

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



**«ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ
ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΜΕΛΙ ΜΕ
ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ»**



**Προπτυχιακή εργασία της φοιτήτριας
Κουτσού Ιωάννας**

ΛΑΡΙΣΑ 2012

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ
ΑΠΟ ΤΟ ΜΕΛΙ ΜΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ»

ΚΟΥΤΣΟΥ ΙΩΑΝΝΑ

Μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής :

Μόσιαλος Δημήτριος : Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μαρκουλάτος Παναγιώτης : Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Καρπούζας Δημήτριος : Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΛΑΡΙΣΑ 2012

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα επίκουρο καθηγητή κύριο Μόσιαλο Δημήτριο, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που με εμπιστεύτηκε και μου ανάθεσε την παρούσα προπτυχιακή εργασία, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την βοήθεια και την καθοδήγησή του, τις πολύτιμες συμβουλές του τόσο στην εκτέλεση του πειράματος όσο και στη σύνταξη της συγγραφής του.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, κύριο Μαρκουλάτο Παναγιώτη, καθηγητή του Π.Θ. και κύριο Καρπούζα Δημήτριο, επίκουρο Καθηγητή του Π.Θ.

Δεν θα μπορούσα να ξεχάσω το προσωπικό του εργαστηρίου ιολογίας και μικροβιολογίας, για την βοήθειά τους στην υλοποίηση του πειράματος και ιδιαίτερες ευχαριστίες στην Νικολούλη Κατερίνα, που δεν θα τα είχα καταφέρει χωρίς την πολύτιμη βοήθειά της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου τους γονείς μου αλλά και την αδερφή μου, για την αμέριστη ψυχολογική, ηθική και οικονομική τους στήριξη σε ολόκληρη την πορεία μου ως φοιτήτρια και θα ήθελα να τους αφιερώσω ολόψυχα αυτήν την εργασία.

Στην οικογένειά μου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μέλι, είναι η φυσική γλυκιά ουσία που παράγουν οι μέλισσες του είδους *Apis mellifera* από το νέκταρ των φυτών ή εκκρίσεις από ζωντανά μέρη των φυτών ή εκκρίματα εντόμων που οι μέλισσες συλλέγουν, μεταποιούν, εμπλουτίζουν με δικές τους ουσίες που συντελούν στη μετατροπή του, αποθέτουν, αφυδατώνουν, αποθηκεύουν και το φυλάσσουν στις κηρήθρες της κυψέλης προκειμένου να ωριμάσει.

Πρόκειται λοιπόν για ένα προϊόν της φύσης που δεν επιδέχεται καμία επεξεργασία και αποτελείται από τα παρακάτω συστατικά: νερό, φυσικά σάκχαρα, οργανικά οξέα, πρωτεΐνες, ιχνοστοιχεία, ένζυμα, βιταμίνες, αρωματικές και χρωστικές ουσίες καθώς και άλλες θρεπτικές ουσίες. Παίζει σπουδαίο ρόλο στο μεταβολισμό και στη θρέψη, στα συστατικά του σκελετού και των κυττάρων, ρυθμίζει την οξύτητα του στομάχου, έχει αντισηπτικές ιδιότητες, είναι τονωτικό, βοηθά στη γρηγορότερη αποκατάσταση της υγείας και έχει αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση (National Honey Board, 2010).

Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η ύπαρξη βακτηριακών στελεχών σε Ελληνικά μέλια και ποια από αυτά εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι των παθογόνων βακτηρίων *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa*.

Χρησιμοποιήθηκαν 14 δείγματα μελιού από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου. Τα δείγματα ήταν από διαφορετικά είδη φυτών και η παραγωγή τους έγινε το 2009-2010.

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση Gram θετικών βακτηρίων σε ειδικό θρεπτικό υπόστρωμα *Bacillus Cereus Medium* καθώς και άλλων βακτηριακών στελεχών σε αντίστοιχο θρεπτικό υπόστρωμα και από αυτά, έγινε διαλογή των βακτηριακών αποικιών που εμφανίζουν αντιβακτηριδιακή δράση. Ακολούθησε απομόνωση χρωμοσωμικού DNA και με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), ενισχύθηκε το 16S rRNA γονίδιο. Τα προϊόντα της PCR αλληλουχήθηκαν και αναλύθηκαν προκειμένου να γίνει η ταυτοποίηση των βακτηρίων.

Από τα δείγματα μελιών που εξετάστηκαν, στα 7 (δείγματα 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 15, 16, 22, 23, 25 και 30) απομονώθηκαν βακτηριακά στελέχη που εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Staphylococcus aureus* ενώ κανένα δεν εμφάνισε αντιμικροβιακές

ιδιότητες έναντι της *Pseudomonas aeruginosa*. Σε κάποια από αυτά, όπως το μέλι από αγριοβότανα και θυμάρι ανιχνεύθηκαν 3 βακτηριακές αποικίες με αντιμικροβιακές ιδιότητες. Συνολικά, από τα μέλια που μελετήθηκαν, απομονώθηκαν 15 αποικίες που εμφάνισαν αναστολή της ανάπτυξης του *S. aureus*. Ανάμεσα στα μέλια αυτά ήταν και το μέλι από έλατο Μαινάλου, από καστανιά, από μέντα-ρίγανη-τσάι, από κρόκο, από πολύκομπο και από τσάι-ρίγανη. Με τη μέθοδο της PCR ταυτοποιήθηκαν οι παραπάνω βακτηριακές αποικίες και περισσότερα από τα βακτήρια που ταυτοποιήθηκαν φάνηκε ότι ανήκουν στο γένος *Bacillus ssp* ενώ ένα από αυτά ανήκει στο γένος *Pantoea ssp*.

Abstract

Honey is the natural sweet substance that produces the bees of the kind *Apis mellifera* from the nectar of the plants or secretions of the insects that bees collect, alter, enrich with their substances that contribute to its conversion, deposit, dehydrate, store up and keep it in the honeycomb so as to mature.

Well it is about a product of the nature that doesn't admit any elaboration and consists of the following components : water, natural candies, organic acids, proteins, traces, enzymes, vitamins, aromatic and coloring substances just as other nutritious substances. It plays important role in the metabolism and in the nutrition, to the components of the skeleton and the cells, regulate the acidity of the stomach, it has antiseptic attributes, it is tonic, helps to the quickest restoration of the health and has antimicrobial and antioxidant action (National Honey Board 2010).

In the present study evaluated the presence of bacteria in Greek honeys and what type of them have antimicrobial activity against pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

They have used 14 samples of honey from different regions of Greece and Cyprus. The samples were from different species of plants and their production was in 2009-2010.

An isolation of Gram positive bacteria from a special nutrient medium (*Bacillus Cereus Medium*) and other bacteria from corresponding medium, was accomplished and of those, we screened bacterial colonies that exhibit antibacterial activity. Isolation and chromosomal DNA using the polymerase chain reaction (PCR), reinforced the 16S rRNA gene. The PCR products were sequenced and analyzed in order to make the identification of bacteria.

From the honey samples examined, 7 (samples 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 15, 16, 22, 23, 25 και 30) showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and none showed antimicrobial properties against *Pseudomonas aeruginosa*. In some of them, such as honey from wild herbs and thyme, 3 bacterial colonies were detected with anti-microbial properties. In total, from the examined honeys, 15 isolated colonies showed growth inhibition of *S. aureus*. Among these were honey from vanilla Mainalon, chestnut, from peppermint-oregano-tea, from saffron,

from polykompo and from tea-oregano. With the PCR method identified above and more bacterial colonies of bacteria that were identified seemed to belong to the genus *Bacillus ssp* while one of them belongs to the genus *Pantoea ssp*.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
Abstract.....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1. Το μέλι στην αρχαιότητα.....	11
1.2. Η παραγωγή του μελιού.....	11
1.2.1. Η ανατομία μιας μέλισσας.....	12
1.2.2. Διάρκεια ζωής.....	13
1.2.3. Αναζήτηση τροφής.....	13
1.2.4. Αναπαραγωγή.....	13
1.2.5. Η κυψέλη.....	14
1.2.6. Πώς οι μέλισσες φτιάχνουν το μέλι.....	15
1.3. Άλλα προϊόντα που παράγονται από τις μέλισσες.....	17
1.3.1. Το δηλητήριο της μέλισσας.....	19
1.4. Τα είδη του μελιού.....	20
1.5. Τύποι ελληνικού μελιού.....	20
1.6. Εξαγωγές μελιού από την Ελλάδα.....	25
1.7. Τι περιέχει το μέλι και γιατί είναι τόσο μεγάλη η θρεπτική του αξία.....	26
1.8. Αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση.....	27
1.9. Μικροβιακή ποιότητα του μελιού.....	29
1.9.1. <i>Staphylococcus aureus</i> (Χρυσίζων Σταφυλόκοκκος).....	29
1.9.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
1.10. Μέλι-πρότυπο με αντιμικροβιακές ιδιότητες: Manuka honey.....	32
1.11. Προβλήματα που δημιουργεί το μέλι στον ανθρώπινο οργανισμό.....	33
1.11.1. Αλλαντίαση-Βοτουλισμός.....	33
1.11.2. Δηλητηριώδη μέλια.....	35
1.12. Σκοπός της εργασίας.....	35
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	37
2.1. Δείγματα μελιών.....	37
2.2. Απομόνωση <i>B. cereus</i> και άλλων βακτηρίων.....	37
2.3. Διαδικασία καλλιέργειας βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα μέλια.....	42
2.3.1. Αποθήκευση βακτηρίων σε stock γλυκερόλης 25%.....	43
2.3.2. Ανακαλλιέργεια των αποθηκευμένων βακτηρίων.....	44
2.3.3. Επανάληψη των αποτελεσμάτων.....	45
2.3.4. Stock γλυκερόλης.....	46
2.4. Απομόνωση χρωμοσωμικού κατά Spilker.....	46
2.4.1. Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανά δείγμα.....	47

2.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	48
2.6. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.....	51
2.7. Καθαρισμός προϊόντων PCR	53
2.8. Αλληλούχιση του 16S rRNA γονιδίου και ανάλυση των αλληλουχιών.....	53
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	55
3.1. Καταμέτρηση βακτηριακών αποικιών.....	55
3.2. Microtiter plate.....	56
3.3. Αναστολή.....	57
3.4. Αποτελέσματα επαναλήψεων.....	58
3.4.1. Διάμετρος αναστολής.....	59
3.5. Αποτελέσματα φασματοφωτομέτρησης.....	60
3.6. Μοριακή ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών.....	60
3.7. Βακτήρια που απομονώθηκαν από το μέλι και εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση.....	62
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	66
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	69
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	74

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το μέλι στην αρχαιότητα

Η συλλογή μελιού είναι μία αρχαία δραστηριότητα. Οι άνθρωποι άρχισαν προφανώς το κυνήγι για το μέλι τουλάχιστον 8.000 χρόνια πριν, όπως αποδεικνύεται από μία ζωγραφιά των σπηλαίων στη Βαλένθια της Ισπανίας (Eva Crane, 1983). Στην αρχαία Αίγυπτο, το μέλι χρησιμοποιούνταν ως γλυκαντικό σε κέικ και μπισκότα αλλά και σε πολλά άλλα πιάτα. Οι λαοί της αρχαίας Αιγύπτου και γενικότερα της Μέσης Ανατολής χρησιμοποιούσαν επίσης το μέλι για την ταρίχευση των νεκρών (Larry Gonick, 1990). Ο Πλίνιος ο Πρεσβύτερος, στο βιβλίο του *Naturalis Historia* αναφέρεται εκτενώς στις μέλισσες και το μέλι αλλά και σε πολλές χρήσεις του. Σε περίπτωση απουσίας της ζάχαρης, το μέλι ήταν αναπόσπαστο γλυκαντικό συστατικό στις ρωμαϊκές συνταγές και αναφορές για τη χρήση του μπορούν να βρεθούν σε έργα πολλών Ρωμαίων συγγραφέων όπως ο Αθηναίος, ο Cato και ο Bassus (Mark Grant, 2008).

Η τέχνη της μελισσοκομίας στην αρχαία Κίνα υπάρχει από αμνημονεύτων χρόνων και φαίνεται πως είναι δύσκολο να εντοπίσουμε την προέλευσή της. Σε πολλά βιβλία, αναφέρεται η μελισσοκομική διαδικασία κατά την περίοδο της άνοιξης και του φθινοπώρου, καθώς και η σημασία της ποιότητας του ξύλινου κουτιού όπου φυλάσσονταν οι μέλισσες, η οποία επηρεάζει την ποιότητα του μελιού.

Μέλι επίσης καλλιεργείται και στην αρχαία Κεντρική Αμερική από τους Μάγιας, οι οποίοι χρησιμοποιούσαν το μέλι από μέλισσες χωρίς κεντρί για μαγειρικούς σκοπούς. Εκτός όμως από την μαγειρική, οι Μάγιας χρησιμοποιούσαν το μέλι σαν αλοιφή για τα εγκαύματα και τα εξανθήματα και για να απαλύνει τον πονόλαιμο, όταν άλλες πρακτικές δεν ήταν διαθέσιμες (Eva Crane, 1983).

1.2 Η παραγωγή του μελιού

Η κοινωνία των μελισσών αποτελείται από τη βασίλισσα, τις εργάτριες και τους κηφήνες. Ο ρόλος της βασίλισσας είναι να γεννά αυγά

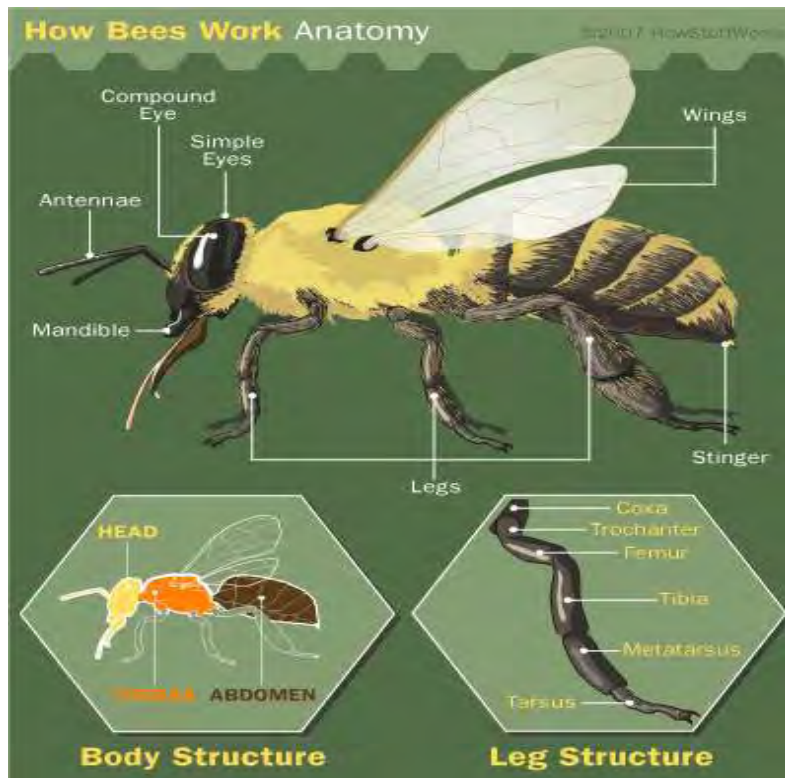
ενώ οι εργάτριες την ταΐζουν κατευθείαν στο στόμα και κάνουν όλες τις δουλειές εντός και εκτός της κυψέλης (Root, 1983). Οι κηφήνες παράγουν θερμότητα και ζεσταίνουν το γόννο, αερίζουν την κυψέλη το καλοκαίρι κουνώντας τα φτερά τους, διαμοιράζουν το νέκταρ και γονιμοποιούν τη βασίλισσα (Τσέλλιος και Θρασυβούλου, 1989).

1.2.1 Η ανατομία μιας μέλισσας

Οι μέλισσες είναι έντομα με φτερά που ανήκουν στο γένος *Apis*. Το πιο γνωστό είδος μέλισσας είναι η ευρωπαϊκή μέλισσα που φέρει την επιστημονική ονομασία *Apis mellifera*. Η εξέλιξη των μελισσών υποστηρίζεται ότι έγινε από ένα είδος που έμοιαζε περισσότερο στις σφήκες, γι' αυτό και οι μέλισσες έχουν πολλά φυσικά κοινά χαρακτηριστικά με αυτές.

Το σώμα μιας μέλισσας έχει πολλά κοινά χαρακτηριστικά με το σώμα άλλων εντόμων. Μεγάλο μέρος της καλύπτεται από έναν εξωσκελετό, κατασκευασμένο από μικρά, κινητά «πιάτα» χιτίνης. Καλύπτεται επίσης σε πολλά μέρη του από ασαφές και διακλαδισμένο τρίχωμα, το οποίο τη βοηθά να συλλέγει τη γύρη αλλά και να ρυθμίζει τη θερμοκρασία του σώματός της. Το σώμα χωρίζεται σε 3 διακριτά τμήματα: το κεφάλι, το θώρακα και την κοιλιά.

Παρά το μικρό μέγεθος του εγκεφάλου της, η μέλισσα μπορεί να εκτελεί αρκετά πολύπλοκες διαδικασίες. Επίσης, στο κεφάλι της, έχει δύο αισθητήριες κεραίες και πέντε μάτια, τρία απλά και δύο σύνθετα, τα οποία επιτρέπουν την όραση στο πολωμένο φως, κάτι το οποίο είναι αδύνατον στον άνθρωπο. Στο στόμα της βρίσκεται μια μεγάλη προβοσκίδα, την οποία χρησιμοποιεί για την συλλογή νέκταρ ενώ στο θώρακα φέρει δύο ζευγάρια φτερά και τρία ζευγάρια πόδια. Το δηλητηριώδες κεντρί της μέλισσας βρίσκεται στην άκρη της κοιλιάς (Tracy B.Wilson, 2007).



1.2.2 Διάρκεια ζωής

Η βασίλισσα ζει μέχρι 4 – 5 χρόνια, αλλά ύστερα από το δεύτερο χρόνο της ζωής της αρχίζει να γερνά, λιγοστεύει ο αριθμός των αυγών που γεννά και γι' αυτό συνήθως οι εργάτριες την αντικαθιστούν. Η εργάτρια ζει μέχρι 40 μέρες ενώ ο κηφήνας ζει 4 με 5 μήνες (Χαριζάνης, 1996).

1.2.3 Αναζήτηση τροφής

Οι μέλισσες μπορούν να απομακρυνθούν μέχρι 3-4 χιλιόμετρα από την κυψέλη προς αναζήτηση τροφής (Δερματόπουλος, 1949).

1.2.4 Αναπαραγωγή

Όταν εκκολαφθεί από το βασιλικό κελί ή βασιλοκύτταρο, η βασίλισσα τις πρώτες 2-3 μέρες περιφέρεται μέσα στην κυψέλη σαν ξένη,

αδιάφορη για τις μέλισσες που την περιτριγυρίζουν, όπως και εκείνες είναι αδιάφορες για τη νέα βασίλισσα, την οποία ούτε περιποιούνται ούτε την τρέφουν. Την τρίτη μέχρι την πέμπτη μέρα από την εκκόλαψή της, εφόσον ο καιρός είναι καλός, ηλιόλουστη μέρα χωρίς άνεμο, βγαίνει στη σανίδα πτήσεως της κυψέλης και κάνει μερικές δοκιμαστικές πτήσεις διαγράφοντας κύκλους μπροστά στην κυψέλη, χωρίς να απομακρυνθεί περισσότερο από δύο με τρία μέτρα, με το κεφάλι πάντα γυρισμένο προς την κυψέλη, σημαδεύοντας τη θέση της κυψέλης σε σχέση με τα αντικείμενα που την περιτριγυρίζουν. Όταν έπειτα από αλλεπάλληλες τέτοιες πτήσεις χαράζει στο μνημονικό της την τοποθεσία της κυψέλης, τότε ξεκινά με ορμή για το γαμήλιο ταξίδι και αμέσως τρέχουν πίσω της οι κηφήνες της κυψέλης και των άλλων κυψελών, όσοι πετούν σε εκείνη την περιοχή, προελκόμενοι από την ουσία που εκκρίνουν οι σιαγονικοί της αδένες. Το ζευγάρι με τον κηφήνα γίνεται πετώντας ψηλά στον αέρα. Η βασίλισσα ζευγαρώνει με τον πρώτο κηφήνα που την πλησιάζει από τους πολλούς που την κυνηγούν και αυτός φυσικά θα είναι ο πιο ταχύς και ο πιο δυνατός για να μπορέσει να φτάσει το γρήγορο πέταγμά της. Πάντως το τίμημα της επιτυχίας του κηφήνα να γονιμοποιήσει τη βασίλισσα είναι ο θάνατος, γιατί στο ζευγάρι αποσπώνται τα γεννητικά του όργανα και πέφτει νεκρός από τον ακρωτηριασμό. Μετά το γαμήλιο πέταγμα η βασίλισσα επιστρέφοντας στην κυψέλη της καθαρίζεται από τις εργάτριες, ακολουθεί ανάπαυση 48 ωρών και αμέσως αρχίζει να γεννά. Όταν γεννήσει 80-100 αυγά σταματά λίγα λεπτά για να ξεκουραστεί και να πάρει τροφή. Τότε αμέσως οι μέλισσες που την περιτριγυρίζουν την τροφοδοτούν με τις κεραίες τους απευθείας μέσα στο στόμα με βασιλικό πολτό (Χαριζάνης, 1996).

