**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Εκτός όμως από τη βιοδραστικότητα, στόχος αυτής της διατριβής ήταν να διερευνήσει το μικροβίωμα του ΜΨ, από τα αρχικά στάδια της ζύμωσης της γύρης έως την ωρίμανσή του (ΓΜ από γυρεοπαγίδα, ΜΨ 1 ημέρας, 11 ημερών, 27 ημερών και 41 ημερών) και να εντοπίσει τις πιο σχετικά άφθονες, μικροβιακές ομάδες χρησιμοποιώντας τόσο μεταταξινομικές (Next Generation Sequencing, NGS) όσο και καλλιεργητικές μεθόδους. Ελάχιστες μελέτες υπάρχουν πάνω στο μικροβίωμα του ΜΨ παρά τις άφθονες ενδείξεις για τη βιοσυνθετική και αντιμικροβιακή του δράση.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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