DPPH, οι τιμές IC50 κυμαίνονταν από 0,18 έως 1,8 mg/mL. Στη δοκιμασία ABTS•+, οι τιμές IC50 κυμαίνονταν από 0,38 έως 1,80 mg/mL. Η αντιοξειδωτική δράση του ελληνικού μελισσόψωμου συσχετίζεται στατιστικά με τη συνολική περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες. (Didaras Asoutis et al., 2021)

Αντιφλεγμονώδης ικανότητα

Ορισμένες μελέτες υποδεικνύουν την ικανότητα του εκχυλίσματος μελισσόψωμου να μειώνει τη φλεγμονή. Τα αιθανολικά εκχυλίσματα μελισσόψωμου *Melipona fasciculata* και *Scaptotrigona affinis postica* χορηγήθηκαν σε μοντέλα ποντικών με επαγόμενο οίδημα. Οι αντιφλεγμονώδεις αποκρίσεις ήταν ανεξάρτητες από το χρόνο και τη δόση. Περαιτέρω ανάλυση προσδιόρισε τον πιθανό μηχανισμό των φαινολικών ενώσεων να αναστέλλουν την απελευθέρωση ισταμίνης και να μειώνουν τη σύνθεση προσταγλανδινών. (Mohammad et al., 2021)

Προβιοτικές ιδιότητες

Τα προβιοτικά ορίζονται από την Διεθνή Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ως «ζωντανοί μικροοργανισμοί που όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες προσφέρουν όφελος για την υγεία στον ξενιστή». Τα ανθρώπινα προβιοτικά στελέχη ανήκουν συχνά στα γένη *Lactobacilli*, *Bifidobacteria lactococcus*, *Streptococcus* και *Enterococcus*, και ορισμένα στελέχη ζυμομύκητα που ανήκουν στο γένος *Saccharomyces*. Πρόσφατα, το πεδίο μελέτης των προβιοτικών έχει αποκτήσει μεγάλο επιστημονικό και δημόσιο ενδιαφέρον λόγω των ευεργετικών τους επιδράσεων στη θεραπεία αρκετών ανθρώπινων ασθενειών, κυρίως φλεγμονωδών ασθενειών του εντέρου, λοιμώξεων του εντέρου, αλλεργίας, άσθματος, πνευμονικών λοιμώξεων, ακόμη και ψυχιατρικών παθήσεων. Σε παρόμοιο πλαίσιο, το μελισσόψωμο είναι ένα φυσικό προϊόν πλούσιο σε προβιοτικά που περιέχει ένα διαφορετικό και πολύπλοκο φάσμα μικροοργανισμών, όπως βακτήρια και μύκητες, που συμμετέχουν στη διαδικασία παραγωγής μελισσόψωμου μέσω γαλακτικής ζύμωσης με γύρη μελισσών. (Bakour et al., 2022)

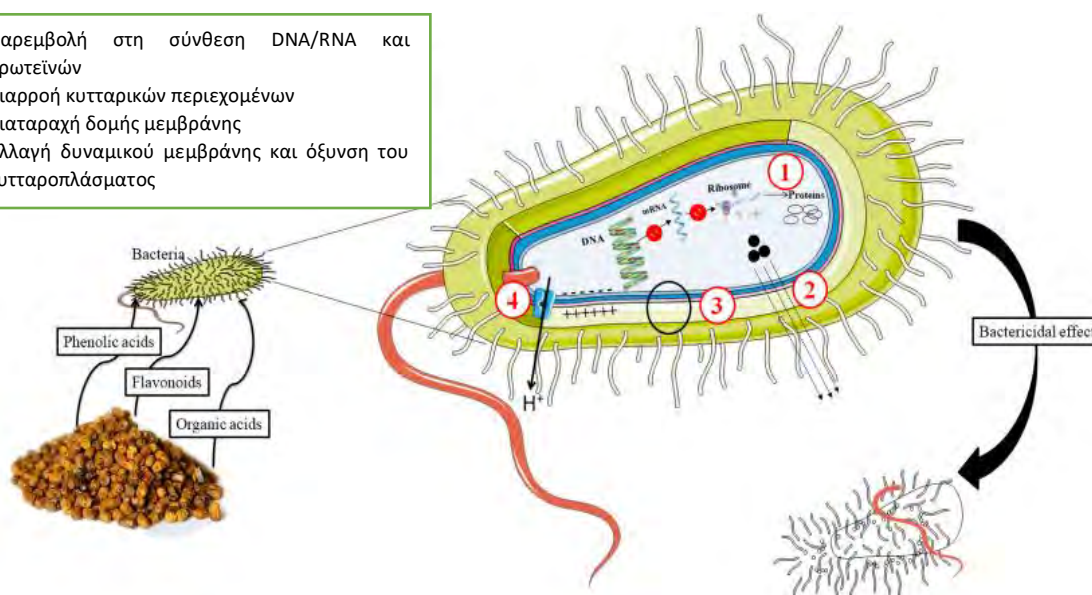
1.1.4 Αντιβακτηριακή Δράση

Σε μια μελέτη που διεξήχθη στο εργαστήριο μας, διαπιστώθηκε ότι το υδατικό εναίωμα ελληνικού μελισσόψωμου ήταν αποτελεσματικό έναντι Gram θετικών βακτηρίων (τιμές MIC κυμαίνονται μεταξύ 3,9 mg/mL και 48 mg/mL) και κατά Gram-αρνητικά βακτήρια (Οι τιμές MIC κυμαίνονται μεταξύ 7,8 mg/mL και 90,4 mg/mL). Στις περισσότερες μελέτες, φαίνεται ότι τα θετικά κατά Gram βακτήρια είναι, γενικά, πιο ευαίσθητα στο εκχύλισμα μελισσόψωμου από τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια.

(Didaras Asoutis et al., 2021) Αυτό μπορεί να οφείλεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, η οποία περιέχει λιγότερα ανιονικά φωσφολιπίδια από τα θετικά κατά Gram βακτήρια. Η συγκεκριμένη σύνθεση είναι η αιτία της αντίστασης ορισμένων Gram-αρνητικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά. (Bakour et al., 2022)

Προτεινόμενοι μηχανισμοί αντιμικροβιακής δράσης

1. Παρεμβολή στη σύνθεση DNA/RNA και πρωτεϊνών
2. Διαρροή κυτταρικών περιεχομένων
3. Διαταραχή δομής μεμβράνης
4. Αλλαγή δυναμικού μεμβράνης και όξυνση του κυτταροπλάσματος



Εικόνα 2: Πιθανοί μηχανισμοί αντιβακτηριακής δράσης των βιοδραστικών μορίων που βρίσκονται στο μελισσόψωμο. (Bakour et al., 2022)

Το μελισσόψωμο περιέχει διαφορετικά βιοδραστικά μόρια με ισχυρές βακτηριοκτόνες ιδιότητες. Λόγω των υδροξυλομάδων τους (OH), οι φαινολικές ενώσεις και ορισμένα αντιοξειδωτικά μόρια αλληλεπιδρούν με τη βακτηριακή κυτταρική μεμβράνη με δεσμούς υδρογόνου και επιτυγχάνουν την αντιβακτηριακή τους δράση με δύο πιθανούς συνδυασμένους μηχανισμούς. Ο πρώτος μηχανισμός είναι μέσω της διαταραχής της δομής της βακτηριακής μεμβράνης και συνεπώς της απώλειας του κυτταρικού περιεχομένου. Ο δεύτερος μηχανισμός εξαρτάται από την μετατόπιση των ηλεκτρονίων, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης και τη μείωση της βαθμίδωσης του pH κατά μήκος της μεμβράνης, και συνεπώς τη μείωση της σύνθεσης ATP. Η αντιβακτηριακή αποτελεσματικότητα των φαινολικών ενώσεων επηρεάζεται κυρίως από τη σχετική θέση της ομάδας υδροξυλίου στον φαινολικό πυρήνα κάθε μορίου αντιοξειδωτικού. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα φλαβονοειδή επάγουν τις αντιβακτηριακές τους δράσεις στοχεύοντας διαφορετικά μονοπάτια και μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της αναστολής της σύνθεσης νουκλεϊκού οξέος, της διαταραχής της λειτουργίας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, της τροποποίησης της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης και της αλληλεπίδρασης με ορισμένα

ζωτικά βακτηριακά ένζυμα. Η κερσετίνη, μια πανταχού παρούσα φλαβονόλη, ασκεί τη βακτηριοκτόνο δράση της στην *Escherichia coli* και τον *Staphylococcus aureus* καταστρέφοντας το βακτηριακό τοίχωμα και τη δομή της μεμβράνης καθώς και αναστέλλοντας τη σύνθεση βακτηριακών πρωτεϊνών. Επιπλέον, η κερσετίνη αναστέλλει τον ενεργειακό μεταβολισμό των βακτηρίων και τη σύνθεση του DNA. Αποδείχθηκε ότι η καμπφερόλη, μια ένωση φλαβονόλης που βρίσκεται συνήθως στο μελισσόψωμο, αναστέλλει την ελικάση DNA PriA και μειώνει τη δραστηριότητα της ATPάσης στον χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο, γεγονός που υποδηλώνει την εφαρμογή της ως φυσικό συστατικό στην ανάπτυξη νέων ενεργών αντιβιοτικών κατά του *Staphylococcus aureus*. Η απιγενίνη αναστέλλει την RNA πολυμεράση και τη γυράση του DNA στον χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο. Εκτός από τις φαινολικές ενώσεις, τα οργανικά οξέα, τόσο αρωματικά όσο και αλειφατικά, έχουν αναφερθεί ότι έχουν βακτηριοστατική και βακτηριοκτόνο δράση. Έχουν τη δυνατότητα να διεισδύουν στην βακτηριακή μεμβράνη και να απελευθερώνουν πρωτόνια (H^+), μειώνοντας με αυτό τον τρόπο το ενδοκυτταρικό pH. Επίσης αντιδρούν με τα μακρομόρια και αποσταθεροποιούν τα βακτηριακά τοιχώματα. Από τις παραπάνω πληροφορίες απορρέει ότι η αποτελεσματική αντιμικροβιακή δράση πιθανά οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δραστικών συστατικών και των μικροβιακών κυττάρων με διαφορετικούς μηχανισμούς (Εικόνα 2). (Bakour et al., 2022)

1.2 ΒΙΟΪΜΕΝΕΣ

1.2.1 Τι είναι οι βιοϊμένες

Ένας βακτηριακός βιοϊμένας (ή αλλιώς βιοφίλμ), είναι μια τρισδιάστατη οργανωμένη κοινότητα μικροοργανισμών, η οποία είναι εγκλεισμένη σε μια εξωκυτταρική πολυσακχαρική (EPS) ή εξωκυτταρική πολυμερική ουσία γνωστή και με την ονομασία γλυκοκάλυξ. Ο γλυκοκάλυκας διασχίζεται από ένα δίκτυο ανοικτών διαύλων ύδατος. Οι εξωκυτταρικές πολυμερικές ουσίες σχηματίζονται κατά την προσκόλληση των μικροβίων σε μία επιφάνεια. Η μικροβιακή κοινότητα προσκολλάται και αναπτύσσεται σε αβιοτικές αδρανείς επιφάνειες (π.χ. υδάτινες, πλαστικές, μεταλλικές επιφάνειες, ιατρικά εργαλεία και συσκευές κ.α.) ή και σε επιφάνειες ζωντανών ιστών (π.χ. δόντια). Οι βιοϊμένες είναι συνήθως πολυμικροβιακοί και μπορεί να αποτελούνται όχι μόνο από βακτηριακά κύτταρα αλλά και από μύκητες, ιούς, πρωτεΐνες, εξωκυτταρικό DNA και άλλους βιολογικούς παράγοντες. Η αρχιτεκτονική των βιοϊμένων, αποτελεί ένα άριστο περιβάλλον για τις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και χάρη στις κοντινές αποστάσεις των κυττάρων διευκολύνεται η οριζόντια γονιδιακή μεταφορά (π.χ. μέσω πλασμιδίων), των σημάτων επικοινωνίας, των μεταβολιτών και η διάχυση των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών στην κοινότητα των βιοϊμένων. (Omar et al., 2017) Η ανταλλαγή θρεπτικών επιτυγχάνεται χάρη στο περιεχόμενο ύδατος το οποίο αποτελεί έως και 97% του όγκου της εξωκυτταρικών πολυμερικών ουσιών. Οι βιοϊμένες, αποτελούνται συνήθως κατά 5 % - 35 % κατ' όγκο από τους μικροοργανισμούς δηλαδή τα κύτταρα και ο υπόλοιπος όγκος από τη μήτρα δηλαδή το εξωκυτταρικό πολυμερές, το οποίο αποτελείται σε σημαντικό μέρος από πρωτεΐνες. (Jamal et al., 2018) Μετά από έρευνες παρατηρήθηκε ότι τα ζωντανά βιοφίλμ, είτε είναι ανεπτυγμένα εργαστηριακά και αποτελούνται από έναν μικροοργανισμό, είτε είναι πολύπλοκες πολυκυτταρικές κοινότητες που αναπτύσσονται σε φυσικά οικοσυστήματα, έχουν δείξει ότι η βασική δομή της κοινότητας είναι καθολική, με μερικές διαφορές μικρής σημασίας. Οι βιοϊμένες μπορούν επίσης να λειτουργήσουν ως βιοφυσικά υλικά, όπου τα κύτταρα λειτουργούν ως κολλοειδή και η πολυμερική ουσία ως πήκτωμα διασυνδεδεμένων πολυμερών. Αυτή η ιδιότητα παρέχει μηχανική σταθερότητα στη δομή του βιοϊμένα και ανθεκτικότητα σε μηχανικό στρες. (Gloag et al., 2020) Η μήτρα στην οποία ενσωματώνονται τα μικρόβια σε ένα βιοφίλμ προστατεύει τα άτομα από την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, την τοξικότητα μετάλλων, την έκθεση σε οξύ, την αφυδάτωση και την αλατότητα, τη φαγοκυττάρωση, τα αντιβιοτικά και τους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Το προστατευτικό εξωκυτταρικό πολυμερές (EPS), η μεταβολική ευελιξία και η φαινοτυπική πλαστικότητα των μικροβίων είναι πιθανό να εξηγήσουν πώς τα βακτήρια μπορούν να επιβιώσουν σε τόσους πολλούς τύπους περιβαλλόντων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που είναι αφιλόξενα σε υψηλότερες μορφές ζωής. Με το σχηματισμό οργανωμένων κοινοτήτων με άλλα μικρόβια, μπορούν να επεκτείνουν ακόμη περισσότερο την ικανότητά τους να

προσαρμόζονται και να ευδοκιμούν ακόμα και στα πιο εχθρικά περιβάλλοντα. (Hall-Stoodley et al., 2004).