1.2.5 Η κυψέλη

Η κυψέλη είναι μία κλειστή δομή που οι μέλισσες ζουν και μεγαλώνουν τα μικρά τους. Οι φυσικές κυψέλες είναι φυσικές δομές που καταλαμβάνονται από αποικίες μελισσών, ενώ οι οικόσιτες μέλισσες οικονομικής σημασίας ζουν σε τεχνητές κυψέλες, συχνά σε μελισσοκομεία. Η εσωτερική δομή της κυψέλης είναι μία πυκνοκατοικημένη μήτρα από κερί μέλισσας που αποτελείται από

εξαγωνικά κελιά και ονομάζεται κηρήθρα. Οι μέλισσες χρησιμοποιούν τα κελιά για την αποθήκευση της τροφής τους (μέλι και γύρη) και για να στεγάσουν το γόννο (αυγά, προνύμφες, χρυσαλίδες) (Robin Dartington, 2000).



1.2.6 Πώς οι μέλισσες φτιάχνουν το μέλι

Η πρώτη ύλη του μελιού είναι το νέκταρ από το οποίο παράγεται το ανθόμελο και το μελίτωμα. Το νέκταρ το παίρνουν οι μέλισσες από τα άνθη, ενώ το μελίτωμα προέρχεται από τα παράσιτα των φυτών. Τα παράσιτα απορροφούν το χυμό, ο οποίος περνά από το πεπτικό τους σύστημα και σχηματίζεται το μελίτωμα, το οποίο χρησιμοποιούν για τις ανάγκες τους. Αυτό που περισσεύει βγαίνει με μορφή σταγονιδίων, που οι μέλισσες απομυζούν από το σώμα των παρασίτων ή από τα φύλλα των φυτών όπου πέφτει το μελίτωμα (Δερματόπουλος, 1949).

Οι συλλέκτριες προσθέτουν στο νέκταρ και στο μελίτωμα σάλιο και το μεταφέρουν στις κυψέλες. Εκεί το μοιράζουν στις εργάτριες και στους κηφήνες. Μέχρι να τοποθετηθεί στα κελιά περνά πολλές φορές από τη μια μέλισσα στην άλλη και κάθε φορά προστίθεται σάλιο, το οποίο μεταβάλλει τα σάκχαρα. Το υγρό πιπιλίζεται από τις μέλισσες πολλές φορές, 15-20 λεπτά. Η διαδικασία αυτή συμπυκνώνει το υγρό. Κατά τη διάρκεια πολλών ημερών εξατμίζεται το νερό και η πυκνότητα του υγρού

αυξάνει σε σάκχαρα ώσπου να φτάσει στο 70-80%. Στη συνέχεια, οι μέλισσες καλύπτουν το συμπυκνωμένο μέλι με ένα κάλυμμα από κερί. Η σύνθεση του μελιού εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως:

- Τα είδη των φυτών απ' όπου συλλέγουν το νέκταρ και το μελίτωμα
- Τη φύση του εδάφους
- Το είδος των μελισσών
- Τη φυσική κατάσταση του μελισσιού κ.α. (Υφαντίδης, 1983).

Μέσα στην προβοσκίδα της μέλισσας αρχίζει η διαδικασία της μετατροπής του νέκταρ σε μέλι, με την προσθήκη ενζύμων από τους σιελογόνους και υποφαρυγγικούς αδένες. Οι υποφαρυγγικοί αδένες βρίσκονται στο πάνω μέρος του κεφαλιού της μέλισσας και είναι δυο λεπτοί και μακροί αγωγοί με πολλές διακλαδώσεις. Είναι πολύ ανεπτυγμένοι στη νεαρή εργάτρια και παράγουν το βασιλικό πολτό. Στης μεγαλύτερης ηλικίας εργάτριες, συρρικνώνονται και παράγουν το ένζυμο ιμπερτάση, απαραίτητο για τη μετατροπή του νέκταρος σε μέλι και το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης, που μετατρέπει τη γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ.

Η κυρίαρχη χημική μετατροπή (μεταβολισμός) του φυτικού χυμού όταν αυτός γίνεται μέλι είναι η αποικοδόμηση του δισακχαρίτη σουκρόζη (της κοινής ζάχαρης) στα άμεσα αφομοιώσιμα μονοσάκχαρα της γλυκόζης και φρουκτόζης. Η ανασύνθεση δι- και τρι- σακχαριτών είναι ποσοτικά πολύ περιορισμένη. Οι αρωματικές (διάφορα τερπένια) και οι χρωστικές ουσίες του φυτικού χυμού δεν μεταβολίζονται. Το μέλι απλά εμπλουτίζεται και με το άρωμα των οργανικών οξέων από τη διάσπαση της γλυκόζης. Τέλος, τα διάφορα μεταλλικά στοιχεία του μελιού είναι ακριβώς τα ίδια με αυτά τα οποία προέρχονται και στον πρωτογενή φυτικό χυμό (Zanber & Maurizio, 1984).

Ο μεταβολισμός των σακχάρων του νέκταρος και του μελιτώματος συνεχίζεται και ολοκληρώνεται μέσα στα κελιά των κηρήθρων, από την ώρα που οι φυτικοί χυμοί αποθηκεύονται μέσα σε αυτές. Η ικανότητα, πάντως, των κοινωνικών μελισσών ως ειδών εντόμων να μετατρέπουν το ευαίσθητο σε ζυμώσεις (αλλοιώσεις) νέκταρ και αντίστοιχα μελιτώματα στο εξαιρετικά συντηρήσιμο μέλι, αποτελεί για αυτές έναν από τους βασικούς μηχανισμούς προσαρμογής τους στη φύση, ο οποίος διασφαλίζει την επιβίωσή τους (White, 1993).

- **ΕΠΙΚΟΝΙΑΣΗ**

Πρόκειται για λειτουργία των ανώτερων φυτών κατά την οποία η ώριμη γύρη από τους στήμονες μεταφέρεται στο στίγμα του ύπερου για να γίνει έτσι η γονιμοποίηση του ωαρίου και να σχηματιστούν τα σπέρματα (αναπαραγωγή του φυτού). Οι μέλισσες βοηθούν στη γονιμοποίηση ποσοστού 60-70% των φυτικών ειδών. Άρα, το ουσιαστικότερο «προϊόν» της μέλισσας είναι η επικονίαση αφού αυτή η προσφορά της στη φύση ξεπερνάει την αξία όλων των προϊόντων της κυψέλης.

Στην πράξη, η επικονίαση των ανθέων από τη μέλισσα επιφέρει τεράστια οφέλη στους παραγωγούς. Έρευνες αλλά και προσωπικές παρατηρήσεις των παραγωγών οπωροφόρων δέντρων και άλλων καλλιεργειών (π.χ. κηπευτικών) δείχνουν πως η καρπόδεση ενισχύεται και οι καρποί γίνονται μεγαλύτεροι με αποτέλεσμα, εκτός από αύξηση της ποσότητας, να απολαμβάνουν και βελτίωση της ποιότητας. Σε πολλές χώρες, ήδη από χρόνια, οι παραγωγοί νοικιάζουν μελίσσια προκειμένου να τοποθετηθούν την κατάλληλη περίοδο σε καλλιέργειες με αυξημένες επικονιαστικές ανάγκες. Εκεί, η προσφορά της μέλισσας στην επικονίαση έχει αναγνωριστεί (Θρασυβούλου, 2001).

1.3 Άλλα προϊόντα που παράγονται από τις μέλισσες

Εκτός από το μέλι, σε ένα μελίσσι μπορεί να παραχθεί :

- **ΓΥΡΗ**

Είναι το προϊόν που συγκεντρώνουν οι μέλισσες από διάφορα λουλούδια. Είναι η πλουσιότερη φυσική τροφή σε πρωτεΐνες, βιταμίνες, απαραίτητα αμινοξέα, ορμόνες, ένζυμα και άλλα χρήσιμα συστατικά για τη διατροφή μας. Χρησιμοποιείται στη φαρμακοβιομηχανία, στη βιομηχανία καλλυντικών, στη διατροφή του ανθρώπου και των οικιακών ζώων, στην κατασκευή υποκατάστατων γύρης για τη διατροφή των

μελισσών, σε διάφορες έρευνες για τις αλλεργίες, σε προγράμματα βελτίωσης φυτών και στην επικονίαση φρούτων και λαχανικών (Παππάς, 1998).

- **ΠΡΟΠΟΛΗ**

Είναι ρητινώδης κολλητική ουσία που συλλέγουν οι μέλισσες από διάφορα φυτά, την εμπλουτίζουν με κερί, γύρη, ένζυμα και άλλες ουσίες και τη χρησιμοποιούν για να στεγανοποιήσουν και να απολυμάνουν το εσωτερικό της κυψέλης. Το χρώμα της πρόπολης εξαρτάται από τη φυτική της προέλευση. Έχει διάφορες φαρμακευτικές και θεραπευτικές ιδιότητες. Χρησιμοποιείται στη βιομηχανία καλλυντικών και ως αντιμικροβιακό. Ενισχύει τα τριχοειδή αγγεία, καταπολεμά την αναπνευστική ανεπάρκεια, αναστέλλει την ανάπτυξη μελανώματος και τα κακοήθη νεοπλασματικά κύτταρα (καρκίνος) και είναι αντιδιαβητικό (Herburn, 1986).

- **ΚΕΡΙ**

Είναι το προϊόν που παράγουν σε μικρά λέπια οι νεαρές εργάτριες από 4 ζεύγη κηρογόνων αδένων. Για την παραγωγή ενός κιλού κεριού οι μέλισσες καταναλώνουν 8 κιλά μέλι. Το κερί είναι ένα μίγμα από 300 περίπου ουσίες (υδρογονάνθρακες, μονοϋδρικές αλκοόλες, λιπαρά οξέα, υδροξυοξέα, διόλες) που είναι απίθανο να συνθέσει ο άνθρωπος. Το κερί χρησιμοποιήθηκε ως φαρμακευτική ουσία για αλοιφές και διάφορα άλλα φαρμακευτικά σκευάσματα. Κάποιες από τις φαρμακευτικές του χρήσεις είναι ενάντια της χρόνιας μαστίτιδας, του εκζέματος, των εγκαυμάτων, της δερματίτιδας. Περιέχει αντιβιοτικές ουσίες και παρουσιάζει θεραπευτική δράση για παρειακές στοματικές αρρώστιες και προβλήματα του άνω αναπνευστικού αγωγού. Χρησιμοποιείται στη βιομηχανία καλλυντικών. Άλλες χρήσεις του είναι στη βιομηχανία των κεριών, βερνικιών και ως μονωτικό υλικό (Herburn, 1986).

- **ΒΑΣΙΛΙΚΟΣ ΠΟΛΤΟΣ**

Παράγεται στους υποφαρυγγικούς αδένες των νεαρών εργατριών, είναι άσπρος σαν το γάλα, κρεμώδης, ισχυρά όξινος, με ιδιάζουσα οσμή και υπόξινη γεύση. Είναι πλούσια πηγή βιταμινών, ανόργανων στοιχείων και αμινοξέων. Περιέχει ακόμη διάφορα λιπαρά οξέα, όπως τα υδροξυλιπαρά οξέα, τα δικαρβοξυλικά οξέα ή απλά λιπαρά οξέα τα οποία είναι υπεύθυνα για τις περισσότερες βιολογικές ιδιότητες που έχει ο βασιλικός πολτός. Ορισμένες ευεργετικές επιδράσεις του αφορούν την αντιμετώπιση της ρευματικής αρθρίτιδας, τη μείωση της πίεσης του αίματος, τη θεραπεία της χρόνιας δυσκοιλιότητας, τις αντισηπτικές και μικροβιοκτόνους ιδιότητες, την ενίσχυση της δυναμικότητας του οργανισμού και την αντοχή στις αρρώστιες. Ακόμη, χρησιμοποιείται στη θεραπεία της νεφρικής ανεπάρκειας, περιέχει γενετήσιες ορμόνες που βοηθούν στη βελτίωση της μυϊκής δύναμης, συμβάλλει στην γαλακτοπαραγωγή μετά τη γέννα των γυναικών και στην αποφυγή της αγγείωσης του δέρματος. Γενικά, ο βασιλικός πολτός βελτιώνει τη διάθεση, αυξάνει την ικανότητα για εργασία και την όρεξη και βοηθά στην απόκτηση μεγαλύτερης διανοητικής και σωματικής δύναμης (Θρασυβούλου, 1996).

1.3.1 Το δηλητήριο της μέλισσας

Η απιτοξίνη, ή αλλιώς το δηλητήριο της μέλισσας, είναι ένα πικρό, άχρωμο υγρό. Το δραστικό τμήμα του δηλητηρίου είναι ένα πολύπλοκο μίγμα πρωτεϊνών, που προκαλεί τοπική φλεγμονή και δρα ως αντιπηκτικό. Το δηλητήριο παράγεται στην κοιλιά των εργατριών από ένα μίγμα όξινων και βασικών εκκρίσεων. Η απιτοξίνη έχει όξινο pH, κοντά στο 5. Μία μέλισσα μπορεί να εγχύσει 0,1 mg του δηλητηρίου της μέσα από το κεντρί της. Εκτιμάται ότι το 1% του πληθυσμού είναι αλλεργικό στα τσιμπήματα μελισσών. Η απιτοξίνη απενεργοποιείται με αιθανόλη (Meier J, White J. 1995).

Οι ουσίες που περιέχει είναι ενδιαφέρουσες από βιοχημική και φαρμακολογική πλευρά, όπως είναι η μελιτίνη, η απαμίνη, η ισταμίνη, η ντομαπίνη, η φωσφολιπάση A χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και για το γαστρικό έλκος. Τα τελευταία

χρόνια χρησιμοποιείται στη θεραπεία για τη σκλήρυνση κατά πλάκας (Τσέλλιος και Θρασυβούλου, 1989).

1.4 Τα είδη του μελιού

Διακρίνουμε τα μέλια σε δύο κατηγορίες: τα μέλια των ανθέων ή νέκταρος που προέρχονται από το νέκταρ των φυτών και τα μέλια μελιτώματος που προέρχονται από τους φυσικούς χυμούς των φυτών και των εντόμων που τρέφονται από τα φυτά αυτά. Τα μέλια των μελιτωμάτων έχουν σκούρο χρώμα και κρυσταλλοποιούνται λίγο σε αντίθεση με τα μέλια του νέκταρος. Η χημική σύνθεση του μελιού ποικίλει από είδος σε είδος (Θρασυβούλου, 1990).

- Μέλια ανθέων: Πορτοκαλιάς, θυμαριού, ευκαλύπτου, δενδρολίβανου, λεβάντας, λυγαριάς, ακακίας είναι μερικά από τα μέλια που προέρχονται από το νέκταρ που παράγουν τα αντίστοιχα φυτά.
- Μέλια μελιτώματος: Το μέλι του πεύκου και του ελάτου είναι μερικά από τα μέλια που προέρχονται από τα μελιτώματα των αντίστοιχων φυτών. Στην Κύπρο δεν παράγονται μέλια μελιτώματος (Θρασυβούλου και Μανίκης, 1990)

Θεωρητικά, οι μέλισσες παράγουν τόσα μέλια όσα είναι και τα φυτά που δίνουν νέκταρ και μελίτωμα. Στην πράξη όμως, δεν έχουμε τόσα πολλά μέλια διότι οι ποσότητες που παράγονται δεν είναι μεγάλες. Κάθε περιοχή παράγει τα δικά της μέλια ανάλογα με την ανθοφορία της. Όταν στην περιοχή δεν υπάρχει μια επικρατούσα ανθοφορία, π.χ. πορτοκαλιάς ή θυμαριού, το μέλι που θα παραχθεί θα είναι μέλι ποικίλης ανθοφορίας. Αντίστοιχα, όταν υπάρχει μια επικρατούσα ανθοφορία, το μέλι θα πάρει τα χαρακτηριστικά της, δηλαδή τη γεύση, το άρωμα και το χρώμα και θα ονομαστεί ανάλογα, π.χ. μέλι θυμαριού (Θρασυβούλου, 2001).

1.5 Τύποι ελληνικού μελιού

Το μέλι είναι ένα μοναδικό στο είδος του προϊόν, πλούσιο σε θρεπτικά στοιχεία, άρωμα και γεύση. Υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ανθόμελων και αυτών που προέρχονται από κωνοφόρα δέντρα. Τα ανθόμελα είναι πιο ανοιχτόχρωμα, ελαφρύτερα και κρυσταλλώνουν πολύ πιο εύκολα. Ακόμη, περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό γλυκόζης και φρουκτόζης (μεγαλύτερο από 65%) και μπορεί να περιέχουν υπολείμματα γύρης. Από την άλλη, τα μέλια από κωνοφόρα δέντρα είναι σκουρόχρωμα και κρυσταλλοποιούνται λιγότερο. Έχουν μικρότερο ποσοστό σακχάρων (38-65%), αλλά είναι πλούσια σε μεταλλικά άλατα (Υφαντίδης, 1983).

- **Πευκόμελο (*Pinus silvestris*)**

Οι κυριότερες περιοχές παραγωγής μελιού στην Ελλάδα είναι η Βόρεια Εύβοια, η Χαλκιδική, η Θάσος, η Σκόπελος, η Ζάκυνθος και η Ρόδος. Το 65% περίπου της συνολικής παραγωγής μελιού στην Ελλάδα προέρχεται από τα πεύκα, τα οποία μάλιστα θεωρούνται το σημαντικότερο μελισσοκομικό φυτό της χώρας μας. Λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης σακχάρων, δεν είναι ιδιαίτερα γλυκό στη γεύση. Έχει ωστόσο ιδιαίτερο άρωμα και πολύ σκούρο χρώμα. Το πευκόμελο κρυσταλλώνει αργά αφού η φυσική περιεκτικότητά του σε γλυκόζη είναι χαμηλή. Θεωρείται μέλι υψηλής αξίας και αυτό οφείλεται κυρίως στον μεγάλο αριθμό διαφορετικών ουσιών που περιέχει. Από αυτές τις ουσίες, επικρατούν τα μέταλλα και τα ιχνοστοιχεία όπως το ασβέστιο, το μαγνήσιο, ο ψευδάργυρος, ο σίδηρος, ο χαλκός κ.α., τα οποία βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις (Θρασυβούλου και Μανίκης, 1990).

- **Μέλι καστανιάς (*Castanea sativa*)**

Είναι αρκετά διαδεδομένο στα ορεινά μέρη της Ελλάδας και κυρίως παράγεται στη χερσόνησο του Αγίου Όρους. Παράγεται από το νέκταρ και τις μελιτώδεις εκκρίσεις της καστανιάς. Η γεύση του είναι αρκετά δυνατή και ελαφρώς πικρή. Έχει έντονο άρωμα και το χρώμα του ποικίλει ανάλογα με την προέλευσή του, από ανοιχτό καφετί μέχρι σκούρο. Κρυσταλλώνει πολύ αργά, είναι ανθεκτικό στη θέρμανση και

είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία, κάλιο, μαγνήσιο, μαγγάνιο και βάριο. Λέγεται ότι ευνοεί την κυκλοφορία του αίματος (Θρασυβούλου και Μανίκης, 1990).

- **Θυμαρίσιο μέλι (*Thymus serpyllus*)**

Ανήκει στα ανθόμελα αλλά στην πραγματικότητα αποτελεί ξεχωριστή κατηγορία λόγω των έντονων αρωματικών και γευστικών χαρακτηριστικών του. Θεωρείται μέλι άριστης ποιότητας και έχει μεγάλη ζήτηση από τους καταναλωτές για το άρωμα και την γεύση του. Η παραγωγή του ανέρχεται περίπου στο 10% της συνολικής παραγωγής μελιού της Ελλάδας. Οι καλύτερες περιοχές παραγωγής θυμαρίσιου μελιού θεωρούνται τα ελληνικά νησιά και ιδιαίτερα η Κρήτη και τα Κύθηρα, εντοπίζεται όμως και στη Θεσσαλία και Εύβοια. Έχει ευχάριστη γεύση, αλλά μερικές φορές αφήνει μία αίσθηση καψίματος λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σε φρουκτόζη. Έχει έντονο άρωμα, το χρώμα του είναι συνήθως ανοιχτό κεχριμπαρένιο και κρυσταλλώνει σε διάστημα 6-18 μηνών. Θεωρείται ότι έχει τονωτικές και αντισηπτικές ιδιότητες (Θρασυβούλου και Μανίκης, 1990).

- **Μέλι Ελάτης (*Abies alba*)**

Προέρχεται κυρίως από τις ορεινές περιοχές της Ευρυτανίας, της Πίνδου, του Ολύμπου, από τα βουνά Μαίναλο, Πάρνωνα και Χελμό της Πελοποννήσου και από την Πάρνηθα Αττικής. Είναι μία από τις πιο εξαιρετικές και ακριβές ποικιλίες μελιού. Υπολογίζεται ότι το 5-10% περίπου του μελιού που παράγεται στην Ελλάδα είναι από έλατα. Αυτό που παράγεται στον Μαίναλο ή στον Πάρνωνα φέρει την ονομασία «ελατοβανίλια», χάρη στις κρεμώδεις ανταύγειες που δημιουργούνται στο εσωτερικό του. Μάλιστα, αυτό του Μαινάλου είναι το μοναδικό ελληνικό μέλι που έχει χαρακτηριστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση ως Π.Ο.Π. Έχει φινετσάτη γεύση αλλά όχι ιδιαίτερο άρωμα. Το χρώμα του είναι έντονο μελί. Είναι εξαιρετικά πυκνόρρευστο και δεν κρυσταλλώνει εξαιτίας του χαμηλού ποσοστού γλυκόζης. Είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία και περιέχει βιταμίνες σε πολύ μικρές ποσότητες. Ωστόσο, ακόμα και

αυτή η μικρή ποσότητα βοηθάει στην καλύτερη αφομοίωση των σακχάρων από τον ανθρώπινο οργανισμό (Μπίκος, 1991).

- **Ερεικόμελο (*Erica multipolyflora*)**

Υπάρχουν δύο τύποι ερεικόμελου, το μέλι φθινοπωρινής ερείκης (είναι ευρέως γνωστό και ως σουσούρα) και το ανοιξιιάτικο μέλι ερείκης. Είναι μία από τις πιο σημαντικές ποικιλίες μελιού στην Ελλάδα και παράγεται σχεδόν σε όλη τη χώρα. Είναι αρκετά γευστικό, με δυνατή γεύση. Έχει χαρακτηριστικό, λεπτό άρωμα, το χρώμα του είναι κοκκινωπό και κρυσταλλώνει πολύ γρήγορα (1-3 μήνες), λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε γλυκόζη. Το μέλι αυτό ξινίζει και πιο εύκολα γιατί έχει υψηλή υγρασία και μεγάλη περιεκτικότητα σε σακχαρομύκητες. Έχει υψηλή θρεπτική αξία γι' αυτό και διατίθεται κυρίως από καταστήματα υγιεινής διατροφής (Seeley, 1985).

- **Μέλι πορτοκαλιάς (*Citrus aurantium*)**

Η πορτοκαλιά είναι ο κύριος αντιπρόσωπος των εσπεριδοειδών και αποτελεί μία σημαντική πηγή νέκταρος για την παραγωγή μελιού. Παράγεται κυρίως στην Κρήτη, στον Πόρο, στην Πελοπόννησο και την Ήπειρο. Έχει την ιδιαίτερη γεύση και το άρωμα του πορτοκαλιού και το χρώμα του είναι ανοιχτό κίτρινο. Κρυσταλλώνει πολύ γρήγορα (1-2 μήνες) και δεν αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες (Θρασυβούλου και Μανίκης, 1990).

- **Μέλι κουμαριάς (*Arbutus unedo*)**

Παράγεται στην Πελοπόννησο και την Χαλκιδική. Έχει υψηλά ποσοστά υγρασίας και μεγάλη φυσική περιεκτικότητα σε ζύμες, γι' αυτό και πολλές φορές ξινίζει εύκολα. Έχει έντονο άρωμα αλλά πικρή γεύση και το χρώμα του είναι πολύ σκούρο, σχεδόν μαύρο. Μερικές από τις ιδιότητές του είναι να καθαρίζει το αίμα, να ρυθμίζει τα επίπεδα της

χοληστερόλης, να τονώνει το ανοσοποιητικό σύστημα και να χαρίζει μακροζωία (Θρασυβούλου και Μανίκης, 1990).

- **Μέλι κρόκου (*Crocus sativus*)**

Το μέλι αυτό προέρχεται από το φυτό κρόκος, το οποίο στη χώρα μας επικρατεί στην περιοχή της Κοζάνης και υπάρχουν ελάχιστες φυτείες και στη Θράκη. Το χρώμα του είναι ανοιχτό, έχει άρωμα που θυμίζει το φυτό από το οποίο προέρχεται, κρυσταλλοποιείται σε 8-10 μήνες και η συγκομιδή του είναι εξαιρετικά δύσκολη. Είναι ένα από τα πιο σπάνια και ακριβά μέλια και σχεδόν το 90% από το μέλι που παράγεται στην Ελλάδα, εξάγεται στο εξωτερικό (Wilkins & Yinrong, 1993).

➤ Υπάρχουν και άλλες ποικιλίες μελιού, που προέρχονται από πολλά και διαφορετικά φυτά. Η παραγωγή τους ωστόσο είναι περιορισμένη στην Ελλάδα και είναι πιο σπάνιο να τα εντοπίσει κανείς στην αγορά. Αναφέρονται ενδεικτικά οι παρακάτω ποικιλίες :

- **Μέλι πολύκομβου (*Polygonum ssp.*)**

Είναι ένα σκουρόχρωμο μέλι με χαρακτηριστική μυρωδιά αλλά όχι και τόσο ωραία γεύση. Είναι από τα πιο πλούσια σε ένζυμα μέλια που υπάρχουν, περιέχει μεταλλικά στοιχεία και είναι αρκετά ανθεκτικό στη θέρμανση.

- **Μέλι ακακίας (*Robinia pseudocacia*)**

Αυτό το μέλι δεν είναι πολύ διαδεδομένο στην Ελλάδα αλλά περισσότερο στην Κεντρική Ευρώπη. Είναι ανοιχτόχρωμο και διαυγές, αραιό, με λεπτό άρωμα ακακίας και κρυσταλλώνει σχετικά δύσκολα.

- **Μέλι από βαμβάκι (*Gossypium hirsutum*)**

Το μέλι από το άνθος του βαμβακιού είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε σάκχαρα (έως 70%). Εξαιτίας αυτού του γεγονότος, κρυσταλλώνει

πολύ γρήγορα (2 μήνες). Είναι ανοιχτόχρωμο αλλά μετατρέπεται σε άσπρο χρώμα μετά την κρυστάλλωσή του.

- **Μέλι από ευκάλυπτο (*Eucalyptus spp.*)**
Είναι ανοιχτόχρωμο, με έντονο χρώμα και γεύση ευκαλύπτου.
- **Μέλι από ηλίανθο (*Helianthus annuus*)**
Συλλέγεται κατά κύριο λόγο στον Έβρο. Είναι ανοιχτόχρωμο προς κιτρινωπό, εξαιρετικά παχύρρευστο, κρυσταλλώνει σε 1-2 μήνες και έχει διακριτικό άρωμα. Είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες.
- **Μέλι από τσάι του βουνού (*Sideritis spp.*)**
Παράγεται κυρίως στην χερσόνησο του Αγίου Όρους. Έχει σκούρο χρώμα και πολύ έντονο άρωμα και γεύση του τσαγιού. Είναι παχύρρευστο και θεωρείται από τα καλύτερα και πιο αρωματικά μέλια της Ελλάδας (Τσέλλιος και Θρασυβούλου, 1989).

1.6 Εξαγωγές μελιού από την Ελλάδα

Το ελληνικό μέλι είναι εξαιρετικής ποιότητας με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και γεύση που αναγνωρίζονται διεθνώς. Σε αυτό συμβάλλουν πρωτίστως οι κλιματολογικές συνθήκες της χώρας μας που είναι ιδιαίτερα ευνοϊκές για την ανάπτυξη της μελισσοκομίας καθώς και η πλούσια και ποικίλη μελισσοκομική χλωρίδα.

Οι μεγαλύτερες ποσότητες μελιού προέρχονται από το πεύκο (55-60% της ετήσιας συνολικής παραγωγής μελιού), το έλατο (5-10%) και το θυμάρι (15%).

Η παραγωγή μελιού το 2008 ανήλθε, σύμφωνα με τα προσωρινά στοιχεία της Εθνικής Στατιστικής Υπηρεσίας, σε 15.682 τόνους. Με τη μεγαλύτερη παραγωγή να προέρχεται από τη Πελοπόννησο, ακολουθεί η Μακεδονία και η Στερεά Ελλάδα. Η παραγωγή μελιού εμφανίζεται μειωμένη το 2008 σε σύγκριση με το 2007 κατά 11% περίπου, ενώ η Μακεδονία εμφανίζεται ως η περιοχή με τη μεγαλύτερη μείωση (31% περίπου).

Γεωγραφικό Διαμέρισμα	Παραγωγή σε τόνους		
	Έτη		Δ%
	2007*	2008*	
Μακεδονία	4.559	3.133	-31,30%
Πελοπόννησος	3.783	3.506	-7,32%
Στ. Ελλάδα & Εύβοια	2.684	2.839	5,80%
Κρήτη	1.873	1.973	5,30%
Νήσοι Αιγαίου	1.644	1.358	-17,40%
Θεσσαλία	1.457	1.217	-16,50%
Θράκη	742	714	-4%
Ήπειρος	668	628	-6%
Ιόνιοι Νήσοι	280	314	12,34%
Γενικό σύνολο	17.690	15.682	-11,35%

Πίνακας 1.

Μικρό είναι το ύψος των ελληνικών εξαγωγών μελιού πλην όμως μεγάλες οι προοπτικές δεδομένου ότι το ελληνικό μέλι με την εξαιρετική του ποιότητα μπορεί να κερδίσει νέες και δυναμικές αγορές.

Οι εξαγόμενες ποσότητες μελιού το 2008 ανήλθαν σε 601 τόνους περίπου αντιπροσωπεύοντας αξία 2.996.867 € με μέση τιμή πώλησης 4,99 €/κιλό.

Ο κύριος όγκος των εξαγωγών μας κατευθύνεται κυρίως σε τέσσερις χώρες και συγκεκριμένα στο Ηνωμένο Βασίλειο, την Κύπρο, τη Γερμανία και τις ΗΠΑ που κάλυψαν το 2008 το 76 % περίπου των εξαγωγών.

Η μέση σταθμισμένη τιμή πώλησης του μελιού την τριετία 2006-2008 ήταν 4,9 €/κιλό χωρίς να παρουσιάσει σημαντικές αποκλίσεις (Ε.Σ.Υ.- Εθνική Στατιστική Υπηρεσία).

1.7 Τι περιέχει το μέλι και γιατί είναι τόσο μεγάλη η θρεπτική του αξία

Το βασικό συστατικό του μελιού είναι οι υδατάνθρακες, σε ποσοστό που κυμαίνεται από 70-80%. Οι δύο βασικοί υδατάνθρακες

είναι οι γλυκόζη και η φρουκτόζη, σε ίση περίπου αναλογία. Στο μέλι υπάρχουν και άλλοι υδατάνθρακες σε μικρότερες ποσότητες.

Το νερό κυμαίνεται κατά μέσο όρο στο 16-17%. Η περιεκτικότητα του μελιού σε νερό εξαρτάται από τις κλιματολογικές συνθήκες στον τόπο παραγωγής του. Στην Κύπρο, λόγω του θερμού κλίματος, τα μέλια έχουν πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό, γι' αυτό και είναι παχύρρευστα.

Στο μέλι, υπάρχουν επίσης κατά μέσο όρο 0,17% μέταλλα και ιχνοστοιχεία. Τα βασικότερα είναι το κάλιο, νάτριο, ασβέστιο, φώσφορος και μαγνήσιο. Οι ποσότητες των βιταμινών που περιέχονται στο μέλι είναι ελάχιστες και είναι κυρίως οι βιταμίνες A₁, B₁, B₆, B₁₂, C, D και E.

Τέλος, υπάρχουν πολύ μικρές ποσότητες πρωτεϊνών και ελεύθερων αμινοξέων και όσον αφορά τα ένζυμα, είναι αυτά που παράγονται σχεδόν στο σύνολό τους από τους αδένες των μελισσών και είναι αυτά που μετατρέπουν το νέκταρ και το μελίτωμα των φυτών σε μέλι (Σταθόπουλος, 1993).

Το μέλι έχει ευεργετικές επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι υδατάνθρακες που περιέχει είναι απλά σάκχαρα και αφομοιώνονται γρήγορα από τον οργανισμό, χωρίς να επιβαρύνει το συκώτι ή άλλα όργανα. Μετατρέπεται αμέσως σε ενέργεια λόγω της γλυκόζης, η οποία χρειάζεται μόνο 15 λεπτά για να βρεθεί στην κυκλοφορία του αίματος. Δυναμώνει και τονώνει τον οργανισμό σε κατάσταση πνευματικής και σωματικής κόπωσης. Έρευνες απέδειξαν ότι αυξάνει την αιμοσφαιρίνη του αίματος και το σωματικό βάρος κατά την παιδική ηλικία, χωρίς όμως να αυξάνει το ζάχαρο στο αίμα ή την οξύτητα στο ουρικό οξύ. Έχει ευεργετικές επιδράσεις στο ήπαρ, στην καρδιά και στο πεπτικό σύστημα, βοηθά στην επούλωση τραυμάτων, έχει αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση και υποβοηθά στην τόνωση του ανοσοποιητικού συστήματος (Herold, 1970).

1.8 Αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση

Ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που συμβάλλουν στην αντιμικροβιακή δράση του μελιού, είναι η υψηλή περιεκτικότητά του σε σάκχαρα. Υπάρχουν πολλά σάκχαρα στο μέλι, για την ακρίβεια, είναι ένα υπέρκορο υδατικό διάλυμα σακχάρων, που σημαίνει ότι περιέχει

σάκχαρα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από εκείνες που κανονικά μπορούν να ανευρίσκονται μέσα στην υγρή φάση του. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να περιέχει πολύ μικρή ποσότητα νερού. Η υψηλή αυτή περιεκτικότητα των σακχάρων δημιουργεί ένα υψηλό οσμωτικό δυναμικό και συνεπώς, τα βακτήρια κυριολεκτικά αφυδατώνονται και πεθαίνουν μέσα στη μάζα του (Joirisch, 1970). Ειδικότερα, όσον αφορά τα βακτήρια της οικογένειας *Clostridium*, δεν μπορούν να επιβιώσουν σε περιβάλλον με πολλά σάκχαρα. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι τα βακτήρια αυτής της οικογένειας είναι υπεύθυνα για πολλές σοβαρές ασθένειες του ανθρώπου όπως αλλαντίαση, κολίτιδα, τροφική δηλητηρίαση και τέτανο (Wells CL, Wilkins TD, 1996).

Ένας δεύτερος παράγοντας που παίζει ρόλο στην αντιμικροβιακή δράση, είναι ένα ένζυμο που περιέχεται στο μέλι, η οξειδάση της γλυκόζης. Το ένζυμο αυτό είναι υπεύθυνο για την παρασκευή του γλυκονικού οξέος ενώ ως παραπροϊόν της βιοχημικής αυτής αντίδρασης σχηματίζεται το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Χάρη σε αυτά τα δύο συστατικά, τα περισσότερα βακτήρια δεν μπορούν να αναπτυχθούν μέσα στη μάζα του μελιού. Το H_2O_2 , όχι μόνο αναχαιτίζει την ανάπτυξη των βακτηρίων αλλά και τα θανατώνει. Επίσης, το H_2O_2 βρέθηκε ότι σε μικρές συγκεντρώσεις συμμετέχει ως ένας από τους παράγοντες επούλωσης πληγών, όταν σε αυτές εφαρμόζονται επιθέματα με μέλι (Herold, 1970).

Ένας άλλος παράγοντας που σχετίζεται με την αντιμικροβιακή δράση του μελιού είναι η οξύτητά του. Το pH του κυμαίνεται μεταξύ 3 με 4. Τα βακτήρια δεν επιβιώνουν σε ένα τόσο όξινο περιβάλλον όπως αυτό. Ωστόσο, αν το μέλι αραιωθεί, μπορεί να μειωθεί σε ένα βαθμό η οξύτητά του (White JW et al, 1963).

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του μελιού. Οι δράσεις αυτές αφορούν τον περιορισμό των αντιδράσεων οξείδωσης μέσα στα τρόφιμα και στον ανθρώπινο οργανισμό. Φάνηκε πως οι ουσίες του μελιού προστατεύουν τις μεμβράνες των κυττάρων από τις διαδικασίες της οξείδωσης και περιορίζουν την ενδοκυτταρική παραγωγή των επιβλαβών ελευθέρων ριζών. Τα φυτοχημικά που περιέχει το μέλι, όπως τα φαινολικά οξέα, η λυσοζύμη, τα φλαβονοειδή και διάφορες άλλες πρωτεΐνες και ολιγοπεπτίδια που προέρχονται από τα στομάχια των μελισσών,

ενισχύουν την άμυνα του οργανισμού απέναντι στο οξειδωτικό στρες (Wadhan, 1998).

1.9 Μικροβιακή ποιότητα του μελιού

Το μέλι έχει ιδιότητες που αναστέλλουν ή σκοτώνουν τους περισσότερους μικροοργανισμούς. Εκτός από τις διάφορες ουσίες που περιέχει (σάκχαρα, φυτοχημικά, H₂O₂), το μέλι φέρει και ένα πλούσιο βακτηριακό και μυκητιακό φορτίο, το οποίο συμβάλλει στην αντιμικροβιακή του δράση. Σύμφωνα με έρευνες, έχουν απομονωθεί αρκετά βακτήρια από το μέλι, τα περισσότερα από τα οποία ανήκουν στο γένος *Bacillus* και *Staphylococcus*. Κάποια από αυτά τα βακτήρια, πιθανώς να συμβάλλουν στις αντιμικροβιακές του ιδιότητες. Έλεγχος που πραγματοποιήθηκε για τη συνολική αντιμικροβιακή δράση του μελιού, έδειξε ότι δείγματα μελιών εμφάνισαν μικροβιοκτόνες ιδιότητες έναντι πρότυπων Gram+ βακτηριακών στελεχών όπως *S. aureus*, *S. epidermidis* καθώς και Gram- βακτηριακών στελεχών όπως *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* αλλά και βακτηρίων στοματικής κοιλότητας *S. viridians*, *S. mutans* και των ανθρωπαθογόνων μυκήτων *C. albicans*, *C. tropicalis* και *C. glabrata*. Όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν, έδειξαν μεγάλη αντιμικροβιακή δράση (Chinou et al, 1998).

Τα βακτήρια *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa*, αποτελούν πολύ συχνά παθογόνα του ανθρώπου και μάλιστα, εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Τα δύο αυτά βακτηριακά στελέχη, εμφανίζουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

1.9.1 *Staphylococcus aureus* (Χρυσίζων Σταφυλόκοκκος)

Ο *S. aureus* ανήκει στο γένος βακτηρίων που είναι θετικοί κατά Gram κόκκοι. Υποδιαιρείται σε διάφορα επίπεδα σχηματίζοντας ακανόνιστες μάζες που μοιάζουν με τσαμπί σταφυλιού και εκεί ακριβώς οφείλει την ονομασία του. Ο *S. aureus* είναι το πιο κοινό είδος σταφυλόκοκκου το οποίο προκαλεί τις πιο συχνές μολύνσεις που οφείλονται σε σταφυλόκοκκους. Ένας από τους λόγους για αυτό είναι μια καροτενοειδής χρωστική ουσία, η σταφυλοξανθίνη (staphyloxanthin), η

οποία είναι υπεύθυνη για το χαρακτηριστικό χρυσό χρώμα των αποικιών του *S. aureus*.