1.2.2 Σχηματισμός βιοϋμένων

Αρχική επαφή και προσκόλληση σε επιφάνεια

Το πρώτο στάδιο σχηματισμού βιοϋμένων είναι η προσκόλληση πλαγκτονικών κυττάρων σε κάποια επιφάνεια μέσω των βλεφαρίδων και των μαστιγίων τους. Στην προσκόλληση συνεισφέρουν επίσης και φυσικές δυνάμεις, όπως οι δυνάμεις *Wander Waal* όπως επίσης υπάρχουν και απωθητικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την προσκόλληση αλλά και την συνοχή του βιοϋμένα είναι η αλληλεπίδραση υγρού - στερεού και ο υδρόφοβος χαρακτήρας της επιφάνειας. Οι μικροοργανισμοί συνδέονται πιο εύκολα σε υδροφοβικές, μη πολικές επιφάνειες (π.χ. Teflon, πλαστικά), επειδή μειώνουν τις απωθητικές δυνάμεις μεταξύ βακτηρίων και επιφάνειας, σε αντίθεση με υδρόφιλες και πολικές (π.χ. μέταλλα και γυαλί). (Jamal et al., 2018)

Σχηματισμός μικρο - αποικίας

Μετά την επίτευξη προσκόλλησης σε βιοτική ή αβιοτική επιφάνεια, τα εδραιωμένα αρχικά κύτταρα ξεκινούν τον πολλαπλασιασμό. Στη συνέχεια, είναι δυνατό να σχηματιστούν διαφορετικοί τύποι βιοϋμένων, οι οποίοι εξαρτώνται από το περιβάλλον. (Omar et al., 2017) Χάρη σε χημική σηματοδότηση από το εσωτερικό της εξωκυτταρικής πολυμερικής ουσίας (EPS) γίνονται κυτταρικές διαιρέσεις, οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό μίας αρχικής μικρο - αποικίας. Οι μικρο - αποικίες των βιοϋμένων αποτελούνται συνήθως από πληθώρα τύπων μικροβιακών κοινοτήτων. Οι μικροβιακές κοινότητες συνεργάζονται μεταξύ τους με πολλαπλούς τρόπους. Η συνεργασία αυτές έχουν σημαντικό ρόλο στην ανταλλαγή θρεπτικών από το υπόστρωμα, την κατανομή σημαντικών μεταβολικών προϊόντων και την απέκκριση και απομάκρυνση μεταβολικών τελικών προϊόντων. Επομένως οι βιοϋμένες δημιουργούν ένα περιβάλλον συνεργασίας μεταξύ δύο ή περισσότερων βακτηριακών τύπων, που διαφέρουν μεταβολικά και εξαρτούνται μεταξύ τους για την αξιοποίηση περισσότερων υποστρωμάτων με απώτερο σκοπό την εξασφάλιση ενέργειας για όλη την κοινότητα μικροβίων του βιοϋμένα. Ένα παράδειγμα των συνεργιστικών δράσεων στο εσωτερικό του προστατευτικού εξωκυτταρικού πολυμερούς (EPS) είναι κατά την αναερόβια πέψη όπου σύνθετη οργανική ύλη καταβολίζεται σε μεθάνιο (CH_4) ή διοξείδιο του άνθρακα (CO_2). Τρεις τύποι αλληλεπιδράσεων είναι απαραίτητοι. Πρώτα βακτήρια, τα οποία κάνουν ζύμωση, παράγουν οξέα και αιθανόλη από τον καταβολισμό πιο σύνθετων οργανικών ενώσεων. Αυτά τα υποστρώματα καταναλώνονται από ακετογόνα βακτήρια και έπειτα μεθανογόνα βακτήρια μετατρέπουν τα προϊόντα (οξικό, διοξείδιο του άνθρακα και υδρογόνο) σε μεθάνιο. (Jamal et al., 2018)

Ωρίμανση και αρχιτεκτονική βιοϋμένα

Αφού τα βακτήρια μεταβολίζουν τα υποστρώματά τους στο εσωτερικό της προστατευτικής μήτρας και επιτευχθεί η απαραίτητη μικροβιακή κυτταρική πυκνότητα, εκφράζεται συνολικά ο φαινότυπος του βιοϋμένα. Αυτό σημαίνει ότι τα κύτταρα του βιοϋμένα αποκτούν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα τόσο σε αντιμικροβιακές θεραπείες (π.χ. αντιβιοτικά) όσο και στο ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή σε περίπτωση λοίμωξης. Για να αυξηθεί η μικροβιακή κυτταρική πυκνότητα σε υψηλά επίπεδα είναι απαραίτητη η κατάλληλη διακυτταρική επικοινωνία. (Omar et al., 2017) Τα βακτηριακά κύτταρα επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω της παραγωγής και έκκρισης σηματοδοτικών μορίων μικρού μοριακού βάρους, τα οποία είναι γνωστά και ως αυτοεπαγωγείς. Οι αυτοεπαγωγείς συμμετέχουν και διευκολύνουν την αίσθηση μεγέθους πληθυσμού (quorum sensing) και αυξάνονται σε μια κρίσιμη συγκέντρωση καθώς ο προσκολλημένος πληθυσμός αυξάνει σε μέγεθος. Όταν ο πληθυσμός μικροβίων φτάσει σε κρίσιμο επίπεδο, τα μόρια αίσθησης μεγέθους πληθυσμού επάγουν την αλλαγή έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, βοηθώντας τη βακτηριακή κοινότητα να σχηματίσει ένα ώριμο βιοϋμένα. Σε αυτό το στάδιο ωρίμανσης του βιοϋμένα εκφράζονται ορισμένα γονίδια, των οποίων τα προϊόντα παίζουν σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό της εξωκυτταρικής πολυμερούς ουσίας. Δεδομένου ότι η εξωκυτταρική πολυμερική ουσία είναι το κύριο υλικό στην τρισδιάστατη δομή του βιοφίλμ, δημιουργούνται ενδιάμεσα κενά στη μήτρα. Αυτά τα κανάλια είναι γεμάτα με νερό και λειτουργούν ως κυκλοφορικό σύστημα, που χρησιμοποιείται για τη διανομή σημαντικών θρεπτικών συστατικών και την απομάκρυνση των αποβλήτων από τις κοινότητες των μικρο - αποικιών στο βιοϋμένα. Μόλις ο βιοϋμένας εδραιωθεί και ωριμάσει σε μια επιφάνεια, απελευθερώνει πλαγκτονικά κύτταρα τα οποία μεταναστεύουν ώστε να βρουν μια νέα θέση για αποικισμό. (Jamal et al., 2018)

Αποκόλληση και διασπορά βιοϋμένων

Σε αυτή τη φάση, τα μικροβιακά κύτταρα εντός του βιοφίλμ εκτελούν γρήγορο πολλαπλασιασμό και διασπορά προκειμένου να μετατραπούν από στάσιμη σε κινητή μορφή. Στη συνέχεια, η αποκόλληση συμβαίνει με φυσικό τρόπο. Ωστόσο, ορισμένοι τύποι βακτηρίων δεν παράγουν εξωκυτταρικό πολυσακχαρίτη και τα βακτηριακά κύτταρα διασκορπίζονται απευθείας στο περιβάλλον, αλλά μερικές φορές μπορεί επίσης να εμπλέκεται μηχανικό στρες σε αυτή τη διαδικασία. (Baselga et al., 1994, Gloag et al., 2020) Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αποκόλλησης μικροβιακές κοινότητες μέσα στο βιοφίλμ παράγουν διαφορετικά σακχαρολυτικά ένζυμα που βοηθούν στην απελευθέρωση των μικροβίων της επιφάνειας σε μια νέα περιοχή για αποικισμό. Για παράδειγμα, η *Escherichia coli* παράγει λύση N-ακετυλο-ηπαροζάνης, η *Pseudomonas aeruginosa* και η *Pseudomonas fluorescens* παράγουν αλγινική λύση και ο *Streptococcus equi* παράγει υαλουρονιδάση για τη λύση της μήτρας εξωκυτταρικής πολυσακχαρικής ουσίας και την επακόλουθη αποκόλληση. Σε αυτή τη φάση τα μικροβιακά κύτταρα ρυθμίζουν προς τα πάνω την έκφραση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με το σχηματισμό μαστιγίων, για να αφήσουν τα βακτήρια να μετακινηθούν σε μια νέα θέση. Η αποκόλληση των μικροβιακών

κυττάρων και η μεταφορά σε νέο σημείο βοηθά στην εξάπλωση των λοιμώξεων. (Jamal et al., 2018)

Το δομικό χαρακτηριστικό των βιοϋμένων που έχει τις σοβαρότερες επιπτώσεις στην έκβαση των χρόνιων βακτηριακών λοιμώξεων, είναι η τάση των μεμονωμένων αποικιών να αποσπαστούν από τον υπόλοιπο βιοϋμένα και να δημιουργήσουν έναν νέο. Διότι τα κύτταρα αυτά έχουν ήδη ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και μπορεί να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα στην υγεία του ασθενούς (π.χ. εγκεφαλικό επεισόδιο ή σοβαρά πνευμονικά επακόλουθα) (Donlan and Costerton, 2002)

1.2.3 Σηματοδοτικά μονοπάτια - Ρύθμιση βιοϋμένων

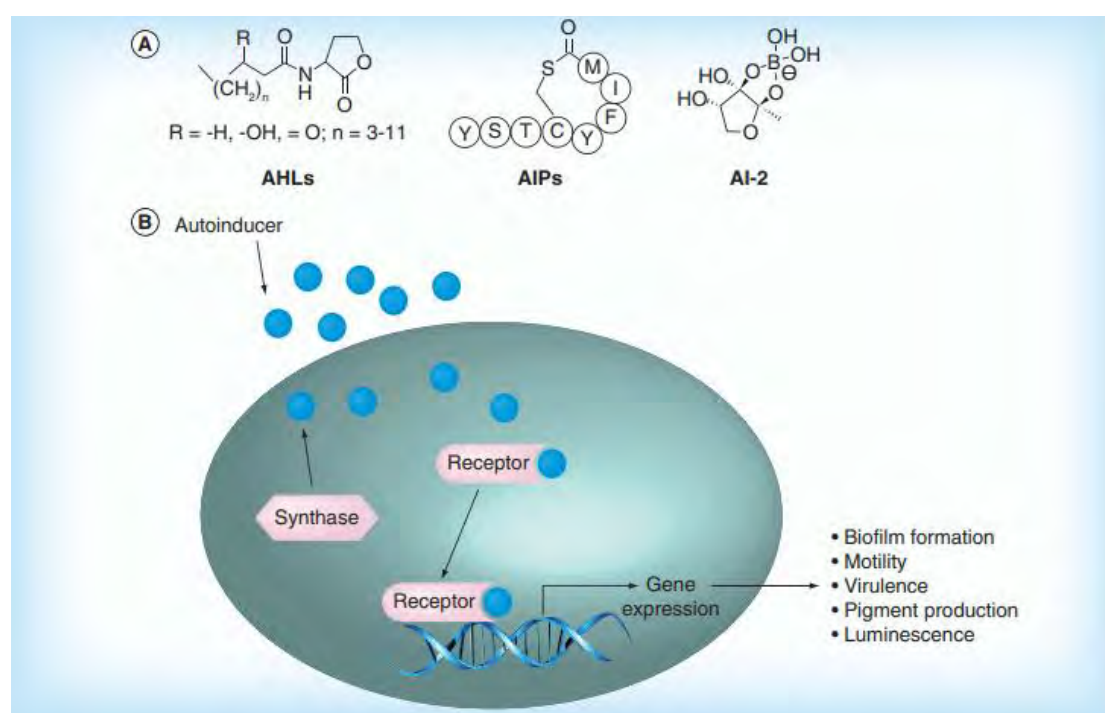
Αίσθηση μεγέθους πληθυσμού

Ως αίσθηση μεγέθους πληθυσμού (quorum sensing) ορίζεται η διαδικασία επικοινωνίας μεταξύ κυττάρων που ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων σε υψηλή κυτταρική πυκνότητα. Σε υψηλή κυτταρική πυκνότητα, η συγκέντρωση ενός αυτοεπαγωγέα, ο οποίος εκκρίνεται από τα βακτήρια στο περιβάλλον, φτάνει σε ένα ορισμένο όριο, το οποίο οδηγεί σε γονιδιακή έκφραση και ρύθμιση ποικίλων φυσιολογικών δραστηριοτήτων.

Προκειμένου να σχηματιστεί ένα βιοφίλμ, τα βακτήρια πρέπει να συγχρονίσουν τη γονιδιακή τους έκφραση και μερικά χρησιμοποιούν συστήματα αίσθησης μεγέθους πληθυσμού (quorum sensing) για να το επιτύχουν αυτό. Η αίσθηση μεγέθους πληθυσμού είναι ένας μηχανισμός με τον οποίο τα βακτήρια φαίνεται να παρακολουθούν την κυτταρική πυκνότητα και ρυθμίζουν τις συλλογικές συμπεριφορές. Έχουν προταθεί πολλές εναλλακτικές υποθέσεις για το ρόλο των μορίων που εμπλέκονται στην αίσθηση μεγέθους πληθυσμού. Οι βακτηριακοί πληθυσμοί συντονίζουν τη γονιδιακή τους έκφραση παράγοντας και ανταποκρινόμενοι σε μια ποικιλία ενδοκυτταρικών και διακυτταρικών σημάτων που ονομάζονται «αυτοεπαγωγείς». Τα βακτήρια «μιλούν» μεταξύ τους χρησιμοποιώντας χημικές ουσίες για μηνύματα συμπεριλαμβανομένων μικρών μορίων. Για παράδειγμα, οι λακτόνες ακυλο-ομοσερίνης (AHLs) μεσολαβούν στη αίσθηση μεγέθους πληθυσμού σε Gram-αρνητικά βακτήρια. Υπάρχουν διάφοροι τύποι AHL, ανάλογα με το μήκος και τη λειτουργικότητα της πλευρικής αλυσίδας ακυλίου. Μικρά πεπτίδια ρυθμίζουν την διαμεσολαβούμενη από τη αίσθηση μεγέθους πληθυσμού γονιδιακή έκφραση σε Gram-θετικά βακτήρια και το AI-2 μεσολαβεί στην αίσθηση μεγέθους πληθυσμού τόσο στα Gram-θετικά όσο και στα Gram-αρνητικά βακτήρια. Σε χαμηλές κυτταρικές πυκνότητες, υπάρχει μικρή ποσότητα αυτοεπαγωγέα στα εξωκυτταρικά μέσα. Καθώς η κυτταρική πυκνότητα αυξάνεται, η συγκέντρωση του αυτοεπαγωγέα φτάνει σε ένα όριο και σε αυτό το σημείο το σύμπλεγμα αυτοεπαγωγέα/ρυθμιστικής πρωτεΐνης (υποδοχέας) δρα για να επάγει ή να καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων-στόχων (Εικόνα 3). Η αίσθηση

μεγέθους πληθυσμού ελέγχει διάφορες φυσιολογικές διεργασίες: για παράδειγμα, βιοφωταύγεια, έκκριση παραγόντων λοιμογόνου δράσης, σχηματισμό βιοϋμένων, αντοχή στα αντιβιοτικά και άλλα. Η αίσθηση μεγέθους πληθυσμού έχει παρατηρηθεί ότι ρυθμίζει το σχηματισμό βιοϋμένα σε διάφορα βακτηριακά είδη (Rabin et al., 2015).