Αναπτύσσεται στο δέρμα, στην ανώτερη αναπνευστική οδό, ιδίως στη μύτη και στο λαιμό, στη φυσιολογική χλωρίδα του ρινοφάρυγγα των υγιών ενηλίκων, οι οποίοι μπορεί να είναι φορείς του παθογόνου χωρίς ωστόσο να νοσούν. Μπορεί επίσης να επιβιώσει σε οικόσιτα ζώα όπως σκυλιά, γάτες και άλογα.

Ο *S. aureus* είναι ένα από τα σημαντικότερα νοσοκομειακά παθογόνα. Πρόκειται για τον συνηθέστερο αιτιολογικό παράγοντα της πνευμονίας και το τρίτο κατά σειράν σημαντικότερο αίτιο λοιμώξεων του αίματος. Πολλά στελέχη του είναι ασυνήθιστα επιθετικά και ταυτοχρόνως ανθεκτικά στα κοινά αντιβιοτικά, γεγονός που καθιστά την αντιμετώπισή τους ιδιαίτερα δύσκολη.

Προκαλεί πυρετογόνες μολύνσεις (εξανθήματα κλπ.), λοιμώξεις του δέρματος και των πληγών, λοιμώξεις του αναπνευστικού, σύνδρομο τοξικής καταπληξίας (TTS), τοξική επιδερμική νεκρόλυση, φλύκταινες, οστεομυελίτιδα, μηνιγγίτιδα και αρθρίτιδα. Επίσης, είναι το συνηθέστερο παθογόνο σε έλκη διαβητικών. Η δυσλειτουργία των αμυντικών μηχανισμών γύρω από τους νεκρωμένους ιστούς ή μέσα στα οστά επιτρέπει στον *S. aureus* να προκαλεί οξείες λοιμώξεις (Νικολόπουλος, 2006).

Τοπική χρήση επιθεμάτων μελιού έχουν ευεργετική επίδραση στις πληγές αυτές καθώς και σε τομές εγχείρησης και εγκαύματα που έχουν προσβληθεί από το βακτήριο (Mollan, 1998).



Staphylococcus aureus

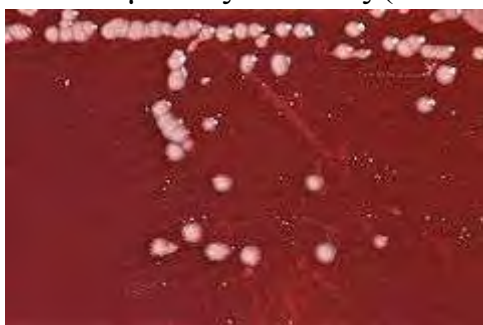
Ο *S. aureus* προκαλεί και τροφικές δηλητηριάσεις, διότι καθώς αναπτύσσεται παράγει διάφορες θερμοσταθερές πρωτεϊνικές εντεροτοξίνες οι οποίες απελευθερώνονται στη μάζα της τροφής. Αν αυτή η μολυσμένη με εντεροτοξίνες τροφή καταναλωθεί εντός 1-6 ωρών, τότε εμφανίζεται γαστρεντερίτιδα συνοδευόμενη από ναυτία και εμετό.

Οι τροφές που συνήθως συνδέονται με δηλητηριάσεις σταφυλοκοκκικής προέλευσης είναι τα προϊόντα που περιέχουν κρέμα, τα διάφορα κρέατα (συμπεριλαμβανομένου και των πουλερικών), τα αυγά, οι πουτίγκες και οι κρεμώδεις σάλτσες. Θάνατος από σταφυλοκοκκική δηλητηρίαση είναι πολύ σπάνιος, αν και τέτοιες περιπτώσεις έχουν συμβεί σε ηλικιωμένα άτομα, σε βρέφη και σοβαρά εξασθενημένους οργανισμούς (Βιολογία των Μικροοργανισμών Brock, Τόμος I & II).

1.9.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Η φθορίζουσα ψευδομονάδα ανήκει στα Gram αρνητικά βακτήρια. Είναι μη σπορογόνο που σχετίζεται συχνά με μολύνσεις του ουροποιητικού και του αναπνευστικού συστήματος του ανθρώπου. Τα κύτταρά της διατάσσονται μεμονωμένα, σε ζεύγη ή σε μικρές αλυσίδες. Αν και ταξινομείται στα αερόβια βακτήρια, θεωρείται από πολλούς ως προαιρετικά αναερόβιο, διότι προσαρμόζεται καλά και σε συνθήκες μερικής ή ολικής έλλειψης οξυγόνου.

Η *P. aeruginosa* προκαλεί ασθένειες σε ζώα, φυτά και στον άνθρωπο. Βρίσκεται στο έδαφος, το νερό και στη χλωρίδα του δέρματος. Είναι ευκαιριακό παθογόνο μικρόβιο για τον άνθρωπο και σημαντική αιτία σοβαρών ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων, όπως ουρολοιμώξεις, μηνιγγίτιδα, λοιμώξεις από καθετήρες, σηψαιμία, πνευμονία κ.α. ειδικά σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς (Khan MO et al, 2000).



Pseudomonas aeruginosa

Επίσης, μπορεί να προκαλέσει και άλλες λοιμώξεις όπως ωτίτιδα, λοιμώξεις τραυμάτων, επιπεφυκίτιδα κ.α. λοιμώξεις από *P. aeruginosa* παρατηρούνται κυρίως σε ασθενείς που πάσχουν από λευχαιμία ή άλλες νεοπλασίες, σε άτομα που έχουν υποστεί εγκαύματα, σε άτομα που πάσχουν από ινοκυστική νόσο, σε άτομα που έχουν υποστεί μεγάλες χειρουργικές επεμβάσεις και σε ασθενείς που θεραπεύονται με

ακτινοβολίες, αντιβιοτικά και ανοσοκατασταλτικά φάρμακα. Αν προσβάλλει κρίσιμα όργανα όπως πνεύμονες, ουρικό σύστημα και νεφρά τα αποτελέσματα μπορεί να είναι θανατηφόρα. Το βακτήριο είναι εκ φύσεως ανθεκτικό σε πολλά από τα συνήθη αντιβιοτικά, άρα η χημειοθεραπεία είναι συχνά δύσκολη. Η ανθεκτικότητά του οφείλεται συνήθως σε ένα πλασμίδιο μεταφοράς ανθεκτικότητας (πλασμίδιο R), το οποίο φέρει γονίδια που κωδικοποιούν την αδρανοποίηση της τοξικότητας διαφόρων αντιβιοτικών.

Η *P. aeruginosa* απαντάται συνήθως στο περιβάλλον νοσοκομείων και μολύνει εύκολα ασθενείς που ακολουθούν θεραπεία για άλλες παθήσεις. Εποικίζει πολύ εύκολα σε ενδοσκοπικά ιατρικά όργανα και στα εξαρτήματά τους. Σε υγιείς ανθρώπους μπορούμε να την βρούμε στο φάρυγγα (0-7%), στα πτύελα (2%) και στα κόπρανα (3-24%) ενώ στους νοσοκομειακούς ασθενείς μπορεί να ανευρεθεί σε ακόμη μεγαλύτερα ποσοστά. Πολύ καλύτερα αναπτύσσεται σε υγρό και θερμό περιβάλλον.

Το βακτήριο αυτό παράγει διάφορες χρωστικές ουσίες όπως πυοκυανίνη, πυορουμπίνη, πυομελανίνη και φθορεσεΐνη. Περισσότερα από το 50% των στελεχών *P. aeruginosa* παράγουν την υδατοδιαλυτή χρωστική πυοκυανίνη η οποία έχει κυανοπράσινο χρώμα και χαρακτηρίζει τα στελέχη της χωρίς να χρειάζονται περισσότερες βιοχημικές δοκιμασίες για την ταυτοποίησή τους (Grogan JB, 1996).

1.10 Μέλι-πρότυπο με αντιμικροβιακές ιδιότητες: Manuka honey



Το μέλι Manuka προέρχεται από το φυτό *Leptospermum scoparium*, ένα γηγενές φυτό της νότιας Ζηλανδίας και νοτιοανατολικής Αυστραλίας. Είναι θάμνος ή μικρό δέντρο ιδιαίτερα γνωστό στη φυλή Maori, οι οποίοι το χρησιμοποιούσαν για αιώνες στην παραδοσιακή ιατρική τους. Το χρησιμοποιούσαν επίσης για τις

θεραπευτικές, αντιβιοτικές και αντιβακτηριδιακές του ιδιότητες. Το φυτό αυτό βρίσκεται σήμερα σε ολόκληρη τη Ν. Ζηλανδία αλλά είναι ιδιαίτερα κοινό στις ξηρότερες ανατολικές ακτές του Βορείου και του Νοτίου Νησιού, στην Αυστραλία, στην Τασμανία, στην Βικτώρια και στη Νέα Νότια Ουαλία. Η μοντέρνα ιατρική ανέπτυξε μια μέθοδο για να μετράει την αντισηπτική ισχύ αυτού του μοναδικού στον κόσμο μελιού, το Unique Manuka Factor (UMF). Η μονάδα μέτρησης UMF κατηγοριοποιεί το μέλι με βάση την αντιβακτηριδιακή του δύναμη. Κάθε παρτίδα ελέγχεται συστηματικά από εγκεκριμένο εργαστήριο και ταξινομείται κατά αύξουσα σειρά αποδοτικότητας σε κλίμακα από το 0 μέχρι το 25. Όσο πιο υψηλότερο το επίπεδο, τόσο πιο αποδοτική είναι η αντισηπτική δράση του Manuka honey. Η UMF, η μοναδική αξιόπιστη μονάδα μέτρησης αποδοτικότητας του μελιού Manuka, έχει προκύψει από τη σύγκριση της αντισηπτικής του ιδιότητας με αυτή του διαλύματος καρβοξιλικού οξέος, το οποίο είναι ένα πανίσχυρο αντισηπτικό μόριο που χρησιμοποιείται ευρέως στη μοντέρνα ιατρική. Το 2008, αναγνωρίστηκε η δραστική ουσία του Manuka honey, η μεθυλογλυοξάλη (MGO), η οποία ανιχνεύεται σε υψηλά επίπεδα (Adams CJ, 2009).

1.11 Προβλήματα που δημιουργεί το μέλι στον ανθρώπινο οργανισμό

Υπάρχουν πράγματι κάποιες περιπτώσεις κατά τις οποίες η κατανάλωση μελιού σε κάποιες κατηγορίες ή ηλικίες ανθρώπων μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα, αν και η συχνότητα αυτών των περιπτώσεων είναι ελάχιστη (Frank, 2004).

1.11.1 Αλλαντίαση – Βοτουλισμός

Η αλλαντίαση είναι μία παραλυτική ασθένεια που προκαλείται από τη νευροτοξίνη που παράγει το μικρόβιο κλωστρίδιο *Clostridium botulinum*. Σπόρια του μικροβίου μπορούν να βρεθούν στο χώμα, στο νερό, στα φύκη της θάλασσας, στην οικιακή σκόνη ή στην επιφάνεια

τροφίμων. Ανάλογα με τον τρόπο ή την αιτία εισόδου των σπορίων του μικροβίου στον οργανισμό του ανθρώπου, διακρίνονται 4 τύποι εκδήλωσης της ασθένειας:

- Κατάποση σπορίων του μικροβίου που έχουν αναπτυχθεί σε πλημμελώς αποστειρωμένες ή κακώς συντηρημένες κονσέρβες.
- Είσοδος σπορίων στον οργανισμό μέσω ενός τραύματος, χειρουργικού ή άλλου.
- Βρεφικός βοτουλισμός.
- Βοτουλισμός σε ενήλικες ή μεγαλύτερα παιδιά (Nakano & Sakaguchi, 1991).

Αν και οι περισσότερες περιπτώσεις μόλυνσης του ανθρώπου από τη νευροτοξίνη της αλλαντίασης οφείλονται σε τροφική δηλητηρίαση, το μέλι έχει συσχετισθεί με το βρεφικό βοτουλισμό (Frank, 2004).

Σε συνθήκες συνθήκες η μικροχλωρίδα του εντέρου του ανθρώπου καταστέλλει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των σπορίων του κλωστριδίου που μπορεί να βρεθεί εκεί. Στον εντερικό σωλήνα όμως των βρεφών, παιδιών ηλικίας μικρότερη του 1 έτους, καθώς η μικροχλωρίδα αυτή δεν έχει πλήρως αναπτυχθεί, τα σπόρια του μικροβίου μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να παράγουν τη νευροτοξίνη. Σε ένα διάστημα 16 ετών (1976-1992), 1.134 περιπτώσεις βρεφικού βοτουλισμού αναφέρθηκαν στις ΗΠΑ, με ένα μέσο όρο 60 περιπτώσεων ανά έτος. Αν και το ποσοστό θανατηφόρων κρουσμάτων κυμαίνεται στο 2%, ο βρεφικός βοτουλισμός θεωρείται υπεύθυνος για το 5% των περιπτώσεων του συνδρόμου «βρεφικού αιφνίδιου θανάτου». Από αυτές, οι περιπτώσεις που έχουν ταυτιστεί με την κατανάλωση μελιού αποτελούν το 20% (Beetlestone, 1994).

Είναι γνωστό ότι σπόρια του *Clostridium botulinum* μπορούν να βρεθούν στο μέλι. Πιθανές πηγές θεωρούνται το νέκταρ και η γύρη των ανθέων, αλλά και η μόλυνση του μελιού κατά το στάδιο της επεξεργασίας του (Berthold, 1997).

Βρέθηκε ότι το 10-15% των δειγμάτων μελιού που εξετάστηκαν στις ΗΠΑ, περιείχαν σπόρια του κλωστριδίου *Clostridium botulinum* (Midula et al, 1979). Όσον αφορά στα ελληνικά μέλια, δεν γνωρίζουμε εάν περιέχουν σπόρια αλλαντίασης, σε ποια συχνότητα και ποιου τύπου (υπάρχουν 6 διαφορετικοί τύποι αλλαντίασης). Εκείνο όμως που είναι γνωστό είναι ότι δεν έχει αναφερθεί καμία περίπτωση βρεφικού

βοτουλισμού για την οποία υπεύθυνη να είναι η κατανάλωση μελιού (Beetlestone, 1994).

1.11.2 Δηλητηριώδη μέλια

Είναι γνωστό ότι πολλών ειδών φυτά διαθέτουν σε διάφορα μέρη τους, όπως βλαστοί, φύλλα, ρίζα, ουσίες τοξικές. Αυτές συνήθως είναι αλκαλοειδή, γλυκοσίδες, δεψικές ουσίες. Οι ουσίες αυτές προστατεύουν τα φυτά από φυσικούς τους εχθρούς ή αποτρέπουν ζώα από το να τα φάνε. Μάλιστα, μερικές από αυτές τις ουσίες, κυρίως αλκαλοειδή, σε μικρές δόσεις χρησιμοποιούνταν παλαιότερα από τον άνθρωπο ως φαρμακευτικές ουσίες, όπως η ατροπίνη (Krochmal, 1999).

Κάτω από ιδιαίτερες συνθήκες, συνήθως εξαιτίας μιας φυσιολογικής διαταραχής, τοξικές ουσίες συγκεντρώνονται στο νέκταρ ή τη γύρη κάποιων φυτών και έτσι συλλέγονται από τις μέλισσες. Στις περισσότερες περιπτώσεις αυτό οδηγεί στη δηλητηρίαση των μελισσών με συνηθέστερο επακόλουθο το θάνατό τους. Σε ελάχιστες περιπτώσεις το τοξικό αυτό νέκταρ ή γύρη δεν σκοτώνει τις μέλισσες και έτσι συγκεντρώνεται στο μέλι το οποίο παράγουν. Μία τέτοια περίπτωση αναφέρεται σε είδη της οικογένειας *Rhododendron*, στην οποία ανήκουν οι αζαλέες και τα Ροδόδεντρα. Η τοξική ουσία στην περίπτωση αυτή είναι η ανδρομεδοτοξίνη, η οποία προκαλεί στον άνθρωπο αίσθημα δυσφορίας, ναυτίας και γενικά, χαρακτηριστικά δηλητηρίασης (Olszowy, 1977).

1.12 Σκοπός της εργασίας

Όπως φάνηκε από τα παραπάνω, το μέλι είναι μία από τις τροφές με ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον, αφού εμφανίζει μία σειρά από εκπληκτικά χαρακτηριστικά. Είναι μια τροφή πλούσια σε θρεπτικά συστατικά, είναι φυσικό γλυκαντικό, με έντονη αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν στα 31 δείγματα ελληνικών και κυπριακών μελιών να ελεγχθεί η παρουσία βακτηρίων τα οποία να εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση, έναντι ενός Gram⁺ βακτηρίου

(*Staphylococcus aureus*) και ενός Gram⁻ βακτηρίου (*Pseudomonas aeruginosa*). Τα βακτήρια αυτά εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά μεθικιλίνη και καρβαπενέμες αντίστοιχα. Η ταυτοποίηση των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα μέλια αυτά, βασίστηκε στο 16S rRNA γονίδιο.

Η ανακάλυψη βακτηρίων στα μέλια της χώρας μας, που έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες, είναι πολύ πιθανόν να ανοίξει ένα νέο κεφάλαιο τόσο στην επιστημονική κοινότητα όσο και στην οικονομία.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δείγματα μελιών

Η μελέτη αφορά 31 δείγματα μελιών, ελληνικών αλλά και κυπριακών. Συγκεκριμένα, 3 από αυτά τα δείγματα προέρχονται από την Κύπρο και μάλιστα από τη Λευκωσία και τη Λεμεσό. Η παραγωγή των μελιών έγινε κατά τα έτη 2009 και 2010. Η παραγωγή ενός μόνο δείγματος έγινε το 2008. Η προμήθεια αυτών των μελιών έγινε απευθείας από τους ίδιους τους παραγωγούς.

Πρόκειται για 22 μέλια ανθέων και 9 μέλια μελιτωμάτων. Στα μέλια ανθέων συγκαταλέγονται : μέλι από ρείκι, από κουμαριά, από ακακία, από μέντα-ρίγανη-τσάι, από αγριοβότανα-θυμάρι, από πολύκομβο-κρόκο, από κρόκο, από πολύκομβο, από ευκάλυπτο, από θυμάρι, από μάραθο, από ηλίανθο, από πορτοκάλι, από βαμβάκι, από άγρια ρίγανη-άγριο τριφύλλι. Στα μέλια μελιτωμάτων συγκαταλέγονται τα εξής : από έλατο, από πεύκο, από καστανιά και από βελανιδιά.

Τα δείγματα των μελιών αριθμήθηκαν με τυχαία σειρά, από το 1 ως το 31. Τα δείγματα μελιών που ερεύνησα κατά τη διάρκεια της εργασίας μου ήταν τα εξής: 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 15, 16, 22, 23, 25 και 30. Η αρίθμηση και τα στοιχεία του κάθε δείγματος παραθέτονται στο παράρτημα, στο τελευταίο τμήμα της εργασίας.

2.2 Απομόνωση Gram+ βακτηρίων από θρεπτικό υπόστρωμα *Bacillus Cereus* Medium

❖ *Bacillus cereus* medium

Αποτελεί ένα θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται για την απομόνωση και την καταμέτρηση αποικιών *Bacillus cereus* στα τρόφιμα.

Η ζύμωση της μαννιτόλης σε αυτό το θρεπτικό μέσο παράγει ένα ροζ-υπόλευκο χρώμα με το οποίο χρωματίζονται οι αποικίες. Η παρουσία λεκιθινάσης υποδεικνύεται από ένα λευκό ίζημα γύρω από τις αποικίες που έχουν αναπτυχθεί στο τρυβλίο. Τέλος, προστίθεται πολυμυξίνη (Polymyxin B) για να καταστείλει τυχόν κολοβακτηρίδια αλλά και μερικά *Proteus spp* και Gram+ που μπορούν να αυξηθούν μέσω αυτής (labm.com).

Για την παρασκευή 1000 ml θρεπτικού μέσου, ζυγίστηκαν 46 gr *Bacillus cereus medium* και προστέθηκαν σε 900 ml απιονισμένο νερό. Έπειτα, αφού έγινε καλή ανάδευση για κάποια λεπτά, πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στους 120 °C για 23 λεπτά. Μετά την αποστείρωση παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να φτάσει περίπου τους 47 °C. Στη συνέχεια, υπό ασηπτικές συνθήκες, προστέθηκαν 100 ml από το X037 egg yolk emulsion (κρόκος αυγού) και 2 vials από το αντιβιοτικό Polymyxin B (πολυμυξίνη). Έγινε καλή ανακίνηση του θρεπτικού και μοιράστηκε σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri.

❖ ***Plate Count Agar (PCA)***

Για την ανάπτυξη βακτηρίων το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το PCA (plate count agar). Πρόκειται για ένα θρεπτικό μέσο που υποστηρίζει την ανάπτυξη ευρέους φάσματος βακτηρίων (labm.com).

Για την παρασκευή 1000 ml PCA (της εταιρίας LAB M), ζυγίστηκαν 23, 5 gr θρεπτικού μέσου και προστέθηκαν σε 1 λίτρο απιονισμένο νερό. Έπειτα, αφού ανακινήθηκε για λίγα λεπτά ώστε να ομογενοποιηθεί καλά, αποστειρώθηκε στους 120 °C για 23 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να πιάσει τη θερμοκρασία των 47 °C περίπου και έπειτα πριν στερεοποιηθεί, μοιράστηκε σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri.

❖ *Phosphate buffer saline (PBS)*

Το φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα άλατος (PBS) είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται συνήθως στη βιολογική έρευνα. Είναι με βάση το νερό, αλατούχο διάλυμα που περιέχει χλωριούχο νάτριο, φωσφορικό νάτριο, και σε μερικές συνθέσεις, χλωριούχο κάλιο ή φωσφορικό κάλιο. Το buffer βοηθά να διατηρείται σταθερό το pH (labm.com).

Το PBS έχει πολλές χρήσεις επειδή είναι ισοτονικό και μη τοξικό για τα κύτταρα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αραιώση των ουσιών. Χρησιμοποιείται για την έκπλυση δοχείων που περιέχουν κύτταρα. Το PBS μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως διαλύτης για να στεγνώσει βιομόρια.

Ο απλούστερος τρόπος για να προετοιμαστεί ένα διάλυμα PBS είναι να χρησιμοποιηθούν PBS δισκία buffer. Είναι σχεδιασμένα για να δίνουν ένα έτοιμο προς χρήση διάλυμα PBS μετά τη διάλυση σε συγκεκριμένη ποσότητα απιονισμένου νερού.

Η προετοιμασία του έγινε ως εξής: σε 1 λίτρο απιονισμένο νερό, προστέθηκε μια ταμπλέτα PBS. Έπειτα, τοποθετήθηκε το μπουκάλι στον αναδευτήρα (μαζί με ένα μαγνητάκι) και παρέμεινε μέχρι να ομογενοποιηθεί τελείως η ταμπλέτα. Εφόσον η ταμπλέτα έλιωσε, χωρίστηκε το μίγμα σε μικρότερα μπουκαλάκια και αποστειρώθηκαν στους 120 °C για 23 λεπτά. Τέλος, τοποθετήθηκαν τα μπουκάλια σε θερμοκρασία δωματίου.

❖ *Nutrient Broth*

Είναι ένα θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται για υγρές καλλιέργειες και για μη απαιτητικούς οργανισμούς σε διατροφικά στοιχεία.

Για την παρασκευή 1000 ml θρεπτικού μέσου, ζυγίστηκαν 13 gr Nutrient Broth και προστέθηκαν σε 1 λίτρο απιονισμένο νερό. Έπειτα, αφού έγινε καλή ανάδευση για μερικά λεπτά, μοιράστηκαν 2 ml του θρεπτικού μέσου σε κάθε ένα από τα μικρότερα μπουκαλάκια (vials) και πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στους 120 °C για 23 λεπτά. Τα vials τοποθετήθηκαν στο ψυγείο στους 4 °C.

❖ *Γλυκερόλη*

Η γλυκερόλη ή γλυκερίνη είναι μία απλή πολυολική ένωση. Πρόκειται για ένα άχρωμο, άοσμο, παχύρρευστο υγρό με χαμηλή τοξικότητα, που χρησιμοποιείται ευρέως σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Η γλυκερόλη έχει τρεις ομάδες υδροξυλίου που είναι υπεύθυνες για την διαλυτότητά της στο νερό και την υγροσκοπική της φύση. Η ραχοκοκαλιά της γλυκερίνης είναι το επίκεντρο όλων των λιπιδίων, γνωστών ως τριγλυκερίδια (Christophe Ralf, 2006).

❖ *Nutrient Agar*

Είναι ένα θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται για στερεό θρεπτικό υπόστρωμα σε τρυβλία και για καλλιέργεια μη απαιτητικών σε διατροφικά στοιχεία οργανισμών.

Για την παρασκευή 1000 ml θρεπτικού μέσου, ζυγίστηκαν 21, 5 gr Nutrient Agar και προστέθηκαν σε 1 λίτρο απιονισμένο νερό. Έπειτα, αφού έγινε καλή ανάδευση για μερικά λεπτά, πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στους 120 °C για 23 λεπτά. Το διάλυμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου μετά την αποστείρωση, έτσι ώστε να φτάσει τους 47 °C περίπου και στη συνέχεια, μοιράστηκε σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri, υπό ασηπτικές συνθήκες, πριν στερεοποιηθεί.

❖ *Trypton Soy Agar (TSA)*

Το βακτηριακό αυτό μέσο ανάπτυξης περιλαμβάνει ενζυμικά παράγωγα καζεΐνης και σόγιας, τα οποία παρέχουν αμινοξέα και άλλες αζωτούχες ουσίες, καθιστώντας το κατάλληλο για καλλιέργεια μιας μεγάλης ποικιλίας οργανισμών. Στο θρεπτικό αυτό μέσο, η γλυκόζη είναι η πηγή ενέργειας. Περιέχει επίσης χλωριούχο νάτριο, το οποίο διατηρεί την ωσμωτική ισορροπία, ενώ το φωσφορικό κάλιο λειτουργεί ως ρυθμιστικό διάλυμα για την διατήρηση του pH (Labour & Welfare, 2009).

Για την παρασκευή 1000 ml θρεπτικού μέσου, ζυγίστηκαν 37 gr TSA και προστέθηκαν σε 1 λίτρο απιονισμένο νερό. Έπειτα, αφού έγινε

καλή ανάδευση για μερικά λεπτά, πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στους 120 °C για 23 λεπτά. Το διάλυμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου μετά την αποστείρωση, έτσι ώστε να φτάσει τους 47 °C περίπου και στη συνέχεια, μοιράστηκε σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri, υπό ασηπτικές συνθήκες, πριν στερεοποιηθεί.

❖ *Luria Bertani Broth (LB)*

Το LB Broth είναι ένα διατροφικά πλούσιο μέσο που χρησιμοποιείται για υγρές καλλιέργειες. Είναι ένα από τα πιο συνηθισμένα μέσα καλλιέργειας στο εργαστήριο, κυρίως για στελέχη του βακτηρίου *Escherichia coli*. Υπάρχουν πολλά διαφορετικά σκευάσματα αυτού του θρεπτικού μέσου, όμως γενικά, μοιράζονται πολλά κοινά συστατικά όπως πεπτόνες της καζεΐνης, βιταμίνες (συμπεριλαμβανομένου αυτών του συμπλέγματος B), ιχνοστοιχεία (άζωτο, θείο, μαγνήσιο) και μεταλλικά στοιχεία (Nikaido H., 2009).

Για την παρασκευή 1000 ml θρεπτικού μέσου, ζυγίστηκαν 25 gr LB Broth και προστέθηκαν σε 1 λίτρο απιονισμένο νερό. Έπειτα, αφού έγινε καλή ανάδευση για μερικά λεπτά, μοιράστηκαν 5 ml του θρεπτικού μέσου σε κάθε ένα από τα μικρότερα μπουκαλάκια (vials) και πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στους 120 °C για 23 λεπτά. Τα vials τοποθετήθηκαν στο ψυγείο στους 4 °C.

❖ *Soft Agar*

Το συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο αποτελεί ένα μίγμα μεταξύ Nutrient Broth και Nutrient Agar. Η σύσταση του μέσου σε Nutrient Agar είναι 0,75%. Για την παρασκευή 100 ml αυτού του διαλύματος, ζυγίστηκαν 1,3 gr Nutrient Broth και 0,75 gr Nutrient Agar. Μετά από καλή ανάδευση λίγων λεπτών, πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στους 120 °C για 23 λεπτά. Το θρεπτικό μέσο παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για να φτάσει τη θερμοκρασία των 47 °C και έπειτα, αφού προστέθηκε ο μικροοργανισμός-στόχος, μοιράστηκε σε τρυβλία πριν στερεοποιηθεί, έτσι ώστε να καλύψει τις υπάρχουσες αποικίες, σε μία διαδικασία που θα αναλυθεί παρακάτω.

❖ *Για κάθε ένα από τα δείγματα μελιού, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:*

- ✓ Σε ένα αποστειρωμένο πλαστικό φιαλίδιο τύπου falcon τοποθετήθηκαν 5 ml από το δείγμα μελιού και 5 ml PBS (buffer)
 - ✓ Το μίγμα ομογενοποιήθηκε με τη χρήση vortex
 - ✓ Φυγοκεντρήθηκε στις 4000rpm για 45 min
 - ✓ Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, κρατώντας το ίζημα και 2 ml περίπου του υπερκειμένου για να γίνει η επίστρωση
 - ✓ Ομογενοποιήθηκε το μίγμα με τη χρήση vortex
 - ✓ Τοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο στους 80 °C για 10 min ώστε να σκοτωθούν όλες οι βλαστικές μορφές και να παραμείνουν τα ενδοσπόρια
 - ✓ Με τη χρήση πιπέτας, 150 μl από το falcon τοποθετήθηκαν σε ένα τρυβλίο Petri με *B. cereus* medium και άλλη τόση ποσότητα σε ένα τρυβλίο με PCA
 - ✓ Με τη βοήθεια μιας πιπέτας Pasteur, έγινε επίστρωση στα τρυβλία με τα παραπάνω θρεπτικά υποστρώματα
 - ✓ Τοποθετήθηκαν τα τρυβλία στον επωαστήρα στους 30 °C για 24-48 ώρες
- ✚ Για κάθε ένα από τα μέλια έγιναν 3 επαναλήψεις από το *Bacillus cereus* medium και 3 επαναλήψεις από το PCA, δηλαδή συνολικά 6 τρυβλία για κάθε δείγμα μελιού.

2.3 Διαδικασία καλλιέργειας βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα μέλια

2.3.1 Αποθήκευση βακτηρίων σε stock γλυκερόλης 25%

Από τα τρυβλία με τις αποικίες των Gram+ αλλά και άλλων βακτηρίων που αναπτύχθηκαν, έγινε επιλογή κάποιων από αυτών με σκοπό να αποθηκευτούν και στη συνέχεια να καλλιεργηθούν και να γίνει απομόνωση βακτηριακού DNA.

Προκειμένου να απομονωθούν και να διατηρηθούν όσο το δυνατόν περισσότερα βακτήρια ζωντανά, έγινε stock γλυκερόλης 25% αυτών των αποικιών και στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε microtiter plate το οποίο αποθηκεύτηκε στους -80°C .

❖ Η διαδικασία έγινε ως εξής:

- ✓ Παρασκευάστηκε διάλυμα 75 ml Nutrient Broth και 25 ml γλυκερόλης σε τελικό όγκο 100 ml
 - ✓ Το διάλυμα τοποθετήθηκε στον αναδευτήρα για να διαλυθεί καλά η παχύρρευστη γλυκερόλη, μαζί με ένα μαγνητάκι για καλύτερη ανάδευση
 - ✓ Πραγματοποιήθηκε αποστείρωση του διαλύματος στους 120°C για 23 λεπτά
 - ✓ Με τη βοήθεια μιας πιπέτας, υπό ασηπτικές συνθήκες, τοποθετήθηκαν 200 μl του διαλύματος γλυκερόλης σε κάθε ένα από τα πηγαδάκια του microtiter plate
 - ✓ Στη συνέχεια, πάντα υπό ασηπτικές συνθήκες, με αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες, ξύθηκε κάθε επιλεγμένη αποικία από το τρυβλίο και τοποθετήθηκε σε κάθε ένα από τα πηγαδάκια του plate (1 αποικία σε κάθε πηγαδάκι)
 - ✓ Έγινε επώαση του plate στους 30°C για 24 ώρες
 - ✓ Το microtiter plate αποθηκεύτηκε στους -80°C
- ✚ Το microtiter plate περιέχει 96 πηγαδάκια τα οποία είναι αριθμημένα ως εξής: κάθετα με γράμματα του αγγλικού αλφάβητου από το A-H και οριζόντια με αριθμούς από το 1-12. Η ίδια αρίθμηση χρησιμοποιήθηκε και για τις αντίστοιχες αποικίες.

2.3.2 Ανακαλλιέργεια των αποθηκευμένων βακτηρίων

Η ανακαλλιέργεια των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα μέλια, έγινε με σκοπό να ανιχνευθούν ζώνες αναστολής αυτών των βακτηρίων έναντι 2 βακτηριακών στελεχών που εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, δηλαδή των *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa*, όπως προαναφέρθηκε στο τμήμα 1.12. Σε αυτήν την πειραματική διαδικασία, έγινε προσπάθεια να βρεθούν ποιες βακτηριακές αποικίες που απομονώθηκαν από το μέλι εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση, έγινε δηλαδή διαλογή (screening) των αποικιών του microtiter plate.

Παρασκευάστηκε διάλυμα Nutrient Broth 60 ml και στη συνέχεια, μοιράστηκε σε 30 μικρότερα φιαλίδια (vials), 2 ml διαλύματος σε κάθε vial. Τα vials τοποθετήθηκαν στην αποστείρωση στους 120 °C για 23 λεπτά. Αφού αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να κρυώσουν, σε κάθε vial, προστέθηκε με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας και υπό ασηπτικές συνθήκες, μικρή ποσότητα των αποθηκευμένων αποικιών από το microtiter plate. Έγινε επώαση των vials στους 30 °C για 24 ώρες. Έπειτα, με τη χρήση πιπέτας, τοποθετήθηκαν 2,5 ml από κάθε υγρή καλλιέργεια, σε ένα τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar ή TSA. Σε ένα τρυβλίο τοποθετήθηκαν 2,5 ml από 5 διαφορετικά vials, σε αρκετή μεταξύ τους απόσταση, έτσι ώστε να διακρίνονται ξεκάθαρα οι διαφορετικές αποικίες. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 6 τρυβλία. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 30 °C για 16-18 ώρες. Ταυτόχρονα, έγινε καλλιέργεια των μικροοργανισμών-στόχων, δηλαδή του *S. aureus* και της *P. aeruginosa*. Παρασκευάστηκε διάλυμα LB Broth 10 ml και μοιράστηκε σε 2 vials, 5 ml διαλύματος σε κάθε vial. Τα vials τοποθετήθηκαν στην αποστείρωση στους 120 °C για 23 λεπτά. Με τη βοήθεια του μικροβιολογικού κρίκου και πάντα υπό ασηπτικές συνθήκες, τοποθετήθηκε μικρή ποσότητα αυτών των μικροοργανισμών σε κάθε vial (οι μικροοργανισμοί ήταν αποθηκευμένοι σε stock γλυκερόλης στους -80 °C). Οι υγρές καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37 °C για 16-18 ώρες και στη συνέχεια, διατηρήθηκαν στο ψυγείο στους 4 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

❖ *Η διαδικασία διαλογής-εύρεσης βακτηριακών στελεχών με αντιμικροβιακή δράση ήταν η εξής:*

- ✓ Μετά την επώαση των τρυβλίων και των μικροοργανισμών-στόχων, παρασκευάστηκαν 100 ml από το soft agar και τοποθετήθηκαν για αποστείρωση στους 120 °C για 23 λεπτά
 - ✓ Το διάλυμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να φτάσει τους 47 °C περίπου και έπειτα, τοποθετήθηκε μέσα σ' αυτό, με τη βοήθεια πιπέτας, 1 ml του μικροοργανισμού-στόχου
 - ✓ Έγινε καλή ανάδευση ώστε τα κύτταρα να οργανισμού-στόχου να επεκταθούν σε όλη τη μάζα του διαλύματος
 - ✓ Τέλος, πριν το διάλυμα στερεοποιηθεί, τοποθετήθηκε πολύ προσεκτικά μέσα στα τρυβλία με τις ανεπτυγμένες αποικίες μέχρι να τις καλύψει όλες
 - ✓ Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν για επώαση στους 37 °C για 16-18 ώρες
-
- ✚ Για κάθε ένα τρυβλίο που περιείχε τις 5 διαφορετικές αποικίες, έγιναν 2 επαναλήψεις με το soft agar, μία για τον σταφυλόκοκκο και μία για την ψευδομονάδα
 - ✚ Με τον ίδιο τρόπο, έγινε διαλογή (screening), όλων των αποικιών του microtitter plate

2.3.3 Επανάληψη των αποτελεσμάτων

Οι βακτηριακές αποικίες που φάνηκε να εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση κατά την πρώτη φάση του screening, υποβλήθηκαν σε επανάληψη, με σκοπό να αυξηθεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια με αυτή του τμήματος 2.3.2, αυτή τη φορά μόνο με τις αποικίες που έδωσαν ζώνες αναστολής κατά την πρώτη φάση του screening. Για κάθε μία αποικία, έγιναν 3 επαναλήψεις.

2.3.4 Stock γλυκερόλης

Οι βακτηριακές αποικίες που απομονώθηκαν απ' το μέλι και έδωσαν ζώνες αναστολής οι οποίες επιβεβαιώθηκαν και από τις επαναλήψεις, διατηρήθηκαν σε stock γλυκερόλης για να διασωθούν όσο το δυνατόν περισσότερα βακτήρια ζωντανά.

❖ *Η διαδικασία έγινε ως εξής:*

- ✓ Υγρό θρεπτικό μέσο Nutrient Broth τοποθετήθηκε σε μικρά φιαλίδια (vials). Μοιράστηκε η ποσότητα των 5 ml στο κάθε vial όπου αποστειρώθηκε και έπειτα μεταφέρθηκαν με αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες οι πρόσφατα ανεπτυγμένες αποικίες των βακτηρίων
- ✓ Οι υγρές καλλιέργειες επώαστηκαν στους 30 °C για 24 ώρες
- ✓ Έπειτα, σε αποστειρωμένα erpendorf μεταφέρθηκε η ποσότητα των 1,5 ml από το κάθε γυάλινο φιαλίδιο και έγινε φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 3 λεπτά
- ✓ Στη συνέχεια, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε 1 ml από φρέσκο LB Broth και έγινε vortex
- ✓ Έγινε μεταφορά σε cryovials και έπειτα προσθήκη γλυκερόλης 300-350 ml (τελική συγκέντρωση γλυκερόλης 15-20%) και πραγματοποιήθηκε πολύ καλό vortex
- ✓ Τα cryovials παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και στη συνέχεια διατηρήθηκαν στους -80 °C, όπου και παρέμειναν σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

2.4 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA κατά Spilker

Πραγματοποιήθηκε η απομόνωση επαρκούς ποσότητας βακτηριακού DNA, η οποία βασίστηκε στο πρωτόκολλο που προτείνουν οι Spilker et al (2004). Η πειραματική διαδικασία απαιτούσε προηγουμένως την καλλιέργεια των στελεχών σε vials με θρεπτικό μέσο Nutrient Broth και επίστρωση με μικροβιολογικό κρίκο σε τρυβλία με Nutrient Agar.

❖ ***Πραγματοποιήθηκαν τα ακόλουθα βήματα:***

- ✓ Αρχικά προστέθηκαν 20 μl Lysis buffer (SDS 0,25%, NaOH 0,05N) σε eppendorf του 1,5 ml
- ✓ Διακριτές αποικίες, μία για κάθε στέλεχος, απομονώθηκαν από τα τρυβλία και εμβαπτίστηκαν στα eppendorf που περιείχαν Lysis buffer με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας
- ✓ Τα δείγματα, αφού αναδεύτηκαν καλά, τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 95 °C για 15 λεπτά, έτσι ώστε να γίνει λύση των κυττάρων, δηλαδή να «σπάσουν» τα κύτταρα
- ✓ Στη συνέχεια, προστέθηκαν 180 μl αποστειρωμένου απιονισμένου νερού
- ✓ Αφού αναδεύτηκαν καλά με τη βοήθεια της πιπέτας, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 4000rpm για 15 λεπτά. Με τον τρόπο αυτό, όλα τα πρωτεϊνικά κατάλοιπα καταβυθίστηκαν ενώ τα νουκλεϊκά οξέα παρέμειναν διαλυμένα στο υπερκείμενο
- ✓ Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, αποθηκεύτηκαν στους -20 °C για μελλοντική χρήση, χωρίς μεταφορά του υπερκειμένου σε άλλο eppendorf

2.4.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης DNA ανά δείγμα

Μετά την απομόνωση των προϊόντων ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός με τη διαδικασία της φασματοφωτομέτρησης, προκειμένου να διαπιστωθεί η συγκέντρωση DNA (ng/μl DNA) που περιεχόταν σε κάθε δείγμα.