Στο *Staphylococcus aureus*, το σύστημα αίσθησης μεγέθους πληθυσμού ρυθμίζει τη διασπορά του βιοϋμένα. (Rabin et al., 2015) Το *Acinetobacter baumannii* και το στενά συγγενικό του *Acinetobacter nosocomialis* έχουν ένα σύστημα αίσθησης μεγέθους πληθυσμού, το οποίο παίζει αναπόσπαστο ρόλο στη ρύθμιση των παραγόντων λοιμογόνου δράσης, του σχηματισμού βιοφίλμ και της κινητικότητας της επιφάνειας. (Colquhoun & Rather, 2020)



Εικόνα 3. Αίσθηση μεγέθους πληθυσμού: **A)** Κύριοι αυτοεπαγωγείς **B)** Σηματοδοτικό μονοπάτι

AHL: λακτόνη ακυλομοσερίνη **AIP:** αυτοεπαγωγικό πεπτίδιο **AI-2:** αυτοεπαγωγέας-2

Κυκλικό δι - GMP και sRNAs

Το κυκλικό δι-GMP έχει αναδειχθεί ως ένας σημαντικός σηματοδοτικό μόριο που εμπλέκεται στο σχηματισμό βιοφίλμ. Αυτό το μόριο σηματοδότησης έχει βρεθεί ότι ρυθμίζει μια ποικιλία φαινοτύπων βακτηριακής ανάπτυξης, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης βιοφίλμ, κινητικότητας και λοιμογόνου παράγοντα.

Έχει παρατηρηθεί η συσχέτιση μεταξύ της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης κυκλικής δι-GMP και του σχηματισμού βιοφίλμ σε αρκετά κλινικά σημαντικά βακτήρια (π.χ. *P. aeruginosa*, *Y. pestis*, *V. cholerae*, *K. pneumoniae* κ.α.). Στα περισσότερα βακτήρια η μετάβαση από τον πλαγκτονικό στον βιοϋμενικό τρόπο ζωής ρυθμίζεται από διάφορες πρωτεΐνες τελεστές που δεσμεύουν το κυκλικό δι-GMP με αποτέλεσμα ποικίλα αποτελέσματα μέσω τοπικού εντοπισμού πρωτεΐνης μεταξύ κυττάρων και επιφάνειας, αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, μεταγραφικής ενεργοποίησης ή δέσμευσης DNA. Τα μικρά μη κωδικοποιητικά RNA (sRNAs) παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στα βακτηριακά ρυθμιστικά δίκτυα που ελέγχουν τη μετάβαση μεταξύ πλαγκτονικής κατάστασης και συνθήκης βιοϋμένα. (Rabin et al., 2015)

1.2.4 Ο ρόλος των βιοϋμένων στην ανθεκτικότητα των βακτηρίων

Οι βιοϋμένες δημιουργούν προβλήματα, τόσο στον βιομηχανικό, όσο και στον ιατρικό τομέα, διότι οι βιοϋμένες είναι εκ φύσεως εξαιρετικά ανθεκτικοί στην εξάλειψη τους από αντιμικροβιακούς παράγοντες και στους μηχανισμούς ανοσοποίησης του ξενιστή, όπως αντισώματα και φαγοκύτταρα. Αυτό οφείλεται στη φύση της δομής των βιοϋμένων και στις ιδιότητες των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται μέσα τους. Ο φαινότυπός της μικροβιακής κοινότητας του βιοϋμένα την καθιστά ανθεκτική σε αντιμικροβιακούς παράγοντες (π.χ. αντιβιοτικά) και η μήτρα του εξωπολυσακχαρίτη καθιστά τα κύτταρα ανθεκτικά στα αντιβακτηριακά μόρια και κύτταρα που κινητοποιούνται από τον ξενιστή. Το λειτουργικό περιβάλλον των μεμονωμένων βακτηριακών κυττάρων που αναπτύσσονται εντός των βιοϋμένων διαφέρει ριζικά από αυτό των πλαγκτονικών κυττάρων στο ίδιο οικοσύστημα, και ακόμη πιο ριζικά από εκείνο των πλαγκτονικών κυττάρων σε καλλιέργεια που αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο εργαστηριακά.

Το εξωπολυμερές των βιοϋμένων προστατεύει τα βακτήρια σε περιπτώσεις χρόνιων πληγών από φλεγμονώδεις αποκρίσεις και με αυτό τον τρόπο αποτρέπεται η επούλωση. Συγκεκριμένα το εξωπολυμερές περιορίζει την ικανότητα των λευκών αιμοσφαιρίων να διεισδύουν τον βιοϋμένα και δυσκολεύουν την κίνησή τους σε αυτόν. Επίσης όταν τα κοκκιοκύτταρα απελευθερώνουν τα κοκκία τους ο βιοϋμένας αραιώνει τα περιεχόμενα και εξασθενίζει τη δράση τους (παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου). Με αυτό το τρόπο παρεμποδίζεται φαγοκυττάρωση. Το εξωπολυμερές επίσης επιτυγχάνει να εμποδίζει την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και την ανίχνευση οψωνινών στα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων. Με αυτό τον τρόπο μειώνεται και η ικανότητα ανοσολογικής απόκρισης από τα λεμφοκύτταρα. Τέλος η έκθεση βιοϋμένων σε αντιβιοτικό μη ανασταλτικής συγκέντρωσης ή ικανότητας μπορεί να προκαλέσει ως απόκριση παχύτερους βλεννώδεις βιοϋμένες με πιο σύνθετη σύσταση της μήτρας. (Omar et al., 2017)

Παραδείγματα λοιμώξεων που σχετίζονται με τους βιοϋμένες περιλαμβάνουν τον αποικισμό εμφυτευμένων ιατρικών συσκευών όπως προσθετικές βαλβίδες καρδιάς και βηματοδότες, κεντρικοί φλεβικοί καθετήρες, καθετήρες ουρήθρας, φακοί επαφής, ενδομήτριες συσκευές και οδοντιατρικές μονάδες νερού. Άλλα

παραδείγματα ανθρώπινων λοιμώξεων που έχουν άμεση σχέση με βιοϋμένες είναι η λοιμώδης ενδοκαρδίτιδα, η ωτίτιδα, η χρόνια μικροβιακή προστατίτιδα, η περιοδοντίτιδα και η τερηδόνα, διάφορες πνευμονικές λοιμώξεις σε ασθενείς με κυστική ίνωση και οι χρόνιες πληγές. Η πλειονότητα των ανθρώπινων μολύνσεων (60% -80%) σχετίζονται με βιοϋμένες. (Omar et al., 2017)

Μηχανισμοί αντοχής βιοϋμένων σε θεραπείες

Μέσα στο βιοφίλμ, αρκετοί μηχανισμοί προσδίδουν την πολυπαραγοντική αντοχή στα αντιβιοτικά.

Γλυκοκάλυκας (εξωπολυμερές) - Περιορισμένη διείσδυση

Ο γλυκοκάλυκας είναι αναπόσπαστο μέρος των βιοφίλμ και το πάχος του κυμαίνεται από 0,2 μm έως 1,0 μm και βρίσκεται τόσο σε Gram-θετικά όσο και σε Gram-αρνητικά βακτήρια. Τα συστατικά της εξωκυτταρικής μήτρας του βιοφίλμ όπως οι πολωμένοι πολυσακχαρίτες και τα μόρια εξωκυτταρικών DNA δίνουν στον γλυκοκάλυκα την ικανότητα να εγκλωβίζει διάφορα είδη αντιβιοτικών. Είναι ενδιαφέρον ότι το στρώμα εξωπολυσακχαρίτη μπορεί να συσσωρεύει αντιβακτηριδιακά μόρια έως και 25% του βάρους του. (Shriti Singh et al., 2017) Επίσης, η εξωπολυμερική ουσία περικυκλώνει τα συγκροτημένα κύτταρα των βακτηρίων και αποτρέπει τα ανθρώπινα λευκά αιμοσφαίρια από το να πλησιάσουν και να τα σκοτώσουν. (Rabin et al., 2015)

Οριζόντια μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά

Κάποια βακτήρια αποκτούν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά από τυχαίες μεταλλάξεις στα γονίδια τους. Άλλα βακτήρια έχουν μέσα τους γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά μέσα στα πλασμίδια τους. Τα πλασμίδια αντιγράφονται ανεξάρτητα και μπορούν να μεταφέρονται μεταξύ βακτηρίων με οριζόντια μεταφορά γονιδίων. Στους βιοϋμένες η οριζόντια μεταφορά γονιδίων γίνεται συχνότερα από ότι εκτός. Μελέτες *S. aureus* έχουν δείξει πως μέσα στους βιοϋμένες προάγεται η διάδοση γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά λόγω συσπείρωσης των βακτηρίων. (Rabin et al., 2015)

Ετερογένεια μεταβολικού ρυθμού και ρυθμού αύξησης πληθυσμού

Στο εσωτερικό των βιοϋμένων υπάρχει περιορισμένος χώρος και διαθεσιμότητα οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών, λόγω χαμηλής διάχυσής τους στους διαύλους των βιοϋμένων. Επομένως τα κύτταρα στο εσωτερικό και ειδικά στα βαθύτερα στρώματα έχουν πιο αργό μεταβολικό ρυθμό καθώς και μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης και κυτταρικών διαιρέσεων. Αυτά τα χαρακτηριστικά απευαισθητοποιούν τα βακτήρια αυτά από τα αντιβιοτικά που στοχεύουν σε βακτήρια που υπόκεινται κυτταρική διαίρεση. Τα αντιβιοτικά μπορεί να διεισδύουν και να σκοτώνουν κύτταρα στην περιφέρεια του βιοϋμένα, ωστόσο τα κύτταρα με χαμηλούς μεταβολικούς δεν επηρεάζονται και μετά την πάροδο της αγωγής αντιβιοτικού επαναποικίζουν τον βιοϋμένα. (Rabin et al., 2015)

Κύτταρα persister

Σε κάθε βιοϋμένα υπάρχει μια μικρή ομάδα κυττάρων, τα οποία λέγονται κύτταρα persister. Ο ρυθμός ανάπτυξης και διαίρεσής τους είναι εξαιρετικά αργός έως και μηδενικός. Τα περισσότερα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται σε κλινικές και νοσοκομεία, τα οποία στοχεύουν στους μηχανισμούς κυτταρικής αύξησης ή διαίρεσης δεν είναι αποτελεσματικά απέναντι σε κύτταρα persister. Επομένως αυτά τα κύτταρα μπορούν να λειτουργήσουν ως απόθεμα κάποιας ασθένειας και μετά από την πάροδο του στρες από τη δράση των αντιβιοτικών να επανενεργοποιηθούν και να διασπαρθούν ως μολυντικά σωματίδια. (Rabin et al., 2015)

Αντλίες εκροής

Οι αντλίες εκροής επιτρέπουν στα βακτηριακά κύτταρα να απεκκρίνουν διακυτταρικές τοξίνες, συμπεριλαμβανομένων των αντιβιοτικών. Οι αντλίες εκροής υπάρχουν και σε πλαγκτονικά κύτταρα, αλλά στο εσωτερικό των βιοϋμένων τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες τους αυξορρυθμίζονται. Αυτό είναι ένδειξη ότι συνεισφέρουν στην ανθεκτικότητα κατά των αντιβιοτικών. (Rabin et al., 2015)

Ιξωδοελαστικότητα βιοϋμένα

Οι βιοϋμένες αποτελούνται από ιξώδη ελαστικά υλικά (εξωπολυμερής ουσία) που προσφέρουν μηχανική αντοχή στη δομή και αντίστοιχα όταν δέχεται χημική πίεση σκληραίνει και προστατεύει τα κύτταρα στο εσωτερικό. Όταν η μηχανική πίεση είναι αρκετά δυνατή για να αλλοιώσει τη δομή, λόγω της ιξωδοελαστικότητας ο βιοϋμένος είτε «ρέει» προς νέα κατεύθυνση και εξαπλώνεται σε νέο σημείο, είτε ξανασχηματίζεται και ο τελικός βιοϋμένος είναι μεγαλύτερος και πιο σταθερός από τον προηγούμενο. Επομένως Ως εκ τούτου, η ιξωδοελαστικότητα συμβάλλει στη λοιμογόνο δράση των βιοϋμένων κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, προάγοντας την επιμονή και την επαναφορά αυτών των κοινοτήτων. (Gloag et al., 2019)

Για την αντοχή ή ανθεκτικότητα των βακτηριακών βιοϋμένων δεν ευθύνεται αποκλειστικά κάποιο χαρακτηριστικό από αυτά, αλλά ο συνδυασμός τους.