Η φασματοφωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε μετά από αραίωση 2 μl PCR προϊόντος σε 198 μl ddH₂O (αραίωση 1/100), στα 260nm. Οι τιμές της απορρόφησης ανάγονται σε συγκέντρωση DNA, η οποία στην προκειμένη περίπτωση έπρεπε να είναι τουλάχιστον 100 ng/μl για τις ανάγκες της αλληλούχισης.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων προέκυψαν σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$C \text{ (mg/ml)} = OD_{260\text{nm}} \times \text{συντελεστής αραίωσης} \times 50$$

όπου: συγκέντρωση DNA = οπτική απορρόφηση στα 260nm × συντελεστής αραίωσης (100) × 50

2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια μέθοδος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας DNA, μέσω ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών όπως το βακτήριο *E. coli* ή οι ζύμες.

Η PCR είναι μια *in vitro* μέθοδος και μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς περιορισμούς στη μορφή του χρησιμοποιούμενου DNA. Μπορεί ακόμα να διαφοροποιηθεί εκτενώς για την πραγματοποίηση ποικίλων μεθόδων γενετικής επέμβασης. Με τη χρήση της, συγκεκριμένα θραύσματα DNA μπορούν να κλωνοποιηθούν σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα απουσία ζωντανών κυττάρων (Bartlett & Stirling, 2003).

Με την PCR, μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι δισεκατομμύρια φορές, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του ακολουθία. Η αλληλουχία του γονιδίου ή του θραύσματος DNA είναι απαραίτητη για τον σχεδιασμό των συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων, το καθένα συμπληρωματικό με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Τα ολιγονουκλεοτίδια που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινήτρες πρέπει να δεσμεύονται σε θέσεις αντίθετες από την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί, με άλλα λόγια καθορίζουν τα άκρα του θραύσματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί (Bustin, 2000).

Με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση του γενετικού τόπου 16S rRNA. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ο συγκεκριμένος γενετικός τόπος επιλέχθηκε, γιατί είναι ο πιο συντηρημένος μεταξύ των βακτηριακών στελεχών, άρα και ο πιο εξειδικευμένος για την ταυτοποίηση βακτηρίων (Spilker et al, 2004). Τα δείγματα ενισχύθηκαν με τη χρήση δυο εκκινήτων, ενός αριστερού

(forward primer), τον 27Fa και ενός δεξιού (reverse primer), τον 1492R. Το προϊόν της ενίσχυσης είναι περίπου 1500bp.

Πίνακας 2. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR.

Εκκινητές	Αλληλουχίες	Ενισχυμένο τμήμα (bp)
27Fa	5'-TC(CT)GGTTGATCCTG(CG)CGG-3'	
		1500
1492R	5'-ACGG(ATC)TACCTTGTACGACTT-3'	

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25 μ l, όπου περιέχονταν 1 μ l DNA στόχου, 250 μ M dNTPs, 0,5 μ M από τον κάθε εκκινητή, 1 unit Taq DNA πολυμεράσης, 2 mM MgCl₂ και 5 μ l 1 \times PCR buffer όπως προβλέπεται από τον κατασκευαστή.

Πίνακας 3. Αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων.

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση (stock)	Τελική συγκέντρωση
Buffer	5 \times	1 \times
dNTPs	25 mM	250 μ M
27Fa	26,9 μ M	0,5 μ M
1492R	32,6 μ M	0,5 μ M
MgCl₂	25 mM	2 mM
Taq	5 u/ml	1 unit

Η σύσταση του μίγματος (master mix) που χρησιμοποιήθηκε, για την πραγματοποίηση μιας αντίδρασης, είναι η ακόλουθη:

Πίνακας 4. Σύσταση του master mix ανά αντίδραση.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
Buffer	5 μ l
dNTPs	0,25 μ l
27Fa	0,46 μ l
1492R	0,38 μ l
MgCl₂	2 μ l
Taq	0,2 μ l
DNA	1 μ l
ddH₂O	15,71 μ l
Τελικός όγκος	25 μ l

Προκειμένου να καθοριστούν η βέλτιστη συγκέντρωση του DNA και ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης, πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι με χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων του DNA-στόχου, εφαρμόζοντας διαδοχικά αυξανόμενο αριθμό κύκλων PCR. Η κάθε αντίδραση τελικά επαναλήφθηκε για 30 κύκλους και η ποσότητα DNA που χρησιμοποιήθηκε κυρίως ήταν αυτή στα 1 μ l.

Η διαφορά που προκαλούσε η μεταβολή της ποσότητας του DNA-στόχου στον τελικό όγκο του master mix, καλυπτόταν με την προσθήκη ή αφαίρεση συγκεκριμένης ποσότητας απιονισμένου νερού. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμοκυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler.

Επίσης, ετοιμάστηκαν και δύο επιπλέον δείγματα, που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικό (P) και αρνητικό (N) control αντίστοιχα. Το θετικό control που χρησιμοποιήθηκε ήταν το χρωμοσωμικό DNA της *Pseudomonas entomophila* και το αρνητικό control το dH₂O (ίδια ποσότητα με τα δείγματα του DNA-στόχου του δείγματος). Η εμφάνιση ή όχι του θετικού control θα προσδιορίσει κατά πόσο τεχνικά λειτουργεί η PCR, ενώ η εμφάνιση του αρνητικού control θα σημαίνει κάποια επιμόλυνση. Άρα, το ιδανικό αποτέλεσμα θα είναι η εμφάνιση του P και όχι του N.

Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια:

- Αποδιάταξη του DNA (denaturation)
- Προσαρμογή των εκκινήτων στο DNA εκμαγείο (annealing)

➤ Επιμήκυνση των εκκινητών (extension)

Ένας πλήρης τέτοιος κύκλος περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες και γίνεται στις μέρες μας αυτόματα από ειδικά μηχανήματα, τους θερμοκυκλοποιητές (thermal cyclers). Σε μία τυπική αντίδραση, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 94 °C. Στη συνέχεια, οι εκκινητές σε περίσσεια προσαρμόζονται με υβριδισμό στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA εκμαγείου με ψύξη του δείγματος στους 50-60 °C. Ακολουθεί επώαση στους 72 °C για την επιμήκυνση των εκκινητών από μια θερμοανθεκτική πολυμεράση, παρουσία τεσσάρων νουκλεοτιδίων.

Καθώς η διαδικασία επαναλαμβάνεται, οι νεοσύστατοι κλώνοι με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για την *in vitro* σύνθεση του DNA. Μετά από μερικούς κύκλους το επικρατές προϊόν είναι ένα DNA θραύσμα, το μέγεθος του οποίου αντιστοιχεί στην μεταξύ των δυο αρχικών εκκινητών απόσταση. Στην πράξη, 20-30 κύκλοι της αντίδρασης είναι αρκετοί για την αποτελεσματική ενίσχυση του DNA θραύσματος. Σε κάθε κύκλο που διαρκεί περίπου 5 λεπτά, η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται. Η όλη διαδικασία κλωνοποίησης ενός DNA θραύσματος σε ένα *in vitro* σύστημα (χωρίς κύτταρα) διαρκεί μερικές ώρες, σε σχέση με τις μερικές μέρες που απαιτούνται για τις *in vivo* διαδικασίες κλωνοποίησης (Richlik et al, 1990).

Ο γενετικός τόπος 16S rRNA ενισχύθηκε στις παρακάτω συνθήκες:

- ✓ Αρχική αποδιάταξη του DNA: 94 °C για 5 min
- ✓ Αποδιάταξη του DNA: 94 °C για 1 min
- ✓ Προσαρμογή εκκινητών στο DNA: 57 °C για 30 sec
- ✓ Επιμήκυνση εκκινητών: 72 °C για 90 sec
- ✓ Τελική επιμήκυνση: 72 °C για 10 min

✚ Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε στους 30 κύκλους.

2.6 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι η ηλεκτροχημική μέθοδος διαχωρισμού ηλεκτρικά φορτισμένων σωματιδίων (συνήθως πρωτεϊνικής ή νουκλεϊκής φύσεως), από ένα μίγμα τους (Berg et al, 2002).

Κατά την ηλεκτροφόρηση, διοχετεύεται ηλεκτρικό ρεύμα μέσω ηλεκτροδίων σε ένα μέσο (πηκτή ή και χαρτί) που πάνω του έχει τοποθετηθεί (ή/και ενσωματωθεί) σε ένα σημείο το προς ανάλυση δείγμα. Το αποτέλεσμα είναι ότι τα φορτισμένα σωματίδια κινούνται προς τα ηλεκτρόδια με διαφορετικές ταχύτητες ανάλογα με το φορτίο τους και αντιστρόφως ανάλογα με το μέγεθός τους. Έτσι, τα περισσότερα φορτισμένα και μικρότερα μόρια απομακρύνονται περισσότερο από το αρχικό σημείο, ενώ τα μεγαλύτερα και λιγότερο φορτισμένα απομακρύνονται λιγότερο, οπότε επέρχεται διαχωρισμός παρόμοιος με την χρωματογραφία (Κατής & Μαλιόγκα, 2000).

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθός τους.

Η προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης έγινε με την εξής διαδικασία:

- ✓ Ζυγίστηκαν 0,8 gr αγαρόζης και προστέθηκαν σε φλάσκα με 100 ml διαλύματος Tris-Boric-EDTA (TBE) 1× (τελική συγκέντρωση 0,8% w/v). Το αρχικό διάλυμα TBE 10× είχε προηγουμένως αραιωθεί (10 ml TBE και 90 ml H₂O)
- ✓ Το διάλυμα αναδεύτηκε και θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων για 2 λεπτά μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη
- ✓ Προστέθηκαν 10 μl βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium Bromide Solution, 10 mg/ml) και έγινε ανάδευση. Αυτό έγινε για να είναι εμφανείς οι ζώνες του DNA κατά την παρατήρηση της πηκτής στη λάμπα του υπεριώδους φωτός
- ✓ Το διάλυμα προστέθηκε στο ειδικό καλούπι όπου και παρέμεινε μέχρι να σταθεροποιηθεί
- ✓ Τέλος, η πηκτή αγαρόζης τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη Loading buffer. Πήραμε 6 μl από κάθε PCR προϊόν και προστέθηκαν 2 μl Loading buffer. Ακολούθησε ανάδευση με τη βοήθεια μιας πιπέτας. Η ίδια διαδικασία έγινε και για το Positive control και για το Negative

control. Μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκε και ένας μάρτυρας, ο Ladder, ποσότητας 3 μ l, ο οποίος και τοποθετήθηκε στο πρώτο πηγαδάκι της συσκευής.

Αναμειγνύουμε το δείγμα του DNA με 6 \times Loading buffer. Αυτό επιτρέπει να βλέπουμε πού πάει το DNA που φορτώνουμε και στη συνέχεια πόσο πολύ έχει τρέξει η ηλεκτροφόρηση. Επίσης, επειδή είναι ιζώδες (γλυκερόλη ή άλλα ιζώδη διαλύματα), οδηγούν το DNA στον πάτο του πηγαδιού. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 110 volts και ακολούθησε παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους φωτός.

2.7 Καθαρισμός προϊόντων PCR

Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολούθησε ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR, προκειμένου να σταλθούν για αλληλούχιση. Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν από τους εκκινητές, τα νουκλεοτίδια, την πολυμεράση και τα άλατα, με τη χρήση PCR clean-up gel extraction, το Nucleospin Extract II της εταιρίας Macherey-Nagel (Germany).

2.8 Αλληλούχιση του 16S rRNA γονιδίου και ανάλυση των αλληλουχιών

Τα προϊόντα PCR, στάλθηκαν για αλληλούχιση στο τμήμα Ιστολογίας – Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με σκοπό τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του γενετικού τύπου 16S rRNA για κάθε βακτηριακό στέλεχος που εμφάνισε ζώνη αναστολής.

Μετά την αλληλούχιση, ακολούθησε η σύγκριση των αλληλουχιών με βάση δεδομένων, χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο *BLAST* και το πρόγραμμα RPD (Ribosomal Database Project), με τελικό στόχο την

ταξινόμηση, εάν αυτή ήταν δυνατή, των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών σε κάποιο γένος ή είδος.

Ο αλγόριθμος *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*), χρησιμοποιείται για τη σύγκριση μιας αλληλουχίας νουκλεοτιδίων με μια βάση δεδομένων ώστε να βρεθούν οι αλληλουχίες με τη μεγαλύτερη ομολογία (ομοιότητα) (Altschul et al, 1990).

Το πρόγραμμα RPD εμφανίζει την κατάταξη του βακτηρίου και καταλήγει με το ποιο είναι τελικά το ζητούμενο γένος του βακτηρίου.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- ✓ Έγινε εισαγωγή της παρακάτω διεύθυνσης στο διαδίκτυο:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- ✓ Επιλέξαμε *BLAST with bacterial genomes*
- ✓ Εισαγάγαμε την επιθυμητή αλληλουχία
- ✓ Επιλέξαμε *Bacteria → BLAST ALL*
- ✓ Επιλέξαμε *View report* και μετά από λίγα λεπτά αναζήτησης εμφανίστηκαν τα αποτελέσματα *sequences producing significant alignments*, ενώ ταυτόχρονα εμφανίζονται και οι τιμές *Max.score* και *E-value*.

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Καταμέτρηση βακτηριακών αποικιών

Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία, έγινε επιλογή κάποιων από αυτές, με σκοπό να απομονωθούν και να αποθηκευτούν σε microtitter plate. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, απομονώθηκαν 192 αποικίες, όσες δηλαδή χωράνε σε 2 microtitter plates. Ωστόσο, οι αποικίες που αναπτύχθηκαν ήταν πολύ περισσότερες. Στον παρακάτω πίνακα, φαίνεται ο συνολικός αριθμός αποικιών από κάθε δείγμα που μελετήθηκε, και για τις 6 επαναλήψεις.

Πίνακας 5.

Δείγμα μελιού	Σύνολο αποικιών
2 – Έλατο Μαινάλου	46
3 – Έλατοβανίλια	9
6 – Καστανιά	23
7 – Πευκόμελο	36
8 – Μέντα, Τσάι, Ρίγανη	14
9 – Ακακία	19
10 – Αγριοβότανα, Θυμάρι	105
13 – Κρόκος	19
15 – Πολύκομβος	29
16 – Ευκάλυπτος	3
22 – Γυρεόκοκκοι, Θυμάρι	27
23 – Καστανιά (με λίγο πεύκο)	19
25 – Τσάι, Ρίγανη	51
30 – Βελανιδιά	15

3.2 Microtiter Plate

Όπως προαναφέρθηκε, συμπληρώθηκαν με αποικίες 2 microtiter plates, οι οποίες προέρχονταν από διαφορετικά δείγματα του μελιού. Στον παρακάτω πίνακα, φαίνονται πόσες αποικίες αποθηκεύτηκαν σε κάθε plate και από ποιο δείγμα.

Πίνακας 6.

Microtiter plate No 1 (I)

Plate	Αριθμός αποικιών	Δείγμα Μελιού
A1-B12	24	10
C1-C12	12	8
D1-D9	9	3
D10-D12	3	16
E1-E10	10	22
E11-F2	4	9
F3-F6	4	13
F7-G5	11	30
G6-H12	19	25

Microtiter plate No 2 (II)

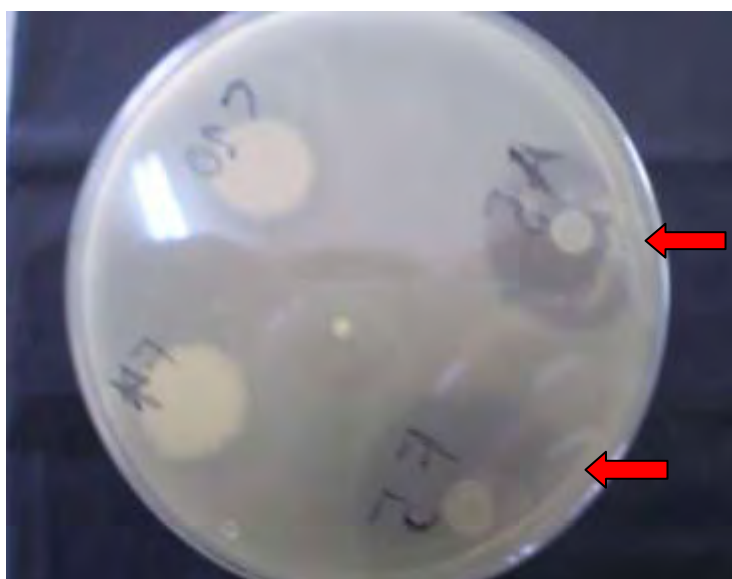
Plate	Αριθμός αποικιών	Δείγμα Μελιού
A1-A12	12	6
B1-C5	17	23
C6-D7	14	8
D8-E12	17	15
F1-G12	24	2
H1-H12	12	7

3.3 Αναστολή

Αυτές οι 192 βακτηριακές αποικίες, ελέγχθηκαν για το αν αναστέλλουν τα βακτήρια *Pseudomonas aeruginosa* & *Staphylococcus aureus*. Στον πίνακα που ακολουθεί, φαίνεται πόσες αποικίες έδωσαν ζώνες αναστολής έναντι των δύο αυτών βακτηρίων-στόχων και από ποια δείγματα μελιού προέρχονται.

Πίνακας 7.

Αποικίες με αναστολή	Δείγμα Μελιού	Plate
1 για <i>S. aureus</i>	2	No 2 (II): F5
2 για <i>S. aureus</i>	3	No 1 (I): D1, D2
1 για <i>S. aureus</i>	6	No 2 (II): A3
2 για <i>S. aureus</i>	8	No 1 (I): C10 No 2 (II): D1
5 για <i>S. aureus</i> & 1 για <i>P. aeruginosa</i>	10	No 1 (I): A1, A5, A8, A9, B1 για <i>S. aureus</i> & A10 για <i>P. aeruginosa</i>
2 για <i>S. aureus</i>	13	No 1 (I): F5, F6
4 για <i>S. aureus</i>	15	No 2 (II): E6, E7, E9, E11
3 για <i>S. aureus</i>	25	No 1 (I): G8, G9, H12
2 για <i>S. aureus</i>	30	No 1 (I): F8, G3



Εικόνα 1.



Εικόνα 2.



Εικόνα 3.

- ✚ Στις εικόνες, οι ζώνες αναστολής που εμφανίζουν μερικές από τις αποικίες, σημαίνονται με κόκκινα βέλη

3.4 Αποτελέσματα επαναλήψεων

Για να αυξηθεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, επιστρώθηκαν επαναληπτικά τρυβλία, αυτή τη φορά, μόνο με τις αποικίες που εμφάνισαν αναστολή κατά το πρώτο στάδιο του πειράματος. Από αυτά, επιβεβαιώθηκαν οι ζώνες αναστολής για 15 δείγματα βακτηριακών

αποικιών έναντι του *Staphylococcus aureus*, από τα αρχικά 22 (οι υπόλοιπες 7 έδωσαν ψευδώς θετικά αποτελέσματα) και η μοναδική αποικία που φάνηκε να εμφανίζει ζώνη αναστολής έναντι του *Pseudomonas aeruginosa*, κατά το στάδιο των επαναλήψεων δεν εμφάνισε αναστολή, υποδεικνύοντας ψευδώς θετικό αποτέλεσμα.

3.4.1 Διάμετρος αναστολής

Με τη βοήθεια ενός χάρακα, μετρήθηκε η ακτίνα καθεμιάς ζώνης αναστολής και για τις 15 επιβεβαιωμένες αποικίες και υπολογίστηκε η διάμετρος, η οποία παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 8.