1.3 Βακτήρια υπό μελέτη

1.3.1 *Staphylococcus aureus*

Ο *Staphylococcus aureus* ή χρυσίζων σταφυλόκοκκος είναι ένα θετικό κατά Gram βακτήριο με κοκκοειδές σχήμα και χωρίς κινητικότητα. Το γένος του σταφυλόκοκκου εμπεριέχει 52 είδη και 28 υποείδη βακτηρίων. Από όλα αυτά ο *Staphylococcus aureus* είναι μακράν το πιο κλινικά σημαντικό. Ο *Staphylococcus aureus* βρίσκεται στο ομοσιτιστικό μικροβίωμα του βλεννογόνου της ρινικής κοιλότητας σε περίπου 20 % - 40 % του γενικού πληθυσμού. Όταν το επιθήλιο του βλεννογόνου διαταράσσεται, λόγω κάποιας χρόνιας δερματικής πάθησης, τραύματος ή λόγω χειρουργικών επεμβάσεων το βακτήριο μπορεί να διεισδύσει στους υποκείμενους ιστούς και να προκαλεί μόλυνση. Τα άτομα με επεμβατικές ιατρικές συσκευές (π.χ. καθετήρες περιφερικής ή κεντρικής φλεβικής πρόσβασης) ή με κατεσταλμένο ανοσοποιητικό σύστημα είναι ιδιαίτερα ευάλωτα σε μολύνσεις *Staphylococcus aureus*. Ένα στέλεχος του *Staphylococcus aureus* με ενδιαφέρον είναι το MRSA, το οποίο είναι ανθεκτικό στη μεθικιλίνη. Τα δεδομένα από ευρωπαϊκές χώρες δείχνουν μια γενική τάση προς την αύξηση του επιπολασμού του MRSA από το βορρά προς το νότο της ηπείρου, με <5% του *S. aureus* που απομονώνεται από επεμβατικές λοιμώξεις να είναι ανθεκτικό στη μεθικιλίνη στη Βόρεια Ευρώπη (π.χ. Ολλανδία, Νορβηγία, Σουηδία και Δανία) σε σύγκριση με 25–50% στη νότια Ευρώπη (π.χ. Πορτογαλία, Ισπανία, Ιταλία και Ελλάδα). (Andie S Lee et al., 2018)

Ο *Staphylococcus aureus* είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο που μπορεί να προκαλέσει διάφορες ασθένειες. Συγκεκριμένα, αποτελεί μία από τις πιο κοινές αιτίες βακτηριαμίας και λοιμώδους ενδοκαρδίτιδας. Επιπρόσθετα, μπορεί να προκαλέσει διάφορες λοιμώξεις του δέρματος και του μαλακού ιστού αλλά και οστεοαρθρικές λοιμώξεις. Ο σχηματισμός ενός πυρήνα για βακτηριακό αποικισμό και λοίμωξη του μυοκαρδίου ξεκινά με βλάβη στο καρδιακό ενδοθήλιο, είτε από άμεσο τραύμα (π.χ. ενδοαγγειακοί καθετήρες και ηλεκτρόδια, εγχυόμενα σωματίδια από χρήση ενέσιμων φαρμάκων ή ταραχώδης ροή αίματος που προκύπτει από ανωμαλίες των βαλβίδων) ή φλεγμονή (π.χ. δευτεροπαθής σε ρευματική καρδιοπάθεια ή εκφυλιστική βαλβιδοπάθεια). Η έκθεση των υποενδοθηλιακών κυττάρων προκαλεί την παραγωγή πρωτεϊνών εξωκυτταρικής μήτρας και παράγοντα ιστού και την εναπόθεση ινώδους και αιμοπεταλίων στα οποία μπορούν να προσκολληθούν τα μικρόβια και να προκαλέσουν λοιμώδη ενδοκαρδίτιδα. Η κύρια άμυνα έναντι της μόλυνσης από *S. aureus* είναι η απόκριση των ουδετερόφιλων. Όταν ο *Staphylococcus aureus* εισέρχεται στο δέρμα, τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα μεταναστεύουν

στο σημείο της μόλυνσης. Ο *S. aureus* αποφεύγει αυτή την απάντηση με διάφορους τρόπους, συμπεριλαμβανομένου του σχηματισμού βιοϋμένων. (Steven Y. C. Tong et al., 2015)

1.3.2 *Acinetobacter baumannii*

Το *Acinetobacter baumannii* είναι ένας αερόβιος, αρνητικός κατά Gram κοκκοβάκιλλος χωρίς κινητικότητα. Το *Acinetobacter baumannii* ανήκει στα έξι παθογόνα στην ομάδα «ESKAPE» (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, και είδη εντεροβακτηρίων) με ανθεκτικότητα σε πολλαπλά αντιβιοτικά και λοιμογόνο δράση. Αυτή η ομάδα είναι η υπεύθυνη για την πλειονότητα των νοσοκομειακών λοιμώξεων και μπορεί να αποφύγει τη βιοκτόνο δράση των αντιμικροβιακών παραγόντων. Οι λοιμώξεις του *Acinetobacter baumannii* έχουν θεωρηθεί μια σημαντική πρόκληση επειδή παρουσιάζει εκτεταμένη αντοχή στα αντιβιοτικά και υψηλή θνησιμότητα που σχετίζεται με τις λοιμώξεις του. Οι νοσηλευόμενοι και ευάλωτοι ασθενείς διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο λοιμώξεων από *Acinetobacter baumannii* επειδή διεισδύει μέσω κενών του δέρματος και των αεραγωγών. Επιπλέον, οι περισσότερες λοιμώξεις που προκαλούνται από αυτό το βακτήριο επηρεάζουν τους ασθενείς που διαμένουν στη μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ). Το *Acinetobacter baumannii* προκαλεί πολλές λοιμώξεις, συμπεριλαμβανομένων του δέρματος και των μαλακών ιστών, λοιμώξεις τραυμάτων, βακτηριαιμία, ενδοκαρδίτιδα, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, μηνιγγίτιδα και πνευμονία. Η πιο συχνή νοσοκομειακή λοίμωξη που σχετίζεται με το *Acinetobacter baumannii* είναι η πνευμονία κυρίως σε ασθενείς που εισάγονται σε ΜΕΘ και αναπνέουν μέσω αναπνευστήρα. Το ποσοστό θνησιμότητας από *Acinetobacter baumannii* που προκαλείται από πνευμονία που σχετίζεται με τον αναπνευστήρα κυμαίνεται από 40 έως 70%. Μαζί με άλλους σημαντικούς παράγοντες, το *Acinetobacter baumannii* παρεμβαίνει στην ανάπτυξη λοιμώξεων από εγκαύματα, όπου η ύπαρξη στελεχών ανθεκτικότητας σε πολλαπλά φάρμακα (Multi-Drug Resistance) και η χαμηλή διείσδυση πολλών αντιβιοτικών είναι τα κύρια προβλήματα για τη χημειοθεραπεία. Το ποσοστό των εγκαυμάτων που σχετίζονται με το *Acinetobacter baumannii* είναι περίπου 22% και εξαπλώνεται κυρίως μεταξύ του στρατιωτικού προσωπικού, με ποσοστό Multi-Drug Resistance περίπου 53%. Επιπλέον, το *Acinetobacter baumannii* μπορεί να προκαλέσει λοιμώξεις που σχετίζονται με το κεντρικό νευρικό σύστημα που μπορούν να αντιμετωπιστούν με αντιβιοτικά κολλιστίνης. Τα στελέχη του *Acinetobacter baumannii* μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο περιβάλλον, τα οποία βοηθούν στη διάδοσή τους και στην εξάπλωση των παθογόνων στελεχών Multi-Drug Resistance. Ο αποικισμός του *Acinetobacter baumannii* στο ανθρώπινο δέρμα και στις αδρανείς επιφάνειες είναι υπεύθυνος για τη μόλυνση, τη διάδοση ασθενειών και την παραμονή των βακτηρίων στο περιβάλλον. (Ibrahim et al., 2021)

2 Σκοπός μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της δράσης 8 δειγμάτων μελισσόψωμου από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και διαφορετικής βοτανικής προέλευσης κατά των βιοϋμένων των βακτηρίων *Staphylococcus aureus* και *Acinetobacter baumannii*. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η αναστολή σχηματισμού βιοϋμένων από υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων με την παρουσία μελισσόψωμου και σε άλλο πείραμα διερευνήθηκε η επίδραση των δειγμάτων μελισσόψωμου σε πλήρως σχηματισμένους βιοϋμένες των δύο βακτηρίων.

3 Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Υλικά

Τα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη ήταν το στέλεχος 1552 του *Staphylococcus aureus* που είναι ανθεκτικό στη μεθικιλίνη και *Acinetobacter baumannii*. Δοκιμάστηκε επίσης το βακτήριο *Klebsiella pneumoniae*, αλλά απορρίφθηκε διότι δεν σχηματίζονταν βιοϋμένες κατά την πειραματική διαδικασία.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την περάτωση της πειραματικής διαδικασίας ήταν:

- Θρεπτικό μέσο Mueller Hinton broth (Lab M, Bury, UK)
- D – γλυκόζη (SERVA, Heidelberg, GmbH)
- Υγρό έκπλυσης: Phosphate Buffer Saline (PBS)
- Απιονισμένο νερό
- Μεθανόλη
- Οξικό οξύ 33% v/v

- Χρωστική ουσία: κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet) 0,1% w/v
- Μηχανική πιπέτα μεταβλητού όγκου 2 - 20 μ l
- Μηχανική πιπέτα μεταβλητού όγκου 20 - 200 μ l
- Μηχανική πιπέτα μεταβλητού όγκου 100 - 1000 μ l
- Αποστειρωμένες πλάκες μικροτιτλοδότησης πολυστερίνης 96 πηγαδιών (Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Γερμανία)
- Αποστειρωμένες σύριγγες
- Αποστειρωμένα φίλτρα σύριγγας 22nm
- Αποστειρωμένα πλαστικά φιαλίδια τύπου falcon 50ml
- Αποστειρωμένα πλαστικά φιαλίδια τύπου Eppendorf 1,5ml και 2ml
- Συσκευή ανάγνωσης μικροπιακών (PerkinElmer Multimode plate reader, EnSpire manager, USA)

Τα δείγματα μελισσόψωμου που χρησιμοποιήθηκαν, παρατίθενται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Λίστα των δειγμάτων μελισσόψωμου και της φυτικής προέλευσης του. Απεικονίζονται μόνο ποσοστά γυρεόκοκκων ίσα ή μεγαλύτερα από 3% (Didaras Nikos Asoutis et al., 2021)

Φυτική προέλευση	4 (Λάρισα)	8 (Κοζάνη)	9 (Ρέθυμνο)	10 (Άρτα)	11 (Χανιά)	12 (Λάρισα)	15 (Εύβοια)	18 (Άθως)
Amaranthaceae					9,4			
Asteraceae			4,1		5,7			
Begoniaceae	10,3							
Boraginaceae					54,8		34,5	
Brassicaceae	28,7	67,2						
Cistaceae			19,2		3,7	32,6		
Ericaceae				41,6		23,8		
Fabaceae		3,8	30,4	27,9	6,4	4,5		
Fagaceae		4,9						99,8
Guttiferae	6,3	4,9	18,5	8,7		3,4	4,6	
Lamiaceae	4,6					3,6	10,6	
Liliaceae			4			14,1	3,5	
Oleaceae					4,3			
Rosaceae	20,4	11	6,5					
Saliaceae	11,6			5		4,7	8,2	
Scrophulariaceae			7,7	5,8	3	3		
Umbelliferae/ Apiaceae					3			
Verbenaceae							28	
Άγνωστη	8,6	4,1		3,1				

3.2 Μέθοδοι

Προετοιμασία μελισσόψωμου

Όλα τα δείγματα διατηρούνταν αποθηκευμένα σε πλαστικά δοχεία σε κατάψυξη. Για την δημιουργία του εναιωρήματος του μελισσόψωμου 500 mg του δείγματος διαλυόταν σε 2 ml απιονισμένου ύδατος και αναδεύονταν με τη βοήθεια vortex. Έπειτα το διάλυμα μελισσόψωμου έμπαινε σε φυγόκεντρο στα 10000 x g για 10 λεπτά. Μετά την απομόνωση του υπερκείμενου με σύριγγα το δείγμα αποστειρωνόταν με διήθηση από φίλτρα σύριγγας 22 nm. Το υδάτινο εναιώρημα αποθηκευόταν και διατηρούταν σε ψυγείο για έως και δύο εβδομάδες. Κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος το διάλυμα μελισσόψωμου αραιωνόταν διαδοχικά σε αναλογία 1:1 (υποδιπλασιαζόμενες) ώστε να δημιουργηθούν οι φθίνουσες συγκεντρώσεις του πειράματος.

Οι συγκεντρώσεις που δημιουργούνταν τελικά ήταν οι εξής: 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 και 0,097% w/v. Δεν χρησιμοποιούνταν όλες συγκεντρώσεις σε κάθε πείραμα

Προετοιμασία θρεπτικού μέσου Mueller Hinton broth

Το θρεπτικό μέσο για τις υγρές καλλιέργειες βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία ήταν το Mueller Hinton broth (Lab M, Bury, UK). Παρασκευαζόταν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η σκόνη του θρεπτικού διαλυόταν σε απιονισμένο νερό σε αναλογία 2,1 γραμμάρια ανά 100 ml νερού. Επιπροσθέτως στο μέσο που προοριζόταν για την ανάπτυξη βακτηριακού βιοφίλμ, γινόταν επίσης προσθήκη 2% D-γλυκόζης (SERVA, Heidelberg, GmbH) με σκοπό την ενίσχυση σχηματισμού βιοφίλμ. Το μείγμα θερμαινόταν με ταυτόχρονη ανάδευση μέχρι να ομογενοποιηθεί. Τέλος το διάλυμα ερχόταν σε σημείο βρασμού για ένα λεπτό. Μετά την παρασκευή το θρεπτικό υλικό χωριζόταν σε μικρότερα γυάλινα φιαλίδια και στη συνέχεια αποστειρωνόταν στους 120 °C για 20 λεπτά. Διατηρούταν σε ψυγείο έως και μία εβδομάδα.

Προετοιμασία βακτηριακών κυττάρων

Τα βακτήρια τα οποία χρησιμοποιούνταν κατά την πειραματική διαδικασία χρειάζονταν μια φρέσκια καλλιέργεια πριν εμβολιάσουν τις καλλιέργειες του πειράματος (επώαση περίπου 15 ώρες στους 37° C σε ζωμό Mueller-Hinton). Ο σκοπός της πρώτης καλλιέργειας ήταν, ώστε να αυξηθεί η πυκνότητα των βακτηρίων

αλλά και ώστε τα βακτήρια να είναι στην εκθετική φάση της καλλιέργειας όταν εισέλθουν στο πείραμα ώστε να υπάρξει γρήγορος και αποτελεσματικός σχηματισμός βιοφίλμ. Η πρώτη καλλιέργεια βακτηρίων γινόταν με το θρεπτικό Mueller Hinton broth χωρίς D-γλυκόζη. Έπειτα από ανάδευση βακτήρια από παλαιότερες καλλιέργειες εμβολίαζαν φιαλίδια Errendorf με 1,5 ml θρεπτικού και επωάζονταν στους 37 °C για 24 ώρες.

Έπειτα από περίπου ένα 15ωρο η υγρή καλλιέργεια αραιωνόταν με ζωμό Mueller Hinton κατά προσέγγιση σε 0,5 πρότυπο θολερότητας McFarland. Μετά από μία ακόμη αραιώση σε αναλογία 1:10 τα βακτήρια εμβολίαζαν τη μικροπλάκα του πειράματος.

Η υπόλοιπη καλλιέργεια αποθηκευόταν σε ψυγείο για τον εμβολιασμό κατά προετοιμασία της νέας καλλιέργειας στο επόμενο πείραμα. Διατηρούνταν για μία εβδομάδα. Η διαδικασία επαναλαμβανόταν πριν από κάθε ανεξάρτητο πείραμα.

Πειραματική διαδικασία

Πείραμα αναστολής σχηματισμού βιοϋμένων

Προετοιμασία μικροπλάκας

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε ήταν in vitro ποσοτική δοκιμασία σχηματισμού βιοϋμένων σε πλάκα μικροτιτλοδότησης σε παρόμοιο πρότυπο άλλων μελετών. (Stapanović et al., 2007)

Η μικροπλάκα 96 πηγαδιών (Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Γερμανία) γεμίζονταν σε έξι από τις 8 σειρές (Εικόνα 4).

Οι πρώτες τρεις σειρές χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα αναστολής βιοφίλμ υπό την παρουσία των δειγμάτων του μελισσόψωμου. Μέσα στα βοηθία τοποθετήθηκαν με πιπέτα 90 μl από το θρεπτικό υλικό Mueller Hinton broth με 2% D - γλυκόζη (SERVA, Heidelberg, GmbH) 10 μl από την αραιωμένη φρέσκια υγρή καλλιέργεια βακτηρίου και 100 μl από τα προετοιμασμένα υδάτινα δείγματα μελισσόψωμου. Οι σειρές αυτές ήταν από τα αριστερά στα δεξιά της μικροπλάκας σε βαθμιδωτή φθίνουσα σειρά συγκεντρώσεων του δείγματος μελισσόψωμου.

Η τέταρτη σειρά της μικροπλάκας ήταν η ομάδα αρνητικού μάρτυρα με μελισσόψωμο. Το μελισσόψωμο έχει τη δυνατότητα να απορροφά ακτινοβολία κατά τη φωτομέτρηση. Σκοπός αυτού του μάρτυρα ήταν να μετρηθεί η απορρόφηση κατά τη φωτομέτρηση της μικροπλάκας, για την οποία είναι υπεύθυνο αποκλειστικά το μελισσόψωμο. Έτσι στους υπολογισμούς αυτή η απορρόφηση αφαιρούταν από την συνολική απορρόφηση των βιοφίλμ, που σχηματίστηκαν υπό την παρουσία μελισσόψωμου. Στα βοηθία της σειράς τοποθετούσαν 100 μl θρεπτικού υλικού και 100 μl διαλύματος μελισσόψωμου με διαδοχική φθίνουσα σειρά συγκεντρώσεων όπως και οι πρώτες τρεις σειρές.

Για λόγους εξοικονόμησης υλικών, χώρου στη μικροπλάκα αλλά και χρόνου κατά την πειραματική διαδικασία, συχνά το πείραμα γινόταν με δύο δείγματα μελισσόψωμου ανά μικροπλάκα. Η πλάκα χωριζόταν στα δύο με έξι στήλες και επομένως έξι συγκεντρώσεις για το κάθε δείγμα.

Η πέμπτη σειρά γέμιζε με 200 μl MH broth και λειτουργούσε ως αρνητικός μάρτυρας χωρίς μελισσόψωμο. Η έκτη σειρά ήταν ο θετικός μάρτυρας και στα πηγάδια της τοποθετούταν 190 μl θρεπτικού υλικού MH broth με 2% D - γλυκόζη (SERVA, Heidelberg, GmbH) και 10 μl εμβολιασμό από την αραιωμένη υγρή καλλιέργεια βακτηρίου.

Μετά την προετοιμασία η μικροπλάκα επωαζόταν στους 37 ° C για 24 ώρες. Στο τέλος της περιόδου 24 ωρών γινόταν φωτομέτρηση της μικροπλάκας στα 600 nm χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκων (PerkinElmer Multimode plate reader, EnSpire manager, USA).

Χρώση βιοϋμένων με κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet)

Έπειτα από την επώαση της μικροπλάκας γινόταν χρώση των βιοϋμένων που σχηματίζονταν στη μικροπλάκα με χρωστική crystal violet. Μετά τη χρώση ακολουθούσε εκ νέου φωτομέτρηση της μικροπλάκας στα 570 nm. Η διαδικασία χρώσης ακολουθεί τα εξής βήματα:

1. Απόρριψη των περιεχομένων της μικροπλάκας με πιπέτα.
2. Έκπλυση των πηγαδιών με 200 μl διαλύματος PBS ή αποστειρωμένου απιονισμένου νερού.
3. Μονιμοποίηση με 200 μl μεθανόλη για 15 λεπτά. Η μονιμοποίηση γίνεται με σκοπό να κολλήσουν οι βιοϋμένες που έχουν δημιουργηθεί από τα βακτήρια στα τοιχώματα των πηγαδιών της μικροπλάκας.
4. Απόρριψη της μεθανόλης και στέγνωμα της μικροπλάκας στους 37 ° C για 10 λεπτά.
5. Χρώση με 200 μl χρωστικής κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet) 0,1% w/v για 15 λεπτά.
6. Απόρριψη της χρωστικής, έκπλυση με 200 μl αποστειρωμένου και απιονισμένου νερού και στέγνωμα στους 37 ° C. Σε αυτό το σημείο οι βιοϋμένες γίνονται ορατοί λόγω της χρώσης. Ο *S. aureus* συνήθως σχηματίζει βιοϋμένες στον πυθμένα των πηγαδιών. Αντιθέτως στο πείραμα *A. baumannii* οι βιοϋμένες παρατηρούνται σε ένα δαχτυλίδι στα τοιχώματα των πηγαδιών και περίπου στο ύψος της στάθμης των 200 μl.
7. Προσθήκη 200 μl οξικού οξέος 30% v/v για 15 λεπτά και ανάδευση με πιπέτα. Το οξικό οξύ διαλύει τους χρωματισμένους βιοϋμένες και η ανάδευση δημιουργεί ένα φωτομετρήσιμο διάλυμα.

Μετά τη χρώση και την φωτομέτρηση της μικροπλάκας στα 570 nm από συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών (PerkinElmer Multimode plate reader, EnSpire manager, USA) το πείραμα ολοκληρώνεται και ακολουθούν οι υπολογισμοί της αναστολής σχηματισμού βιοϋμένων.

Πείραμα εκρίζωσης σχηματισμένων βιοϋμένων

Προετοιμασία μικροπλάκας

Και σε αυτό το πείραμα η μέθοδος που ακολουθήθηκε ήταν in vitro ποσοτική δοκιμασία σχηματισμού βιοϋμένων σε πλάκα μικροτιτλοδότησης σε παρόμοιο πρότυπο άλλων μελετών με μία διαφορά. (Stapanović et al., 2007) Για την εκτέλεση του πειράματος εκρίζωσης χρειαζόταν πρώτα ο σχηματισμός των βιοϋμένων στη μικροπλάκα. Η μικροπλάκα 96 πηγαδιών (Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Γερμανία) γεμιζόταν σε τρεις σειρές με 190 µl θρεπτικού υλικού Mueller Hinton broth με D - γλυκόζη (SERVA, Heidelberg, GmbH) και εμβολιασμό 10 µl από την αραιωμένη καλλιέργεια του βακτηρίου, όπως θα γινόταν σε θετικό μάρτυρα. Το πείραμα εκρίζωσης σχηματισμένων βιοϋμένων εκτελούνταν παράλληλα με το πείραμα αναστολής σχηματισμού βιοϋμένων. Για αυτό τον λόγο η μικροπλάκα εκρίζωσης βιοϋμένων δεν χρειαζόταν μάρτυρα. Ακολουθούσε επώαση της στους 37 ° C για 24 ώρες, ώστε να σχηματιστεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα βιοϋμένων.

Μετά την πρώτη επώαση γινόταν φωτομέτρηση της μικροπλάκας στα 600 nm από συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών (PerkinElmer Multimode plate reader, EnSpire manager, USA). Έπειτα γινόταν αφαίρεση του υγρού και των πλαγκτονικών κυττάρων της καλλιέργειας από την μικροπλάκα. Στη συνέχεια τα πηγάδια γεμίζονταν με το υδατικό εναιώρημα μελίσσοςψωμου με διαδοχική φθίνουσα σειρά συγκεντρώσεων από τα αριστερά στα δεξιά (στα πρότυπα του πειράματος αναστολής σχηματισμού βιοϋμένων). Ακολουθούσε νέα επώαση στους 37 ° C για 24 ώρες, ώστε να επιδράσουν τα συστατικά του μελίσσοςψωμου στους σχηματισμένους βιοϋμένες και να διαλύσουν ή να αποκολλήσουν το μέγιστο δυνατό ποσοστό τους.

Μετά την δεύτερη επώαση οι εναπομείναντες βιοϋμένες οι οποίοι παραμέναν προσκολλημένοι στην επιφάνεια της μικροπλάκας χρωματίζονταν με crystal violet και γινόταν φωτομέτρηση τους στα 570 nm με συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών (PerkinElmer Multimode plate reader, EnSpire manager, USA). Με την ολοκλήρωση του πειράματος τα δεδομένα από τις φωτομετρήσεις χρησιμοποιούνταν για τους υπολογισμούς του ποσοστού εκρίζωσης βιοϋμένων.

Χρώση βιοϋμένων

Η χρώση των βιοϋμένων γίνεται με την ίδια διαδικασία όπως και στο πείραμα της αναστολής σχηματισμού βιοϋμένων. Η μόνη διαφορά που υπάρχει αφορά τον θετικό

μάρτυρα. Ο θετικός μάρτυρας χρωματίζεται μετά την πρώτη επώαση 24 ωρών ώστε να μην συνεχίσει ο σχηματισμός βιοϋμένων κατά την δεύτερη επώαση 24 ωρών.

Υπολογισμοί

Σε κάθε ανεξάρτητο πείραμα η ποσότητα βιοϋμένων που χρωματίστηκε στα πηγάδια θετικού μάρτυρα είναι η μέγιστη δυνατή. Αντίστοιχα στα πηγάδια των καλλιεργειών με το δείγμα μελισσόψωμου, η ποσότητα των βιοϋμένων είναι μικρότερη. Από τη διαφορά των απορροφήσεων αυτών των πηγαδίων υπολογίζεται η αναστολή σχηματισμού και η εκρίζωση σχηματισμένων βιοϋμένων, ως ποσοστό της απορρόφησης του θετικού μάρτυρα. Ως απορρόφηση μιας συγκέντρωσης θεωρείται ο μέσος όρος των απορροφήσεων στα τρία πηγάδια με το δείγμα μελισσόψωμου της ίδιας συγκέντρωσης. Από αυτό τον μέσο όρο αφαιρούνται οι τιμές απορρόφησης του αρνητικού μάρτυρα με μελισσόψωμο. Έπειτα γίνεται κανονικοποίηση των δεδομένων απορρόφησης διαιρώντας τα δεδομένα της φωτομέτρησης 570 nm με τα δεδομένα από τη φωτομέτρηση 600 nm. Επίσης διαιρείται και ο μέσος όρος των απορροφήσεων του θετικού μάρτυρα στα 570 nm με τον αντίστοιχο μέσο όρο στα 600 nm. Οι λόγοι των απορροφήσεων από τα πηγάδια με δείγματα μελισσόψωμου αφαιρούνται από τον λόγο των απορροφήσεων του θετικού μάρτυρα. Τελικά η διαφορά διαιρείται από τον θετικό μάρτυρα επί τοις 100.

Η μαθηματική εξίσωση του υπολογισμού αναστολής σχηματισμού βιοϋμένων και εκρίζωσης βιοϋμένων είναι η εξής:

$$\text{Αναστολή} = \frac{\frac{\bar{A}_{\text{control } 570}}{\bar{A}_{\text{control } 600}} - \frac{\bar{A}_{570}}{\bar{A}_{600}}}{\frac{\bar{A}_{\text{control } 570}}{\bar{A}_{\text{control } 600}}} \times 100 \%$$

Όπου:

$\bar{A}_{\text{control } 570}$: μέσος όρος κανονικοποιημένης απορρόφησης θετικού μάρτυρα στα 570 nm

$\bar{A}_{\text{control } 600}$: μέσος όρος κανονικοποιημένης απορρόφησης θετικού μάρτυρα στα 600 nm

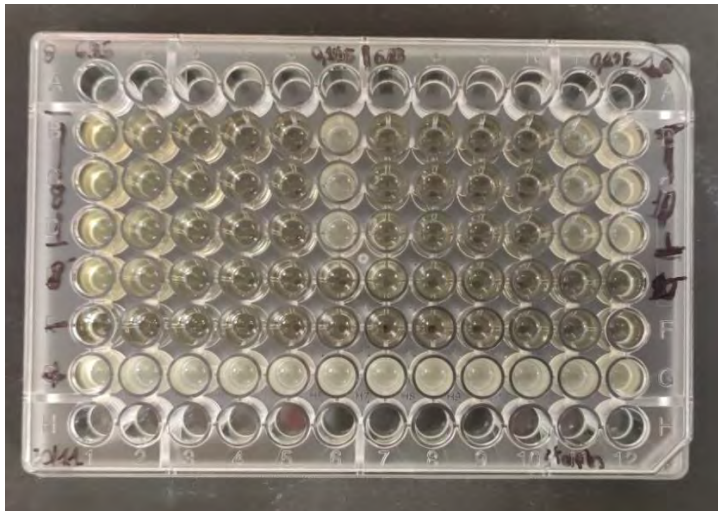
$\bar{A}_{570}$: μέσος όρος κανονικοποιημένης απορρόφησης δείγματος μελισσόψωμου στα 570 nm

$\bar{A}_{600}$: μέσος όρος κανονικοποιημένης απορρόφησης δείγματος μελισσόψωμου στα 600 nm

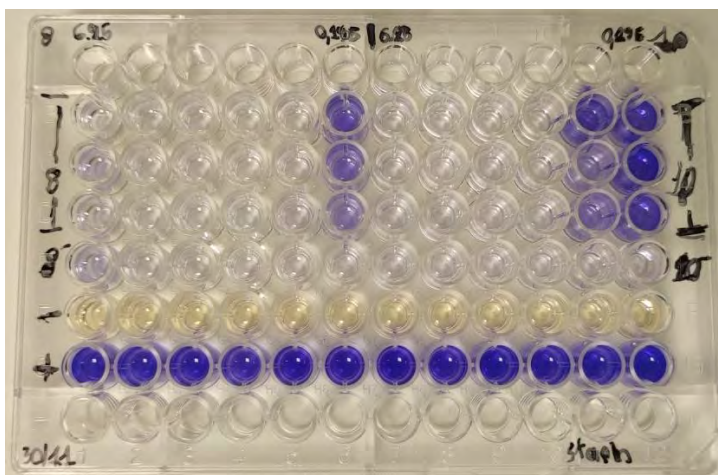
Υπολογίστηκε επίσης η τυπική απόκλιση για τα αποτελέσματα.