Αποικίες	Διάμετρος Αναστολής
A3 (II)	1,6 cm
E6 (II)	1,6 cm
F5 (II)	2,4 cm
G9 (I)	1,4 cm
C10 (I)	0,6 cm
A8 (I)	0,4 cm
B1 (I)	1,6 cm
A5 (I)	1 cm
F5 (I)	1,4 cm
F8 (I)	1,4 cm
G8 (I)	1,4 cm
H12 (I)	1,2 cm
E7 (II)	1,6 cm
E9 (II)	1 cm
E11 (II)	0,6 cm

3.5 Αποτελέσματα φασματοφωτομέτρησης

Σε ορισμένα δείγματα, μετά την απομόνωση του βακτηριακού DNA χρειάστηκε να γίνει προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA, με φασματοφωτομέτρηση, με σκοπό να προσδιοριστούν οι ποσότητες για την PCR. Οι συγκεντρώσεις που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα είναι οι εξής:

- ✓ E11 (II) —————> 190 ngr/μl
- ✓ E7 (II) —————> 305 ngr/μl
- ✓ F5 (II) —————> 120 ngr/μl
- ✓ F8 (I) —————> 65 ngr/μl
- ✓ F5 (I) —————> 295 ngr/μl
- ✓ H12 (I) —————> 125 ngr/μl
- ✓ A8 (I) —————> 10 ngr/μl
- ✓ G8 (I) —————> 550 ngr/μl
- ✓ F5 (I) —————> 50 ngr/μl

3.6 Μοριακή ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών

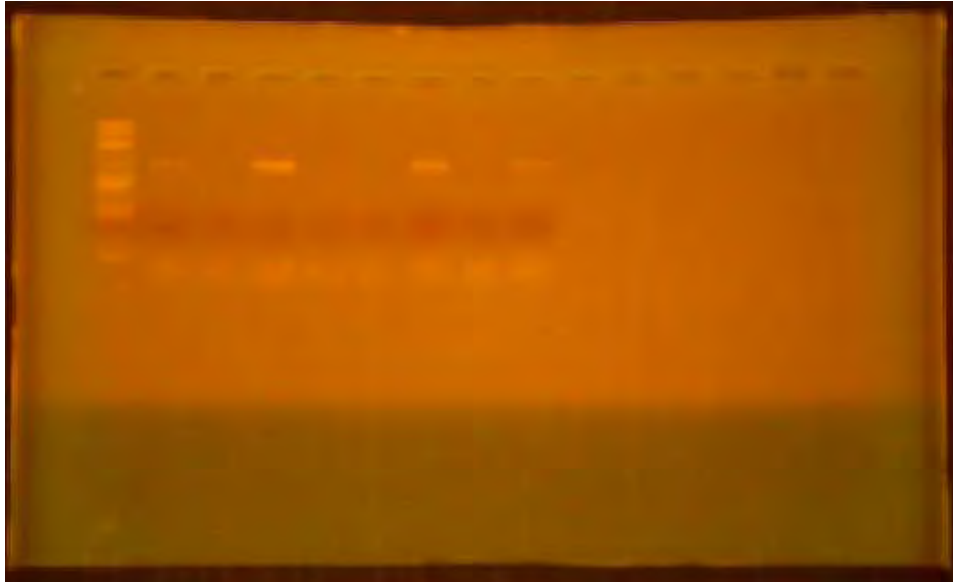
Η ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν βασίστηκε στην ενίσχυση του γενετικού τόπου 16S rRNA με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και στην αλληλούχιση αυτού για τον ακριβή προσδιορισμό της ταυτότητάς του.

Επιπλέον, προτού τα προϊόντα αναλυθούν ως προς την αλληλουχία τους, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, για να διαπιστωθεί εάν είχε ενισχυθεί το επιθυμητό τμήμα μεγέθους περίπου 1500bp. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το gel αγαρόζης παρατηρήθηκε σε λάμπα υπεριώδους φωτός και βάσει ενός μάρτυρα μοριακού βάρους που ηλεκτροφορήθηκε μαζί με τα προϊόντα PCR εξακριβώθηκε το αποτέλεσμα της αντίδρασης, η ενίσχυση δηλαδή του γενετικού τόπου 16S rRNA.

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 4) παρουσιάζονται κάποια από τα προϊόντα, τα οποία κατά την ηλεκτροφόρηση εμφανίστηκαν στο αναμενόμενο ύψος των 1500 βάσεων περίπου. Στο προτελευταίο πηγαδάκι, «φορτώθηκε» το αρνητικό control (negative control) ενώ στο

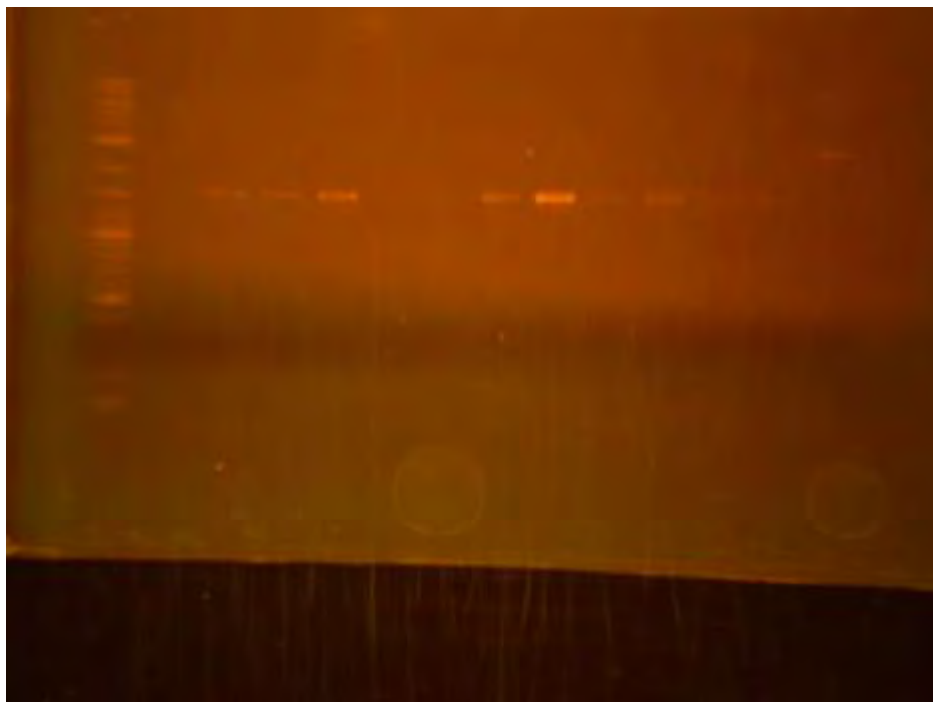
τελευταίο πηγαδάκι το θετικό control (positive control - *Pseudomonas entomophila*). Άρα, το αποτέλεσμα είναι το επιθυμητό, εφόσον δεν έχουμε επιμόλυνση και λειτούργησε το positive control.

1 2 3 4 5 6 7 8 9



Εικόνα 4.

Στο πηγαδάκι 1 φαίνεται ο μάρτυρας, στα πηγαδάκια 2-7 φαίνονται τα δείγματα που φορτώθηκαν, στο προτελευταίο πηγαδάκι βρίσκεται το αρνητικό control και στο τελευταίο το θετικό control.



Εικόνα 5.

- ✚ Στην εικόνα 5, παρουσιάζονται συνολικά, όλα τα προϊόντα των δειγμάτων που στάλθηκαν για αλληλούχιση, μετά από καθαρισμό.
- ✚ Όπως φαίνεται από τις παραπάνω εικόνες, κάποια δείγματα δεν «τρέξανε» στα πηγαδάκια, είτε λόγω υπερβολικής ποσότητας DNA κατά την PCR, είτε λόγω ανεπαρκούς ποσότητας DNA. Τα δείγματα αυτά είναι τα: F5 (II), A8 (I), A5 (I), F8 (I), E7 (II) και E11(II).

3.7 Ταυτοποίηση βακτηρίων που απομονώθηκαν από το μέλι και εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση

Πίνακας 9. Χαρακτηρισμός βακτηρίων που απομονώθηκαν κατά την ανάλυση αλληλουχίας.

ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΜΗΚΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	MAX IDENT
E6 (II)	664	<i>Bacillus pumilus</i> (strain RHS/T- 384)	100%
F5	680	<i>Bacillus pumilus</i> (strain DHC01)	100%
H12	661	<i>Bacillus subtilis</i> (strain CSR-B-4)	100%
B1	630	<i>Pantoea agglomerans</i> (strain 732)	99%
E9 (II)	723	<i>Bacillus mojavensis</i> (strain hswx70)	100%
G9	618	<i>Bacillus pumilus</i> (strain PLK3)	100%

G8	634	<i>Bacillus subtilis</i> (strain CSR-B-4)	99%
A3 (II)	368	<i>Bacillus pumilus</i> (strain CTSP14)	100%
C10	560	<i>Bacillus thuringiensis</i> (strain CtST2.1)	99%

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα η 16S rRNA ταυτοποιεί σε επίπεδο είδους μόνο στελέχη βακτηρίων που παρουσιάζουν πολύ μεγάλη ομοιότητα ≥ 99 . Όπως φαίνεται, όλα τα δείγματα ταυτοποιήθηκαν και τα χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

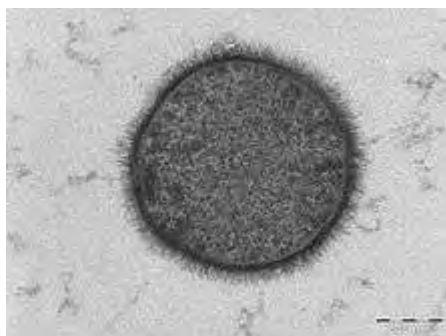
❖ **Bacillus pumilus**

Είναι ένα Gram+ βακτήριο, αερόβιο, που σχηματίζει σπόρια σε σχήμα βάκιλου. Συναντάται στο έδαφος. Τα σπόρια του βακτηρίου, εμφανίζουν υψηλή αντοχή στο περιβαλλοντικό στρες, όπως έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, την ξηρασία και την παρουσία οξειδωτικών παραγόντων, όπως το H₂O₂. Μάλιστα, ένα στέλεχος του βακτηρίου που απομονώθηκε από ένα είδος γαρίδας, βρέθηκε να έχει αντοχή σε υψηλή αλατότητα και να αναστέλλει την ανάπτυξη θαλάσσιων παθογόνων παραγόντων, όπως του *Vibrio alginolyticus*. Άλλα στελέχη χρησιμοποιούνται ως ενεργό συστατικό γεωργικών μυκητοκτόνων (Priest FG, 1993).

❖ **Bacillus subtilis**

Επίσης γνωστό και ως βάκιλος του χόρτου. Είναι Gram+, βρίσκεται συνήθως στο χώμα αλλά έχει ανιχνευθεί και στη φυσιολογική συμβιωτική εντερική χλωρίδα του ανθρώπου. Σπάνια προκαλεί τροφικές δηλητηριάσεις που περιλαμβάνουν έμετο και διάρροια. Μερικά στελέχη παράγουν το πρωτεολυτικό ένζυμο σουμπτιλινάση. Τα σπόρια του βακτηρίου εμφανίζουν μεγάλη αντοχή στη θερμότητα. Αυτή η ιδιότητα

κάνει τον μικροοργανισμό έναν τέλειο υποψήφιο για προβιοτικές εφαρμογές είτε στα ψημένα τρόφιμα και παστεριωμένα ποτά και τρόφιμα ή σε άλλες μορφές όπως τρόφιμα σε σκόνη. Το στέλεχος R079 έχει καλά τεκμηριωθεί για τα προβιοτικά του οφέλη και χρησιμοποιείται στη συντήρηση τροφίμων (Hong H.A. et al, 2009).



Bacillus subtilis

❖ **Pantoea agglomerans**

Είναι ένα Gram- βακτήριο και ανήκει στο γένος των εντεροβακτηρίων. Είναι γνωστό ότι αποτελεί ευκαιριακό παθογόνο σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και προκαλεί λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, μολύνει τραύματα και αίμα. Βρίσκεται συνήθως στην επιφάνεια των φυτών, των σπόρων και των φρούτων (πχ μανταρίνι, πορτοκάλι). Το συγκεκριμένο βακτήριο δεν χρησιμοποιεί τα αμινοξέα λυσίνη και αργινίνη και αυτό το κάνει να ξεχωρίζει από άλλα βακτήρια του γένους (Winn *et al*, 2006).

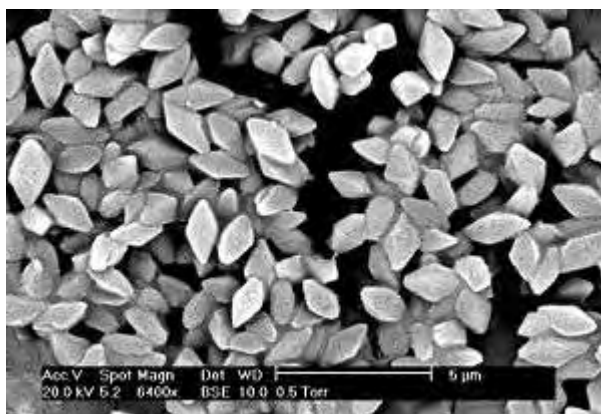
❖ **Bacillus mojavensis**

Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι ένας αριθμός στελεχών που απομονώθηκε από δείγματα εδάφους της ερήμου, φάνηκε να αντιστοιχεί σε άγνωστα βακτήρια, για τα οποία προτάθηκε η παραπάνω ονομασία. Με βάση δεδομένα από αποτελέσματα περιορισμού πέψης, τα βακτήρια αυτά φάνηκε να εμφανίζουν στενή σύνδεση με τον *Bacillus subtilis*. Το παρόν βακτήριο διακρίνεται από τον *Bacillus subtilis* από διαφορές στη σύστασή τους σε λιπαρά οξέα, σε αποκλίσεις της γενετικής ακολουθίας

και στην αντίσταση στη γενετική τροποποίηση σε σχέση με τον *Bacillus subtilis*. Είναι ενδοφυτικό βακτήριο και καταστέλλει τον μύκητα *Fusarium moniliforme*, ένα παθογόνο του καλαμποκιού και άλλων φυτών. Έχει μεγάλες δυνατότητες ως προβιοτικό προϊόν καθώς είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό σε σκληρές περιβαλλοντικές συνθήκες (Charles W. Bacon, Dorothy M. Hinton, 2001).

❖ **Bacillus thuringiensis**

Είναι ένα Gram+ βακτήριο του εδάφους που χρησιμοποιείται συνήθως ως βιολογικό φυτοφάρμακο. Κατά τη διάρκεια της σπορογονίας, πολλά στελέχη παράγουν κρυστάλλους που περιέχουν την πρωτεΐνη δ-ενδοτοξίνη, που εμφανίζει εντομοκτόνο δράση. Η τοξίνη διαλυτοποιείται στο έντερο των εντόμων (προνύμφες), σχηματίζοντας πόρους και οδηγώντας το έντομο στο θάνατο. Πρόσφατα, έρευνες φαίνεται να ενέπλεξαν το βακτήριο αυτό με το φαινόμενο διαταραχής κατάρρευσης κατοικίας, το οποίο επηρεάζει τις κυψέλες των μελισσών (Roh, JY, 2007).



Bacillus thuringiensis

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το μέλι είναι το προϊόν που παράγουν οι μέλισσες από το νέκταρ των φυτών, το οποίο μαζεύουν και τροποποιούν για την τροφή τους σε ένα πυκνότερο υγρό, το οποίο τελικά αποθηκεύουν στις κηρήθρες τους και αποτελεί μια πολύτιμη φυσική θρεπτική τροφή. Το μέλι δεν είναι απλά μια γλυκαντική ουσία, αλλά είναι πλούσιο σε απλά σάκχαρα και ένα πλήθος άλλων στοιχείων. Ακόμη, εμφανίζει αξιοσημείωτες αντιμικροβιακές ιδιότητες.

Στην παρούσα μελέτη, έγινε απομόνωση βακτηρίων που προέρχονται από διάφορα Ελληνικά μέλια και εξετάστηκε ποια από αυτά εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση.

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος σε 14 δείγματα μελιού (2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 15, 16, 22, 23, 25 και 30), από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου. Τα δείγματα αυτά, επιλέχθηκαν ανάμεσα σε 31 συνολικά δείγματα μελιών, διότι, σύμφωνα με προηγούμενη έρευνα, αυτά τα 14 δείγματα εμφάνισαν το μεγαλύτερο βακτηριακό φορτίο από τα υπόλοιπα. Ο έλεγχος αφορούσε την ύπαρξη τόσο Gram+ όσο και Gram- βακτηριακών στελεχών, που απομονώθηκαν από τα θρεπτικά υποστρώματα *Bacillus cereus medium* και *Plate count agar*, στα διάφορα δείγματα μελιού. Επίσης, ελέγχθηκε ποια από αυτά τα βακτήρια εμφανίζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι των παθογόνων για τον άνθρωπο βακτηρίων *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa* και μετρήθηκε η διάμετρος αναστολής. Τέλος, με τη βοήθεια της PCR, πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση κάποιων από αυτά. Η ταυτοποίηση έγινε με το 16S rRNA.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 7 από τα δείγματα των μελιών περιέχουν βακτήρια που εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση. Συνολικά, 15 αποικίες, από τις 192 που απομονώθηκαν και ελέγχθηκαν, έδειξαν να αναστέλλουν την ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus* και καμία αποικία δεν φάνηκε να αναστέλλει την ανάπτυξη της *Pseudomonas aeruginosa*. Από τους παραπάνω αριθμούς, προκύπτει ότι, περίπου το 7% του συνολικού αριθμού των βακτηριακών στελεχών που ελέγχθηκαν, εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Staphylococcus aureus*. Το εύρος των διαμέτρων αναστολής που μετρήθηκαν κυμαίνεται από 0,4 cm έως 2,4 cm. Το δείγμα F5 (II), εμφάνισε τη μεγαλύτερη διάμετρο

αναστολής (2,4 cm), ωστόσο, δεν εμφανίστηκε ζώνη στο gel αγαρόζης επειδή δεν δούλεψε η PCR για το δείγμα αυτό και άρα δεν ταυτοποιήθηκε.

Ανάλογη έρευνα πραγματοποιήθηκε και στο Cornell University της Νέας Υόρκης, σύμφωνα με την οποία, απομονώθηκαν βακτηριακά στελέχη από διάφορα ενδημικά είδη μελιών των Ηνωμένων Πολιτειών αλλά και από 2 διαφορετικά είδη manuka honey και ελέγχθηκε η αντιμικροβιακή δράση αυτών των στελεχών έναντι κοινών ανθρωποπαθογόνων βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένου και του *S. aureus* (Lee, Churey, Worobo, 2008). Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας έδειξαν ότι στο μέλι από μαύρο βατόμουρο (blackberry), 18 αποικίες από τις 28 συνολικά που απομονώθηκαν εμφάνισαν αναστολή κατά του *S. aureus*, στο μέλι από βαμβάκι, 91 αποικίες από τις 145 εμφάνισαν αναστολή, στο μέλι από ηλιάνθο, αναστολή εμφάνισαν οι 264 από τις 532, στο μέλι από ένα είδος σίκαλης αναστολή είχαν οι 369 από τις 509 ενώ, όσον αφορά τα δείγματα του manuka honey, στο ένα οι 527 αποικίες έδωσαν αναστολή από τις 561 στο σύνολο και στο άλλο έδωσαν οι 118 από τις 218. Ίδιες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν και σε άλλα δείγματα μελιών, 8 στο σύνολο. Συνολικά, από όλα τα δείγματα μελιών, απομονώθηκαν 2398 αποικίες και από αυτές, οι 1605 εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση έναντι του *S. aureus*.

Στην παρούσα μελέτη, τα μέλια από τα οποία απομονώθηκαν αυτές οι αποικίες είναι από κρόκο, από καστανιά, από πολύκομπο, από τσάι-ρίγανη, από αγριοβότανα-θυμάρι, από μέντα-ρίγανη-τσάι και από ελατοβανίλια Μαινάλου. Η ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών έδειξε ότι τα περισσότερα από αυτά ανήκουν στο γένος *Bacillus*, και είναι ως επί τω πλείστον βακτήρια του εδάφους που όμως εμφανίζουν μεγάλη αντοχή σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες (*Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus thuringiensis*). Επίσης, ανιχνεύθηκε και ένα βακτήριο του γένους *Pantoea*, ενός Gram αρνητικού εντεροβακτηρίου, για τα οποία δεν έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι υπάρχουν γενικά στο μέλι. Σε ανάλογες μελέτες, στις οποίες μετρήθηκε το βακτηριακό φορτίο ελληνικών μελιών, βρέθηκε ότι τα ελληνικά μέλια, περιέχουν κυρίως βακτήρια του γένους *Bacillus* αλλά και του γένους *Staphylococcus* (Παπαευαγγέλου, 2011).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εύρεση του βακτηρίου *Bacillus thuringiensis* στο μέλι, το οποίο είναι ένα βακτήριο τεράστιας

οικονομικής και οικολογικής σημασίας λόγω της εντομοπαθογένειας που εμφανίζει και είναι γνωστό ότι χρησιμοποιείται ευρέως ως βιολογικό εντομοκτόνο, περιορίζοντας έτσι τη χρήση φυτοφαρμάκων.