4 Αποτελέσματα και συζήτηση

4.1 Αποτελέσματα



Εικόνα 4. Παράδειγμα μικροπλάκας από πείραμα αναστολής σχηματισμού βιοϋμένων μετά από 24 ώρες επώασης. Απεικονίζονται καλλιέργειες *S. aureus* υπό την παρουσία των δειγμάτων μελισσόψωμου με κωδικούς 8 και 10. Οι συγκεντρώσεις μελισσόψωμου ξεκινούν από 6,25% v/v και υποδιπλασιάζονται διαδοχικά έως 0,195% v/v.



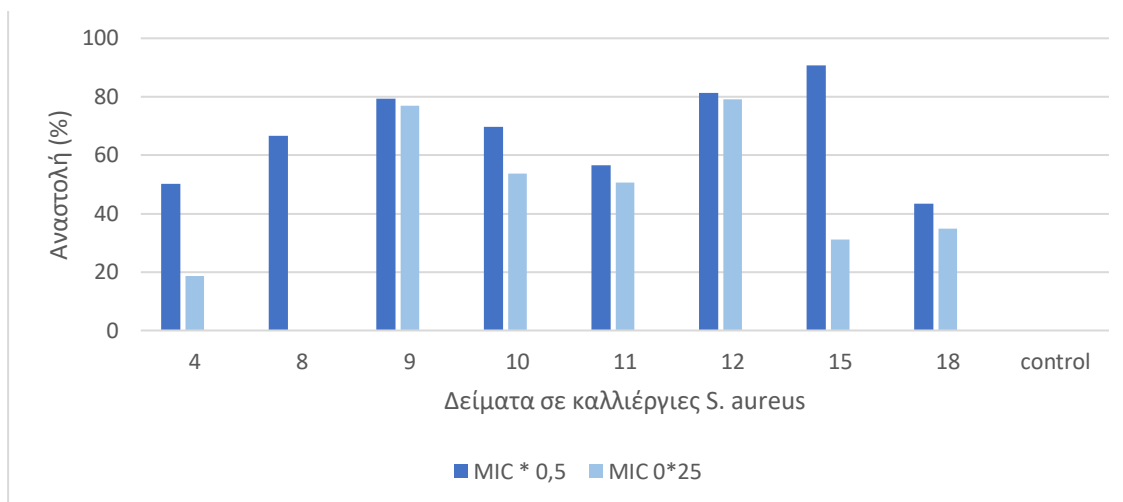
Εικόνα 5. Παράδειγμα μικροπλάκας από πείραμα αναστολής σχηματισμού βιοϋμένων μετά από χρώση με crystal violet. Απεικονίζονται χρωματισμένοι βιοϋμένες *S. aureus* υπό την παρουσία των δειγμάτων μελισσόψωμου με κωδικούς 8 και 10. Παρατηρείται έντονη χρώση και επομένως σχηματισμός βιοϋμένων σε πηγάδια με μικρές συγκεντρώσεις μελισσόψωμου.

Έπειτα από την εφαρμογή των υπολογισμών για όλα τα δείγματα στα πειράματα αναστολής σχηματισμού βιοϋμένων, τα αποτελέσματα οργανώθηκαν σε πίνακες (Πίνακες 2 και 3, Εικόνες 5 και 6) ανάλογα με το βακτήριο που χρησιμοποιήθηκε. Στους πίνακες αναφέρονται και οι τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) για το κάθε δείγμα. Ως πρώτη παρατήρηση φαίνεται, πως όλα τα δείγματα μελισσόψωμου εκδηλώνουν σημαντική ικανότητα αναστολής του σχηματισμού βιοϋμένων.

Πίνακας 2. Ποσοστό αναστολής σχηματισμού βιοϋμένα σε καλλιέργειες *Staphylococcus aureus* ανά δείγμα μελισσόψωμου. 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

Στα πειράματα με καλλιέργειες *Staphylococcus aureus* ο σχηματισμός βιοϋμένων είχε μείωση, που κυμαινόταν σε ποσοστά από 43,4 % έως 90,8 % ± 2,28 %. Η ασθενέστερη αναστολή παρατηρείται στο δείγμα 18, το οποίο είναι μονοανθικό με προέλευση από γύρη Fagaceae (καστανιά). Την ισχυρότερη επίδραση είχε το πολυανθικό δείγμα 15, το οποίο διαθέτει σημαντικά ποσοστά γύρης των οικογενειών Boraginaceae και Verbenaceae καθώς και ένα μικρότερο ποσοστό Lamiales (χειλανθή). Τα δείγματα 9 και 12 έχουν επίσης υψηλά ποσοστά αναστολής, και αντιθέτως με τα υπόλοιπα δείγματα διατηρούν εξίσου υψηλά ποσοστά και στη μικρότερη συγκέντρωση MIC × 0,25 (περισσότερο από 75%). Τα δείγματα 9 και 12 μοιράζονται σημαντικό ποσοστό προέλευσης από την οικογένεια Cistaceae (λαδανιά). Όλα τα δείγματα παρουσιάζουν παρατηρήσιμη δραστηριότητα και σε μικρές συγκεντρώσεις μελισσόψωμου.



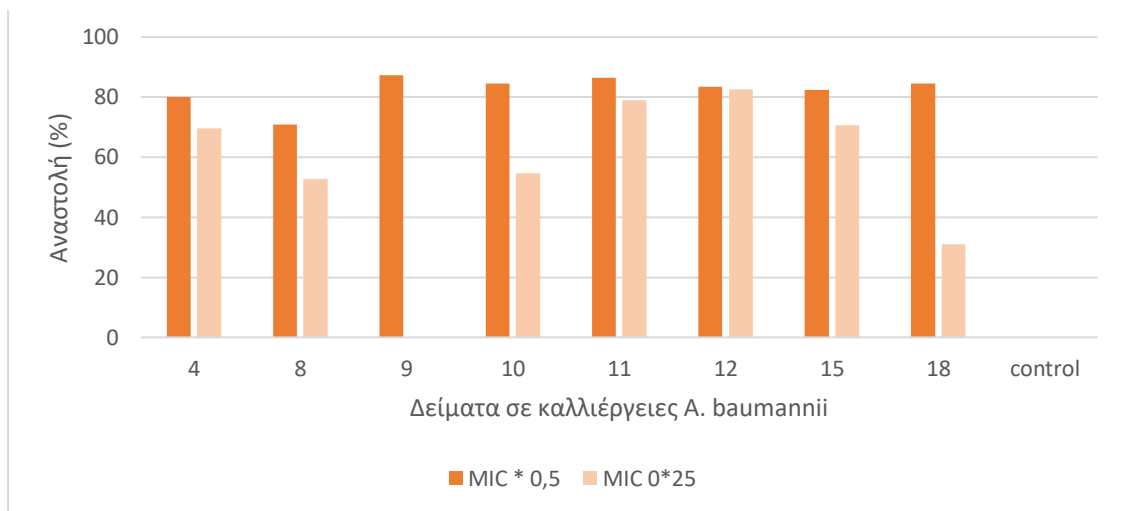
Εικόνα 6. Γράφημα που απεικονίζει τα % ποσοστά αναστολής σχηματισμού βιοϋμένων σε καλλιέργειες *Staphylococcus aureus*. Η αναστολή του θετικού μάρτυρα θεωρείται μηδενική.

Στα πειράματα με καλλιέργειες *Acinetobacter baumannii* το φαινόμενο της αναστολής ανάπτυξης βιοϋμένων ήταν ισχυρότερο με όλα τα δείγματα να έχουν ποσοστά της τάξεως του 70,8 % - 87,3 %. Το ασθενέστερο δείγμα είναι το δείγμα 8 το οποίο αποτελείται κατά πλειοψηφία από γύρη της οικογένειας Brassicaceae (μουστάρδα). Το ισχυρότερο δείγμα είναι το 9 στο οποίο όμως δεν έγινε πείραμα σε μικρότερη συγκέντρωση. Όπως και στο *Staphylococcus aureus* το δείγμα 12 παρουσιάζει το φαινόμενο της διατήρησης υψηλού ποσοστού αναστολής σε μικρότερη συγκέντρωση (MIC $\times$ 0,25).

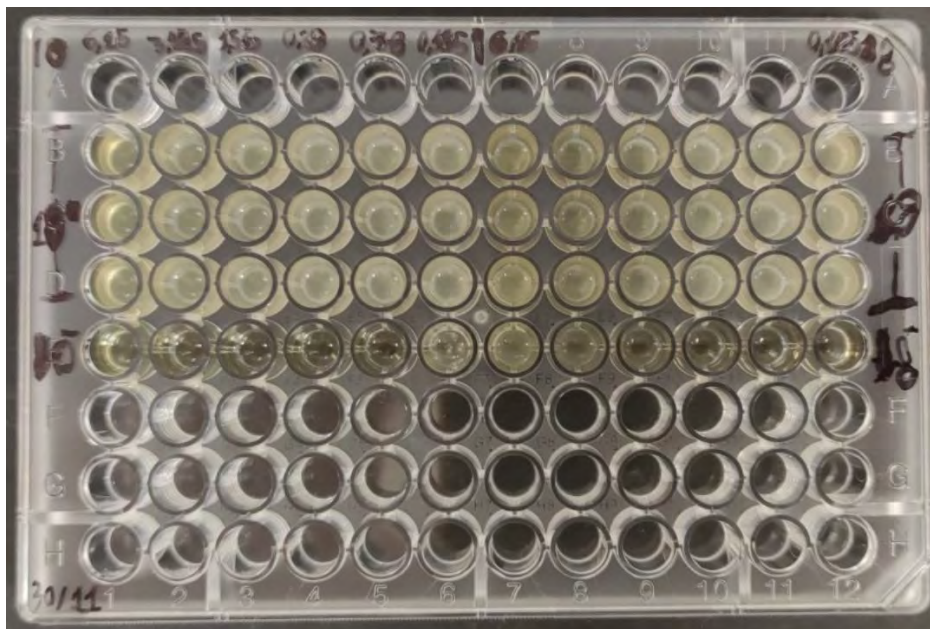
Πίνακας 3. Ποσοστό αναστολής σχηματισμού βιοϋμένα σε καλλιέργειες *Acinetobacter baumannii* ανά δείγμα μελισσόψωμου. Η αναστολή υπολογίστηκε σε συγκεντρώσεις ίσες με το μισό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) και το ένα τέταρτο της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) των δειγμάτων

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 $\pm$ 18,55	0,0975%	69,7 $\pm$ 10,18
8	0,39%	0,195%	70,8 $\pm$ 2,35	0,0975%	52,8 $\pm$ 4,32
9	0,39%	0,195%	87,3 $\pm$ 5,16	0,0975%	-
10	1,56%	0,78%	84,5 $\pm$ 2,53	0,39%	54,6 $\pm$ 20,95
11	3,125%	1,56%	86,5 $\pm$ 3,98	0,78%	79 $\pm$ 8,66

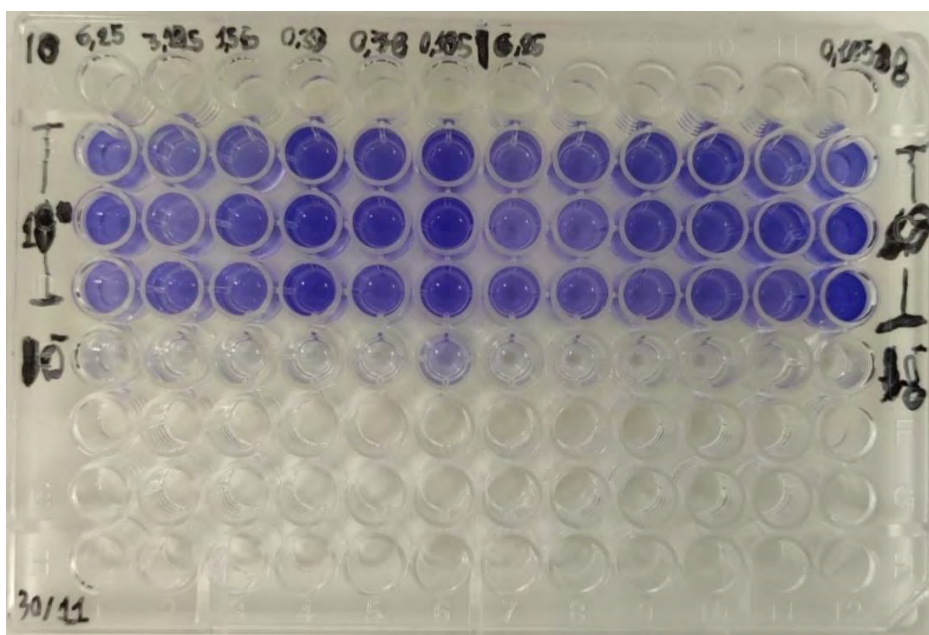
12	1,56%	0,78%	83,5 ± 4,51	0,39%	82,6 ± 2,01
15	0,78%	0,39%	82,5 ± 6,05	0,195%	70,6 ± 5,4
18	0,78%	0,39%	84,5 ± 7,1	0,195%	31 ± 10,06



Εικόνα 7. Γράφημα που απεικονίζει τα % ποσοστά αναστολής σχηματισμού βιοϋμένων σε καλλιέργειες *Acinetobacter baumannii*. Η αναστολή του θετικού μάρτυρα θεωρείται μηδενική.



Εικόνα 8. Παράδειγμα μικροπλάκας από πείραμα εκκρίωσης σχηματισμένων βιοϋμένων μετά από την δεύτερη επώαση 24 ωρών. Απεικονίζονται βιοϋμένες *S. aureus* υπό την επίδραση των δειγμάτων μελισσόψωμου με κωδικούς 8 και 10. Στην συγκεκριμένη μικροπλάκα προστέθηκε στην τέταρτη σειρά αποκλειστικά διάλυμα μελισσόψωμου.