Σε γενικές γραμμές, τα ελληνικά μέλια που εξετάστηκαν φάνηκαν να εμφανίζουν έναν αρκετά ικανοποιητικό αριθμό βακτηριακών αποικιών με αντιμικροβιακή δράση. Τα βακτηριακά στελέχη με αυτή τη δράση που ταυτοποιήθηκαν, ανήκουν σε γένη με εξέχουσες ιδιότητες και αξιόλογα χαρακτηριστικά ενώ ενδιαφέρον προκαλεί και η ύπαρξη ενός Gram αρνητικού βακτηρίου στο μέλι από αγριοβότανα και θυμάρι.

Για τη συνέχιση της δουλειάς, θα πρέπει να γίνει προσπάθεια απομόνωσης και ταυτοποίησης περισσότερων βακτηρίων από το ελληνικό μέλι και να ελεγχθεί η αντιμικροβιακή τους δράση, όχι μόνο σε αυτά τα δύο παθογόνα βακτήρια-στόχους, αλλά και σε άλλα βακτήρια που προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο και εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Ακόμη, ένα σημαντικό βήμα στην πρόοδο της μελέτης, θα ήταν η ταυτοποίηση της ουσίας αυτής που εκκρίνουν τα βακτήρια και η οποία προσδίδει τις αντιμικροβιακές ιδιότητες στα βακτήρια του μελιού.

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Adams CJ, Manley-Harris M, Molan PC (2009). The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr Res* 344:1050-1053.
- 2) Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J of Mol. Biol.* Vol 215 (3):403-410.
- 3) Bartlett J.M., Stirling D. (2003) A short history of the Polymerase Chain Reaction 226.pp 3-6.
- 4) Beetlestone F. (1994) Botulism spores and honey. *Am. Bee. J* 134(7): 471-473.
- 5) Berg J.M., Tymoczko J.L. and Stryer L. (2002) *Biochemistry* (5th ed) WH freeman.
- 6) Berthold R. (1997) Medicinal use of honey in folk medicine. *American Bee Journal* 12 : 872-874.
- 7) Bustin S.A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.
- 8) Charles W. Bacon 1 and Dorothy M. Hinton USDA, Endophytic and Biological Control Potential of *Bacillus mojavensis* and Related Species, ARS, Russell Research Center, Toxicology & Mycotoxin Research Unit, Athens, Georgia 30613-5677, 2001
- 9) Chinou I., Karapati C., Roussis V., Mazavuenos B.E., Chinou E., Golemati-Persidou N. (1998) Volatile constituents from 20 Greek bee-honeys and their antibacterial spectrum 46th Annual Congress, Society for Medicinal Plant Research Vienna.
- 10) Christoph, Ralf; Schmidt, Bernd; Steinberner, Udo; Dilla, Wolfgang; Karinen, Reetta (2006). "Glycerol". *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
- 11) Eva Crane *The Archaeology of Beekeeping*, Cornell University Press (1983) ISBN 0-8014-1609-4.
- 12) Frank J.E. (2004) Historical notes on botulism, *Clostridium botulinum*, notulinumtoxin 19 : 22-26.

- 13) Grogan JB, 1966 *Pseudomonas aeruginosa* carriage in patients. *J Trauma*, 6:639-43.
- 14) Hepburn H.R. (1986) *The nectar flow-An experimental Natural History*. Springer- Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Paris, London pp.199-201.
- 15) Herold, 1970 *Heilwerte aus dem Bienenvolk*, Θεραπευτικές αξίες από το μελίσσι Munchen.
- 16) Hong H.A., Khaneja R., Tam N.M., Cazzato A., Tan S., Urdaci M., Brisson A., Gasbarrini A., Barnes I., Cutting S.M., 2009. *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. *Res. Microbiol.* 160: 134-143.
- 17) Hyungjae Lee, John J. Churey, Randy W. Worobo, *Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey*, Department of Food Science and Technology, New York State Agricultural Experiment Station, Cornell University, 630 W. North St., Geneva, NY 14456, USA, 2008.
- 18) Japanese Government, Ministry of Health, Labour and Welfare (2009, September 30) *The Japanese Pharmacopeia 15th Edition Supplement 2*. Ministerial Notification No. 425, p. 20
- 19) Jenny M. Wilkinson and Heather M.A. Cavanagh, *Antibacterial Activity of 13 Honeys Against Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa*, *School of Biomedical Sciences, Charles Sturt University, Wagga Wagga, New South Wales, Australia*, (1) 2005, 000–000, 2005.
- 20) Joirisch N.P. (1970) *Curative properties of honey and bee renom*. Foreign languages Publishing House. Μετάφραση στα ελληνικά Ν. Τοπαλίδης (Μελισσοκομική Ελλάς) (20) : 42-43, (231) : 84-86, (232) : 115-117, 146-148.
- 21) Khan MO, Montecalvo MA, Davis I, Wormser GP, 2000 *Ecthyma gangrenosum* in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Cutis* 66:121-123.
- 22) Krochmol C. (1999) *Poison honeys*. *Am. Bee. J.* 134(8) : 549-559.
- 23) Larry Gonick *The Cartoon History of the Universe Vol.2* (1990).
- 24) Meier J, White J. (1995). *Clinical toxicology of animal venoms and poisons*. CRC Press, Inc. ISBN 0-8493-4489-1.
- 25) Mollan P, 1998 *A brief review of the use of honey as a clinical dressing*. *Australian J of Management*; 6:148-158.

- 26) Nakano H. and Sakacuchi G. (1991) An unusually heavy contamination of honey products by *Clostridium botulinum* type F and *Bacillus*. *FEMS Microbiol. Lett.* (79) : 171-178.
- 27) Nikaido, H. (2009). The Limitations of LB Medium. Small things considered - The Microbe Blog. ASM.
- 28) Olszowy DR (1977) Of Bees Rhododendrons and Honey. *American Bee Journal* 117, 498-505.
- 29) Priest FG (1993) Systematics and Ecology of *Bacillus*. In: Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R, editors. *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics*. Washington, D.C.: ASM Press. pp. 3–16.
- 30) Robin Dartington (2000) *New Beekeeping in a Long Deep Hive*. Bee Books New & Old.
- 31) Roh, JY; Choi, JY; Li, MS; Jin, BR; Je, YH (2007). "[Bacillus thuringiensis as a specific, safe, and effective tool for insect pest control](#)". *Journal of microbiology and biotechnology* **17** (4): 547–59. [PMID 18051264](#).
- 32) *Roman Cookery* by Mark Grant (Serif, London, 2008).
- 33) Ronald P. Phipps *Bee Culture «International Honey Market - Challenges and Opportunities»*, September 17, 2009.
- 34) Root A.I. (1983) *The ABC and XYZ of bee culture*. The A.I. Root Co., Medina, OH.
- 35) Richlik W., Spencer W.J., Rhoads R.E.(1990) Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucl Acids Res* 18(21) : 6409-6412.
- 36) Seeley T.D. (1985) *Honeybee ecology*. Princeton University Press, USA.
- 37) Snowdon J.A. and Cliver D.O. (1995) Microorganisms in honey, *International Journal of food Microbiology* (31) : 1-26.
- 38) Spilker T., Coenye T., Vandamme P. and Li Puma J.J. (2004) PCR-Based Assay for differentiation of *Pseudomonas Auruginosa* from other *Pseudomonas* Species. *J. clin. Microbial.*
- 39) Vásquez A, Forsgren E, Fries I, Paxton RJ, Flaberg E, et al. (2012) Symbionts as Major Modulators of Insect Health: Lactic Acid Bacteria and Honeybees.
- 40) Wadhan H. (1998) Causes of the antimicrobial activity of honey. *26*(1): 26-31.

- 41) Wells CL, Wilkins TD (1996). *Clostridia: Sporeforming Anaerobic Bacilli* in: *Baron's Medical Microbiology* (Baron S *et al.*, eds.).
- 42) White J.W. Jr, 1993 Honey, in the hive and the honey bee, Dadant and Sons Publication Hamilton-Illinois p. p. 869 – 895.
- 43) White JW Jr, Subers MH, Schepartz AI, 1963 The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochim Biophys Acta*, 73:57-70.
- 44) Wilkins A.L., Yinrong L. (1993) Extractable organic substances from New Zeland Unifloral Mnuka (*Leptospermum Scoparium*) Honey *Journal of Apicultural Research* 32(1) : 3-9.
- 45) Winn, *et al.*; "Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology", Sixth Edition, 2006: Lippincott, Williams, and Wilkins
- 46) Zanber E., Maurizio A., 1984 *Der Honig* ulmer Verlag Stuttgart.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Δερματόπουλος Β., (1949) Βασικές γνώσεις σύγχρονης μελισσοκομίας. Έκδοση Μελισσοκομικού Συνεταιρισμού Θεσσαλονίκης. σελ. 40-41.
- 2) Θρασυβούλου Α., (2001) Πρακτική Μελισσοκομία- Προβλήματα, αιτίες και λύσεις. Θεσσαλονίκη. σελ. 147-156, 171.
- 3) Θρασυβούλου Α. και Μανίκης Ι., (1990) Κατηγορίες Ελληνικού Μελιού 4(6) : 158-163.
- 4) Κατής Ι.Ν., Μαλιόγκα Ι.Β., (2000) Διαγνωστική Ιολογία, Εκδόσεις Γαρταγάνη. σελ. 25-30.
- 5) Μπίκος Θ., (1991) Όλα για το μέλι. Έκδοση του ιδίου. σελ. 263-270.
- 6) Νικολόπουλος Α., Τεντολούρης Ν., Κωστάκη Μ., Κατσιλάμπρος Ν., 2006 Λοιμώξεις στο διαβητικό πόδι *Archives of Hellenic Medicine* 23(3):222-232
- 7) Παππάς Ν., (1998) Η γύρη και η συλλογή της 2(4) : 106-110.
- 8) Παπαευαγγέλου Φωτεινή, Μικροβιακή ποιότητα ελληνικών τύπων μελιού: Πόσο ασφαλή είναι, *Μεταπτυχιακή εργασία*, Λάρισα 2011.

- 9) Σταθόπουλος Κ., (1993) Υγιεινή και διατροφική αξία του μελιού. Πρακτικά εκδήλωσης της επιτροπής προώθησης του Ελληνικού μελιού. Αθήνα
- 10) Τσέλλιος Δ. και Θρασυβούλου Α., (1989) Μελισσοκομικοί χειρισμοί και μελισσοκομικά φυτά 2 (7-8) : 208-220.
- 11) Υφαντίδη Μ., (1983) Μελισσοκομία, επιστήμη και εφαρμογή. Εκδόσεις Τσολακοπούλου, Θεσσαλονίκη. σελ. 56-67.
- 12) Χαριζάνης Π., (1996) Μέλισσα και μελισσοκομική τεχνική. Έκδοση Μελισσοκομική Επιθεώρηση, σελ. 263-267.

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

- <http://en.wikipedia.org/wiki/Honey>
- <http://www.fresh-healthy.gr>
- <http://www.labm.com/>
- <http://goeshealth.com>
- <http://www.prlog.org/>
- <http://science.howstuffworks.com/> Tracy B. Wilson (2007)
- <http://melissokomos.gr>
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Apitoxin>
- <http://www.melissocosmos.com/>
- <https://sites.google.com/site/melisokipos/>
- <http://www.honeygreek.gr/>
- <http://www.greekhoney.gr/>
- <http://www.paseges.gr/el/>
- <http://apitherapy.blogspot.com/>
- <http://www.slu.se/en/>
- <http://www.return2health.net/>
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Glycerol>
- <http://wiki.answers.com/>
- http://en.wikipedia.org/wiki/Nutrient_agar

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1. Στοιχεία μελιών που χρησιμοποιήθηκαν.

Α/Α	ΤΥΠΟΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΠΑΡΑΓΩΓΟΣ
1	ΡΕΙΚΙ ΚΩΝΟΦΟΡΟ	ΜΑΙΟΣ 2009	Δρυμός Σκυρίτιδος Βλαχοκερασιά Αρκαδίας	Ρουμελιώτης Βασίλειος <i>Αρκαδικό Μέλι</i>
2	ΕΛΑΤΟ ΜΑΙΝΑΛΟΥ	ΙΟΥΝΙΟΣ 2010	Λειβιδίου	Ρουμελιώτης Βασίλειος Αρκαδικό Μέλι
3	ΕΛΑΤΟ ΒΑΝΙΛΙΑ ΜΑΙΝΑΛΟΥ	ΙΟΥΝΙΟΣ 2009	Λειβιδίου	Ρουμελιώτης Βασίλειος Αρκαδικό Μέλι
4	ΕΛΑΤΟ ΒΑΝΙΛΙΑ ΜΑΙΝΑΛΟΥ	ΙΟΥΝΙΟΣ 2008	Λειβιδίου	Ρουμελιώτης Βασίλειος Αρκαδικό Μέλι
5	ΚΟΥΜΑΡΙΑ ΚΑΙ ΡΕΙΚΙ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2010	Καλτεζές Αρκαδίας	Ρουμελιώτης Βασίλειος Αρκαδικό Μέλι
6	ΚΑΣΤΑΝΙΑ	ΙΟΥΛΙΟΣ 2009	Άνω Δόλνα Αρκαδίας	Ρουμελιώτης Βασίλειος Αρκαδικό Μέλι
7	ΠΕΥΚΟΜΕΛΟ	2010	Θάσος	Κα.Δρακάκη
8	ΜΕΝΤΑ, ΡΙΓΑΝΗ, ΤΣΑΙ	2010	Δυτικός Όλυμπος	Αρβανίτης <i>Μελίχρυσος</i>
9	ΑΚΑΚΙΑ	2010	Όλυμπος	Αρβανίτης Μελίχρυσος
10	ΑΓΡΙΟΒΟΤΑΝΑ ΚΑΙ ΘΥΜΑΡΙ	2010	Αν.Όλυμπος	Αρβανίτης Μελίχρυσος
11	ΚΟΥΜΑΡΙΑ	2010	Νότιο Πήλιο	Αρβανίτης Μελίχρυσος
12	ΑΝΘΟΜΕΛΟ: ΠΟΛΥΚΟΜΠΟ ΚΑΙ ΚΡΟΚΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2009	Κρόκος Κοζάνης	Λαμπάδας Βάιος
13	ΚΡΟΚΟΣ	ΙΟΥΝΙΟΣ 2010	Κρόκος Κοζάνης	Λαμπάδας Βάιος
14	ΑΝΘΟΜΕΛΟ	ΙΟΥΛΙΟΣ 2010	Βούρικας	Λαμπάδας Βάιος

15	ΠΟΛΥΚΟΜΠΟΣ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2010	Γύρω από λίμνη Κερκίνη, Κεντρική Μακεδονία	Αρβανίτης Μελίχρυσος
16	ΕΥΚΑΛΥΠΤΟΣ	ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ 2010	Επαρχία Λευκωσίας	Κυπριακό μέλι HoneyMell zr.lt.4 Νίκου Δημητρίου 3913 Λάρνακα
17	ΘΥΜΑΡΙ	ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ 2010	Λεμεσός	Κυπριακό μέλι HoneyMell zr.lt.4 Νίκου Δημητρίου 3913 Λάρνακα
18	ΜΑΡΑΘΟΣ	ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ 2010	Επαρχία Λευκωσίας	Κυπριακό μέλι HoneyMell zr.lt.4 Νίκου Δημητρίου 3913 Λάρνακα
19	ΗΛΙΑΝΘΟΣ	2010	Κομοτηνή	Αγροτικός Μελισσοκομικός συναιτερισμός Νικήτης Χαλκιδικής
20	ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ: σχεδόν 80% από άνθη πορτοκαλιάς	2010	Άργος	Αγροτικός Μελισσοκομικός συναιτερισμός Νικήτης Χαλκιδικής
21	ΒΑΜΒΑΚΙ: με 20% περίπου άλλων ανθέων	2010	Σέρρες	Αγροτικός Μελισσοκομικός συναιτερισμός Νικήτης Χαλκιδικής
22	ΘΥΜΑΡΙ: γυρεόκκοκοι 30%	2010	Κρήτη	Αγροτικός Μελισσοκομικός συναιτερισμός Νικήτης Χαλκιδικής
23	ΚΑΣΤΑΝΙΑ με λίγο Πεύκο	2010	Άγιο Όρος	Αγροτικός Μελισσοκομικός συναιτερισμός Νικήτης Χαλκιδικής

24	ΚΟΥΜΑΡΙΑ	2010	Πήλιο	Σαμαράς Γιώργος Κέντρο Μελισσοκομίας Θεσσαλίας (Βόλος) Παραγωγός: Ελευθερία Κασσαβέτη
25	ΤΣΑΙ ΚΑΙ ΡΙΓΑΝΗ	2010	Σούρπη Μαγνησίας	Σαμαράς Γιώργος Κέντρο Μελισσοκομίας Θεσσαλίας (Βόλος)
26	ΜΕΛΙ ΑΝΘΕΩΝ: ΑΓΡΙΑ ΡΙΓΑΝΗ ΚΑΙ ΑΓΡΙΟ ΤΡΙΦΥΛΛΙ	2010	Ορεινά λιβάδια και δάση του Ολύμπου	Σαμαράς Γιώργος Κέντρο Μελισσοκομίας Θεσσαλίας (Βόλος)
27	ΚΑΣΤΑΝΙΑ	2010	Πήλιο	Σαμαράς Γιώργος Κέντρο Μελισσοκομίας Θεσσαλίας (Βόλος) Παραγωγός: Ελευθερία Κασσαβέτη
28	ΈΛΑΤΟ	2010	Δρακότρυπα Ν.Καρδίτσας	Σαμαράς Γιώργος Κέντρο Μελισσοκομίας Θεσσαλίας (Βόλος)
29	ΑΝΘΟΜΕΛΟ	2010	Βασιλίτσα Γρεβενών	Λόλας Πέτρος
30	ΒΕΛΑΝΙΔΙΑ	2010	Πήλιο	Αρβανίτης Μελίχρυσος
31	ΚΟΥΜΑΡΙΑ	2010	Μελιβοία Αρκαδίας	Κα Γιάννα

- Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση:

E6 (II)

AGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
GGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATA
CCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGC
TGTCACCTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG
GCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATG
AAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAAGA
GTAAGTCTTGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTA
TTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC
CCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGA
AGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGG
AGGAACACCAGTGGCGAA

F5

GGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA
ACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGA
TAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCA
CTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCA
CCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGG
GACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC
CGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGT
TTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAAC
TGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG
CGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGC
TCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGG
AGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAC

H12

GGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT
AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGG
ATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACC
ACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTC
ACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG
GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT
TCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAG
GTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGA
ATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATT
GGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC
GGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAG
AGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
GAACACCAGTGGCGAA

B1

CTTGCTCCTTGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGGATC
TGCCCGATAGAGGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATA
ACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCACTATCGGATGA
ACCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGCGGGGTAATGGCCACCTAGGCGACG
ATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACAG
GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC
AAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA
AGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGAGGGGGTTAATAACCCTGTTCGATTG
ACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCAC
GCAGGCGGTCTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAA
CTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCC
AGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGA

E9 (II)

AGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
GGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATA
CCGGATGCTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGC
TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG
GCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC

ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATG
AAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTT
CGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATT
ATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
CCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAAGTTGAGTGCAG
AAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTG
GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAG
GAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGA

G9

ACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCT
AATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTT
CGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGT
AATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGC
GAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA
GCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAAAGTTGAGTGC
AGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATG
TGGAGGAACACCAGTGGCGAA

G8

GGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT
AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGG
ATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACC
ACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAYGGCTC
ACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG
GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT
TCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAG
GTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCTGA
ATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCCGCGGTAAACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATT
GGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC

GGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAG
AGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA

A3 (II)

CTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCT
GCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGT
TCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTA
CAGATGGACCCGCGGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAA
GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC
AATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTC
GGATCGTAAAGCTCTGTTGT

C10

AACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG
GGCTAATACCGGATAAYATTTTGAAGTGCATGGTTTCGAAATTGAAAGGCG
GCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGA
GGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG
AGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAG
TGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATC
CGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTTCTTAAGTCTGATGT
GAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTG
AGTGCAGAAGAGG