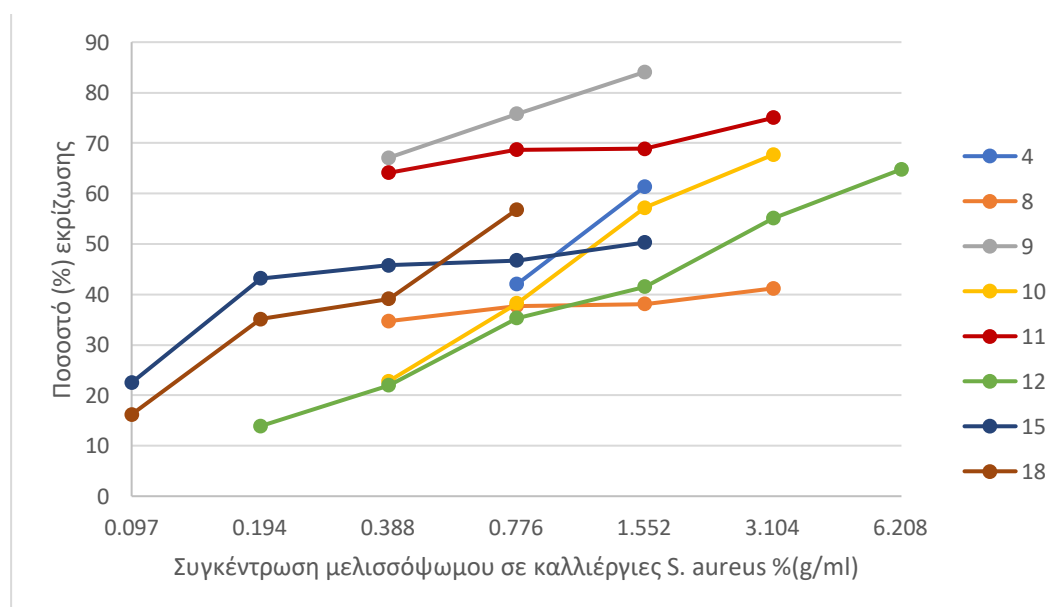
Εικόνα 9. Παράδειγμα μικροπλάκας από πείραμα εκρίζωσης σχηματισμένων βιοϋμένων μετά από χρώση με crystal violet. Απεικονίζονται χρωματισμένοι βιοϋμένες *S. aureus* μετά από την επίδραση των δειγμάτων μελισσόψωμου με κωδικούς 8 και 10. Παρατηρείται ηπιότερη χρώση και επομένως εκρίζωση βιοϋμένων σε πηγάδια με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μελισσόψωμου.

Τα αποτελέσματα των υπολογισμών της εκρίζωσης βιοϋμένων συγκεντρώνονται σε πίνακες (Πίνακες 4 και 5) και απεικονίζονται σε γραφήματα (Εικόνες 7 και 8). Τα ποσοστά εκρίζωσης βιοϋμένων είναι μικρότερα από τα αντίστοιχα ποσοστά στο πείραμα αναστολής ανάπτυξης βιοϋμένων. Όμως, σε περιπτώσεις μεγαλύτερης συγκέντρωσης μελισσόψωμου παρατηρείται εκρίζωση σε σημαντικό βαθμό για κάθε δείγμα.

Η επίδραση του μελισσόψωμου σε σχηματισμένους βιοϋμένες είναι ισχυρότερη στις καλλιέργειες *S. aureus*. Η καλύτερη επίδοση παρατηρείται στα δείγματα 9 και 11. Το δείγμα 9 με μέγιστο ποσοστό εκρίζωσης $84,1\% \pm 6,25\%$ σε συγκέντρωση διπλάσια της MIC ($1,56\% \text{ g/ml}$), ενώ στη συγκέντρωση MIC ($0,78\% \text{ g/ml}$) η εκρίζωση η εκρίζωση υπολογίστηκε στο $75,8\% \pm 7,45\%$ και στη μισή της MIC $67,1\% \pm 24,19\%$. Το δείγμα 11 είχε μέγιστο ποσοστό εκρίζωσης $75,0\% \pm 3,32\%$ στη διπλάσια συγκέντρωση της MIC ($3,125\% \text{ g/ml}$) και διατηρημένα υψηλά ποσοστά σε τρεις μικρότερες συγκεντρώσεις ($68,9\% - 64,1\%$). Το δείγμα 8 με προέλευση κυρίως από την οικογένεια Brassicaceae παρήγαγε τα πιο χαμηλά αποτελέσματα, με εκρίζωση $41,2\% \pm 8,87\%$ σε συγκέντρωση οκτώ φορές μεγαλύτερη τις MIC ($3,125\% \text{ g/ml}$).

Πίνακας 4. Ποσοστό εκρίζωσης (%) βιοϋμένα σε καλλιέργεια *S. aureus* που προκαλείται από διαφορετικές συγκεντρώσεις μελισσόψωμου .

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

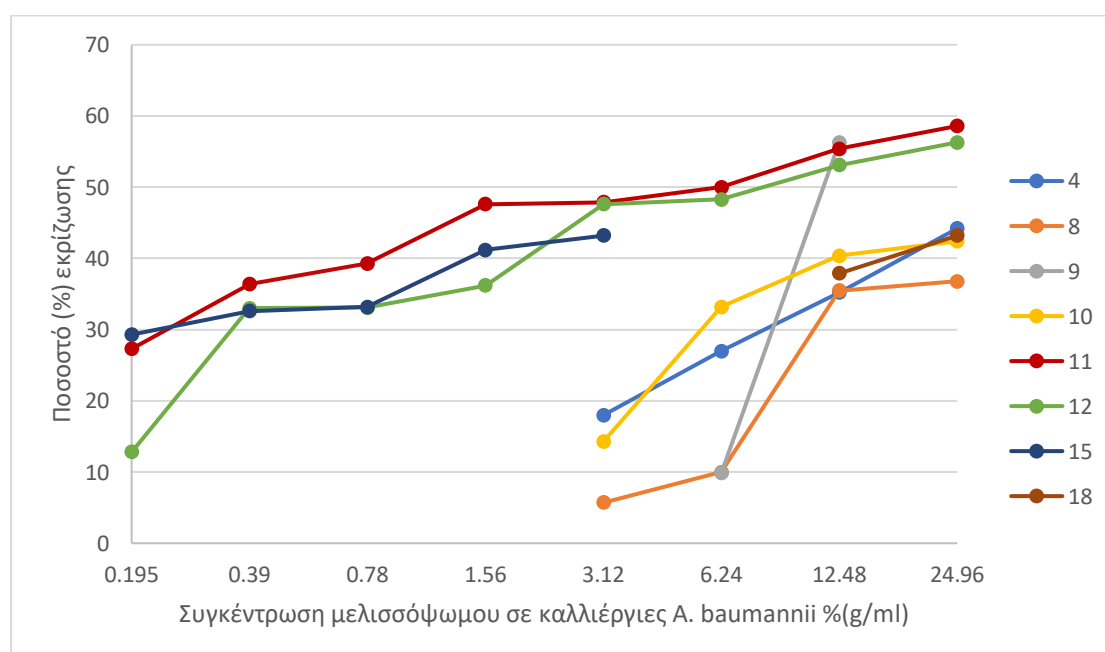


Εικόνα 10. Γράφημα εκρίζωσης βιοφίλμ ως ποσοστό (%) σε καλλιέργειες *S. aureus*, σε σχέση με τη συγκέντρωση των δειγμάτων μελισσόψωμου %(g/ml).

Στις καλλιέργειες *Acinetobacter baumannii* η εκρίζωση βιοϋμένων ήταν αρκετά μικρότερη. Σε ορισμένες μεγαλύτερες συγκεντρώσεις υπήρχαν ποσοστά εκρίζωσης, τα οποία δεν ήταν αμελητέα. Σε αυτά τα πειράματα τα δείγματα με την εντονότερη ικανότητα εκρίζωσης βιοϋμένων είναι 11, 12 και 15. Στα τρία δείγματα η εκρίζωση κυμαίνεται από 30 % έως 50 % στις συγκεντρώσεις MIC των δειγμάτων και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τα ποσοστά έφταναν στο 40 % έως 60 %. Το δείγμα 8 είχε και σε αυτή την περίπτωση την χαμηλότερη επίδοση. Σε συγκέντρωση 25 % w/v (64 φορές μεγαλύτερη από την MIC) επιτεύχθηκε 36,8 % μείωση βιοϋμένων από την επίδραση του μελισσόψωμου.

Πίνακας 5. Ποσοστό εκρίζωσης βιοϋμένα (%) σε καλλιέργεια *A. baumannii* που προκαλείται από διαφορετικές συγκεντρώσεις μελισσόψωμου

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	-	-	-	-	-	-



Εικόνα 11. Γράφημα εκρίζωσης βιοφίλμ ως ποσοστό (%) σε καλλιέργειες *A. baumannii*, σε σχέση με τη συγκέντρωση των δειγμάτων μελισσόψωμου %(g/ml).

4.2 Συζήτηση

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων γίνεται αντιληπτό ότι η δράση των δειγμάτων μελισσόψωμου είναι ισχυρή κατά του σχηματισμού βιοϋμένων και παρατηρήσιμη στην εκκρίωση των σχηματισμένων βιοϋμένων από τις επιφάνειες ανάπτυξής τους. Σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις τα δείγματα μελισσόψωμου ήταν ικανά να σταματήσουν τον σχηματισμό των βιοϋμένων στις περισσότερες περιπτώσεις. Από την άλλη πλευρά οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν τους βιοϋμένες μίας καλλιέργειας. Για να αξιολογηθεί η δράση των δειγμάτων μελισσόψωμου καλύτερα αξίζει, ίσως να τεθεί μια σύγκριση με άλλες μελέτες μελισσοκομικών προϊόντων. Η σύγκριση αυτή ενέχει μία δυσκολία, καθώς πολλές φορές τα δείγματα μελισσοκομικών προϊόντων δείχνουν αποτελέσματα δραστηριότητας κατά των βιοϋμένων με μεγάλες διακυμάνσεις. Αυτό συμβαίνει λόγω της πολύπλοκης σύνθεσης των περισσότερων μελισσοκομικών προϊόντων, που σημαίνει ότι δείγματα μελισσόψωμου ή μελιού μπορούν να διαφέρουν μεταξύ τους στα επίπεδα των διαφόρων αντιμικροβιακών παραγόντων στα συστατικά τους.

Το μελισσόψωμο ως θέμα έρευνας είναι σχετικά πρόσφατο και επομένως δεν υπάρχει μεγάλος όγκος δημοσιεύσεων σχετικά με τις αντιβακτηριακές του ιδιότητες. Ειδικά για τις ιδιότητές του κατά των βιοϋμένων αυτή η μελέτη είναι η πρώτη, οπότε δεν γίνεται τα δείγματα μας να συγκριθούν με δείγματα μελισσόψωμου κάποιας δημοσιευμένης μελέτης.

Το κύριο προϊόν των μελισσών που χρησιμοποιείται σε μελέτες είναι το μέλι, το οποίο είναι γνωστό για τις αντιμικροβιακές του ικανότητες και χρησιμοποιείται σε ορισμένες περιπτώσεις ως ιατρικό μέλι για την απολύμανση πληγών και εγκαυμάτων. Το μέλι Manuka είναι το πιο γνωστό και αποτελεσματικό ιατρικό μέλι και έχει ιδιότητες κατά του βιοφίλμ, κυρίως λόγω της παρουσίας υπεροξειδίου του υδρογόνου, μεθυλγλυοξάλης και defensin-1. Αυτά τα συστατικά προσδίδουν στο μέλι τη δυνατότητα να διεισδύει στις πλάκες βιοφίλμ και να σκοτώνει τα βακτήρια μέσα σε αυτές.

Έχουν δοκιμαστεί πολλά μέλια από όλο τον πλανήτη και έχει διαπιστωθεί η ικανότητά τους να αναστέλλουν το σχηματισμό βιοϋμένων με ποικίλους βαθμούς αποτελεσματικότητας. Σε μελέτη με τέσσερα διαφορετικά μέλια τύπου manuka της Νέας Ζηλανδίας (Lu et al. 2014) σε *S. aureus* παρατηρήθηκαν ποσοστά περίπου 50 % - 80 %, που είναι ανάλογα με αυτά του μελισσόψωμου, σε συγκέντρωση μελιού 4 % w/v και ακόμη σε μικρότερες. Μελέτη με τα ίδια μέλια σε *P. aeruginosa* (Lu et al. 2019) έδειξε ισχυρή δράση έναντι του σχηματισμού βιοϋμένων, όμως σε

συγκεντρώσεις μικρότερες του 4% w/v κανένα δείγμα δεν παρουσίασε ποσοστό αναστολής βιοϋμένων μεγαλύτερο του 50 %. Σε μία μελέτη με τέσσερα μέλια από τρεις διαφορετικές χώρες και ηπείρους σε διάφορα παθογόνα μαζί με *S. aureus* (Gianluca Morroni et al., 2018) δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις μελιού 2 % - 22 % w/v. Τις περισσότερες φορές τα μέλια έδειξαν παρατηρήσιμη αναστολή σχηματισμού βιοϋμένων και εκκρίωση προϋπάρχοντων βιοϋμένων σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες ή ίσες του 8 %. Εξαίρεση ήταν ένα μέλι από *M. beecheii* από την Κούβα, το οποίο εμφάνιζε δραστηριότητα από συγκέντρωση 2% w/v και μάλιστα σε αυτή τη συγκέντρωση τρία παθογόνα *S. epidermis*, *S. pyogenes*, *S. gordonii* εμφάνισε ποσοστό καταστροφής υπαρχόντων βιοϋμένων 70 %. Επίσης το δείγμα *manuka* της Νέας Ζηλανδίας σε συγκεντρώσεις 2 % - 6 % είχε το μεγαλύτερο ποσοστό αναστολής σχηματισμού βιοϋμένων στο παθογόνο *S. aureus*. Σε μελέτη μελιών από την Ιορδανία (Al-Kafaween et al., 2022) βρέθηκαν χαμηλά ποσοστά αναστολή ακόμη και σε πυκνές συγκεντρώσεις 10 % w/v. Σε άλλη μελέτη με *S. aureus* ανθεκτικό στη μεθικυλλίνη (Viktória L. Balázs et al., 2023) δύο μέλια φλαμουριάς και καστανιάς είχαν ποσοστά αναστολή βιοϋμένων ανάλογα με το μελισσόψωμο, δηλαδή 63,2 % και 66,9 % αντίστοιχα σε συγκέντρωση ½ MIC. Σε μελέτη μελιών Εκουαδόρ σε συγκέντρωση 15 % v/v με *S. aureus* υπήρξε σε δύο δείγματα αναστολή βιοϋμένων περίπου 74 % - 77 % και μηδενική εκκρίωση βιοϋμένων. Σε ακόμη μία μελέτη με μέλι από ελαιοκράμβη με επιπρόσθετο 4% ιπποφαές ή μαύρο βατόμουρο, το δείγμα με ιπποφαές έδειξε μεγάλη αναστολή σχηματισμού βιοϋμένων. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ποσοστό πάνω από 50 % σε συγκέντρωση 2 % mg/mL (Michał Miłek et al., 2023). Ένα σημαντικό μειονέκτημα του μελιού είναι ότι σε συγκεντρώσεις μικρότερες από ανασταλτικές μπορεί να ενισχύσει τον σχηματισμό βιοφίλμ. (Majtan et al., 2021)

Ένα άλλο προϊόν των μελισσών γνωστό για την αντιμικροβιακή του ικανότητα είναι η πρόπολη και έχει υπάρξει κάποια έρευνα για τα χαρακτηριστικά της κατά του βιοφίλμ. (Ratajczak et al., 2021) Έχουν δοκιμαστεί εκχυλίσματα πρόπολης σε βακτήρια Gram-θετικά και Gram-αρνητικά. Σχετικά με το σχηματισμό βιοϋμένων, έχει διαπιστωθεί ότι τα εκχυλίσματα πρόπολης μπορούν να εμποδίσουν την κόλληση των κυττάρων στις επιφάνειες. Σε μία μελέτη τα εκχυλίσματα πρόπολης είχαν εξίσου μεγάλα ποσοστά αναστολής με το μελισσόψωμο κατά μέσο όρο 71 %, ενώ στην εκκρίωση βιοϋμένων τα ποσοστά ήταν μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα του μελισσόψωμου με μέσο όρο 88,5 % (Queiroga et al., 2023). Ωστόσο τα εκχυλίσματα πρόπολης συνήθως είναι διαλύματα αιθανόλης και άλλων οργανικών διαλυτών. Οι οργανικοί διαλύτες είναι πιο δραστικοί από το νερό και μπορεί να επηρεάζουν τον βαθμό στον οποίο παρατηρείται δράση κατά των βιοϋμένων.

Έχει δοκιμαστεί επίσης το δηλητήριο των μελισσών και έχει βρεθεί αποτελεσματικό κατά βακτηριδίων, μυκήτων και των βιοϋμένων τους, λόγω της περιεκτικότητάς του στο αντιμικροβιακό πεπτίδιο μελιτίνη, καθώς και ορισμένων αντιμυκητιακών πεπτιδίων. Σε μια πρόσφατη μελέτη υπολογίστηκαν ποσοστά αναστολής ανάλογα με του μελισσόψωμου (40 % - 60 % σε συγκέντρωση ½ MIC), σε διαφορετικά παθογόνα από την παρούσα μελέτη. (El-Didamony et al., 2022) Τέλος, ο βασιλικός πολτός

μπορεί να εμποδίσει την κόλληση των κυττάρων σε επιφάνειες, ενδεχομένως προλαμβάνοντας έτσι τον σχηματισμό βιοϋμένων, αν και αυτό παρατηρήθηκε σε αρκετά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (5 % - 25 %) σε σχέση με τα ελληνικά δείγματα μελισσόψωμου. (Susilowati et al., 2017)

Από τις συγκρίσεις του μελισσόψωμου με άλλα μελισσοκομικά προϊόντα μπορεί να βγει το συμπέρασμα ότι το μελισσόψωμο είναι ένα εξαιρετικά βιοδραστικό προϊόν με τη δυνατότητα να δρα σημαντικά κατά των βιοϋμένων, ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Αυτή η ιδιότητα αποδίδεται στα συστατικά του μελισσόψωμου. Ιδιαίτερα συστατικά όπως οι πολυφαινόλες, τα φλαβονοειδή (π.χ. βαλανοκετόνη, καμπφερόλη), οργανικά οξέα καθώς και κάποια ένζυμα από τους αδένες των μελισσών ή το νέκταρ των ανθών.

Φαίνεται, επίσης ότι τα δείγματα μελισσόψωμου επιδρούν περισσότερο κατά του σχηματισμού βιοϋμένων του *Acinetobacter baumannii*, ενώ για την εκκρίωση βιοϋμένων το μελισσόψωμο είναι πιο δραστικό σε βιοϋμένες *Staphylococcus aureus*. Αυτή η παρατήρηση ίσως υποδηλώνει κάποιο διαφορετικό μηχανισμό δράσης για τα δύο πειράματα. Είναι γνωστό ότι τα θετικά κατά Gram βακτήρια είναι κατά κανόνα πιο ευάλωτα στο μελισσόψωμο από τα αρνητικά κατά Gram. Ίσως στο πείραμα της εκκρίωσης να υπάρχει μεγαλύτερο ποσοστό εκκρίωσης στο θετικό κατά Gram *S. aureus* επειδή ο μηχανισμός της εκκρίωσης βιοϋμένων από το μελισσόψωμο συμπεριλαμβάνει τη θανάτωση μικροβιακών κυττάρων, ενώ στην αναστολή της ανάπτυξης βιοϋμένων δεν έχει τόσο σημαντικό ρόλο. Από την άλλη πλευρά η αναστολή του σχηματισμού βιοϋμένων μπορεί να προέρχεται από την παρεμβολή των δραστικών μορίων στην έκφραση γονιδίων των βακτηρίων και την παραγωγή πρωτεϊνών. Ο σχηματισμός βιοϋμένων είναι μια περίπλοκη διαδικασία, η οποία ρυθμίζεται από την αίσθηση μεγέθους πληθυσμού της αποικίας, η οποία με τη σειρά της ρυθμίζεται από πολλά ρυθμιστικά μονοπάτια των βακτηρίων. Επομένως τα φλαβονοειδή και οι πολυφαινόλες του μελισσόψωμου μπορεί να είναι σε θέση να διαταράξουν τη βιοσύνθεση της εξωπολυσακχαρικής μήτρας ή την σηματοδότηση, που οδηγεί στη διάσπαση και διασπορά του βιοϋμένα. Στο μέλλον αξίζει να προσδιορισθούν καλύτερα οι μηχανισμοί προσβολής των βακτηριακών βιοϋμένων *Staphylococcus aureus* και *Acinetobacter baumannii* από το μελισσόψωμο.

Αυτή η μελέτη είναι η πρώτη η οποία ανέδειξε τον ρόλο του μελισσόψωμου κατά των βακτηριακών βιοϋμένων. Επομένως, στο μέλλον αξίζει να μελετηθεί περαιτέρω το μελισσόψωμο για τις ιδιότητες του έναντι βιοϋμένων. Θα πρέπει να δοκιμαστούν περισσότερα δείγματα μελισσόψωμου διαφορετικών προελεύσεων, περισσότερα παθογόνα και ίσως συνέργεια με άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Επίσης αξίζει να μελετηθούν περισσότερα μονοανθικά δείγματα μελισσόψωμου, ώστε να μπορεί εύκολα να συσχετιστεί η βοτανική προέλευση με την ικανότητα καταπολέμησης βιοϋμένων. Εναλλακτικά θα μπορούσε να μελετηθεί περισσότερο η σύσταση των μελισσόψωμων ώστε να απομονωθούν τα συστατικά τους και να ελεγχθούν για τη αντιβακτηριακή ικανότητα. Ακόμη θα έχει επιστημονικό

ενδιαφέρον η εξέλιξη των πρωτοκόλλων παραγωγής τεχνητού μελισσόψωμου σε εργαστήριο. Με αυτή την προϋπόθεση θα ήταν πιθανή η ανάπτυξη σκευασμάτων από τα πιο δραστικά συστατικά του μελισσόψωμου ή συμπληρωμάτων διατροφής μελισσόψωμου, τα οποία θα μπορούν να βοηθούν στην καταπολέμηση φλεγμονών, την επούλωση χρόνιων πληγών ή ακόμη και την απολύμανση επιφανειών σε ιατρικό εξοπλισμό για την πρόληψη σχηματισμού βιοϋμένων.

5 Βιβλιογραφία

1. Carrascosa, Conrado, Dele Raheem, Fernando Ramos, Ariana Saraiva, and António Raposo. 2021. "Microbial Biofilms in the Food Industry—A Comprehensive Review" *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18, no. 4: 2014.
2. Bowler, P., Murphy, C. & Wolcott, R. 2020. Biofilm exacerbates antibiotic resistance: Is this a current oversight in antimicrobial stewardship?. *Antimicrob Resist Infect Control* 9: 162.
3. Didaras Nikos Asoutis, Katerina Karatasou, Tilemachos G Dimitriou, Grigoris D. Amoutzias, and Dimitris Mossialos. 2020. "Antimicrobial Activity of Bee-Collected Pollen and Beebread: State of the Art and Future Perspectives" *Antibiotics* 9, no. 11: 811
4. Martha Gilliam. (October 1997). Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 155, Issue 1, Pages 1–10
5. 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* (Basel, Switzerland), 10(5): 555.
6. Mohammad, S. M., Mahmud-Ab-Rashid, N. K., & Zawawi, N. (2021). Stingless Bee-Collected Pollen (Bee Bread): Chemical and Microbiology Properties and Health Benefits. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(4), 957.
7. Mărgăoan, R., Stranț, M., Varadi, A., Topal, E., Yücel, B., Cornea-Cipcigan, M., Campos, M. G., & Vodnar, D. C. (2019). Bee Collected Pollen and Bee Bread: Bioactive Constituents and Health Benefits. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 8(12), 568.
8. Bakour, M., Laaroussi, H., Ousaaïd, D., El Ghouzi, A., Es-Safi, I., Mechchate, H., & Lyoussi, B. (2022). Bee Bread as a Promising Source of Bioactive Molecules and Functional Properties: An Up-To-Date Review. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 11(2), 203.
9. Kaplan, M., Karaoglu, Ö., Eroglu, N., & Silici, S. (2016). Fatty Acid and Proximate Composition of Bee Bread. *Food technology and biotechnology*, 54(4), 497–504.
10. Omar, A., Wright, J. B., Schultz, G., Burrell, R., & Nadworny, P. 2017. Microbial Biofilms and Chronic Wounds. *Microorganisms*, 5(1): 9
11. Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., & Kamil, M. A. 2018. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association: JCMA*, 81(1): 7–11

- 12. Gloag, E. S., Fabbri, S., Wozniak, D. J., & Stoodley, P.** 2019. Biofilm mechanics: Implications in infection and survival. *Biofilm*, 2: 100017.
- 13. Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P.** (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews. Microbiology*, 2(2), 95–108.
- 14. Baselga, R., Albizu, I., & Amorena, B.** 1994. Staphylococcus aureus capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. *Veterinary microbiology*, 39(3-4): 195–204.
- 15. Donlan, R. M., & Costerton, J. W.** (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2): 167–193.
- 16. Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O.** 2015. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future medicinal chemistry*, 7(4): 493–512.
- 17. Colquhoun, J. M., & Rather, P. N.** (2020). Insights Into Mechanisms of Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii* and Implications for Uropathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 253.
- 18. Singh, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., & Singh, R.** 2017. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *The open microbiology journal*, 11: 53–62.
- 19. Lee, A. S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., & Harbarth, S.** (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature reviews. Disease primers*, 4, 18033.
- 20. Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G., Jr** (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*, 28(3), 603–661.
- 21. Ibrahim, S., Al-Saryi, N., Al-Kadmy, I. M. S., & Aziz, S. N.** (2021). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. *Molecular biology reports*, 48(10), 6987–6998.
- 22. Stepanović, S., Vuković, D., Hla, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Cirković, I., & Ruzicka, F.** (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 115(8), 891–899.
- 23. Ratajczak Magdalena, Dorota Kaminska, Eliza Matuszewska, Elżbieta Hołderna-Kedzia, Jarosław Rogacki, and Jan Matysiak.** 2021. "Promising Antimicrobial Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products" *Molecules* 26, no. 13: 4007.
- 24. Lu, J., Turnbull, L., Burke, C. M., Liu, M., Carter, D. A., Schlothauer, R. C., Whitchurch, C. B., & Harry, E. J.** 2014. Manuka-type honeys can eradicate biofilms produced by *Staphylococcus aureus* strains with different biofilm-forming abilities. *PeerJ*, 2: e326

25. Lu, J., Cokcetin, N.N., Burke, C.M. et al. 2019. Honey can inhibit and eliminate biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep* 9: 18160
26. Morroni, G., Alvarez-Suarez, J. M., Brenciani, A., Simoni, S., Fioriti, S., Pugnali, A., Giampieri, F., Mazzoni, L., Gasparrini, M., Marini, E., Mingoia, M., Battino, M., & Giovanetti, E. 2018. Comparison of the Antimicrobial Activities of Four Honeys From Three Countries (New Zealand, Cuba, and Kenya). *Frontiers in microbiology*, 9: 1378.
27. Al-Kafaween, M. A., Al-Groom, R. M., & Hilmi, A. B. M. 2023. Comparison of the antimicrobial and antivirulence activities of Sidr and Tualang honeys with Manuka honey against *Staphylococcus aureus*. *Iranian journal of microbiology*, 15(1): 89–101.
28. Balázs, Viktória L., Lilla Nagy-Radványi, Erika Bencsik-Kerekes, Regina Koloh, Dina Szabó, Béla Kocsis, Marianna Kocsis, and Ágnes Farkas. 2023. "Antibacterial and Antibiofilm Effect of Unifloral Honeys against Bacteria Isolated from Chronic Wound Infections" *Microorganisms* 11, no. 2: 509.
29. Miłek, Michał, Ewa Ciszkowicz, Ewelina Sidor, Joanna Hęclik, Katarzyna Lecka-Szlachta, and Małgorzata Dżugan. 2023. "The Antioxidant, Antibacterial and Anti-Biofilm Properties of Rapeseed Creamed Honey Enriched with Selected Plant Superfoods" *Antibiotics* 12, no. 2: 235.
30. Juraj Majtan, Marcela Bucekova, Ioannis Kafantaris, Piotr Szveda, Katherine Hammer, & Dimitris Mossialos. 2021. Honey antibacterial activity: A neglected aspect of honey quality assurance as functional food. *Trends in food science & technology*, 118: 870-886
31. Queiroga, Maria Cristina, Marta Laranjo, Nara Andrade, Mariana Marques, Ana Rodrigues Costa, and Célia Maria Antunes. 2023. "Antimicrobial, Antibiofilm and Toxicological Assessment of Propolis" *Antibiotics* 12, no. 2: 347.
32. El-Didamony, S.E., Kalaba, M.H., El-Fakharany, E.M. et al. 2022. Antifungal and antibiofilm activities of bee venom loaded on chitosan nanoparticles: a novel approach for combating fungal human pathogens. *World J Microbiol Biotechnol* 38: 244.
33. Susilowati, H., Murakami, K., Yumoto, H., Amoh, T., Hirao, K., Hirota, K., Matsuo, T., & Miyake, Y. 2017. Royal Jelly Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* Adherence and Reduces Excessive Inflammatory Responses in Human Epithelial Cells. *BioMed research international*, 2017:3191752.