

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ - ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

Κουβάτση Αντωνία

**«Αναστολή της παραγωγής μολυσματικών παραγόντων
(virulence factors) από την *Pseudomonas aeruginosa*
παρουσία μελιού»**

Λάρισα 2013

Αναστολή της παραγωγής μολυσματικών παραγόντων (virulence factors) από την
Pseudomonas aeruginosa παρουσία μελιού

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Μόσιαλος Δημήτριος (επιβλέπων): 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 Δημήτρης: Επίκουρος καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Με το πέρας της εργασίας αυτής και τη συγγραφή της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι υποχρέωση μου να ευχαριστήσω τους ανθρώπους εκείνους οι οποίοι με βοήθησαν και συνέβαλαν, με οποιονδήποτε τρόπο, στην πραγματοποίησή της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Μόσιαλο Δημήτρη για το αμείωτο ενδιαφέρον, την πολύτιμη καθοδήγηση καθ' όλη την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, την αμέριστη συμπαράσταση που μου έδειξε όλο αυτό το διάστημα της συγγραφής καθώς και τις πολύτιμες συμβουλές του οι οποίες ήταν καταλυτικές για την εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα μέλη της επιτροπής κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη και κ. Καρπούζα Δημήτριο.

Επίσης, ευχαριστώ τους γονείς μου που με στηρίζουν όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου, τα αδέρφια μου, τον φίλο μου Βασίλη και γενικά όλους τους δικούς μου ανθρώπους που ο καθένας με τον τρόπο του, συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της προσπάθειάς μου. Τέλος, ευχαριστώ τους συναδέλφους μου και την ομάδα του εργαστηρίου κοντά στους οποίους εργάστηκα, για τη φιλική ατμόσφαιρα, ηθική συμπαράσταση και τη συνεργασία τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|----|
| Περίληψη | 7 |
| Abstract..... | 9 |
| 1. Εισαγωγή | 10 |
| 1.1. Τι είναι μέλι..... | 10 |
| 1.2. Διατροφική αξία μελιού..... | 11 |
| 1.3. Ευεργετικές δράσεις του μελιού στον άνθρωπο..... | 12 |
| 1.4. Είδη μελιού | 13 |
| 1.4.1. Πεύκο – <i>Pinus halepensis</i> (κοινό πεύκο), (μελίτωμα)..... | 15 |
| 1.4.2. Ερείκη – <i>Erica multipolyflora</i> (φθινοπωρινή σουσούρα), (νέκταρ)..... | 15 |
| 1.4.3. Κουμαριά – <i>Arbutus unedo</i> , (νέκταρ)..... | 16 |
| 1.4.4. Ακακία – <i>Robinia pseudoacacia</i> , (νέκταρ)..... | 16 |
| 1.4.5. Μέλι ανθέων, (νέκταρ) | 16 |
| 1.4.6. Πορτοκαλιά – <i>Citrus aurantium</i> , (νέκταρ)..... | 16 |
| 1.4.7. Βαμβάκι – <i>Gossypium hirsutum</i> , (νέκταρ) | 17 |
| 1.4.8. Βελανιδιά – <i>Quercus macrolepis</i> , (μελίτωμα) | 17 |
| 1.4.9. Έλατο – <i>Abies sp.</i> , (μελίτωμα)..... | 17 |
| 1.4.10. Ηλίανθος – <i>Helianthus annuus</i> , (νέκταρ)..... | 18 |
| 1.4.11. Καστανιά – <i>Castanea sativa</i> | 18 |
| 1.4.13. Σιδηρίτης ή τσάι του βουνού – <i>Sideritis spp.</i> , (νέκταρ) | 18 |
| 1.4.14. Πολύκομβος – <i>Polygonum spp.</i> , (νέκταρ)..... | 18 |
| 1.4.15. Ευκάλυπτος – <i>Eucalyptus spp.</i> , (νέκταρ) | 19 |
| 1.4.16. Θυμάρι – <i>Thymus sp.</i> , (νέκταρ)..... | 19 |
| 1.5. Το μέλι ως αντιμικροβιακός παράγοντας..... | 19 |
| 1.6. Αντιβακτηριακή δράση μελιού | 21 |
| 1.7. Μέλι Manuka και άλλα αντιβακτηριακά μέλια..... | 22 |
| 1.8. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 23 |
| 1.9. Σκοπός της παρούσας μελέτης | 28 |
| 2. Πειραματικό μέρος..... | 29 |
| 2.1. Υλικά..... | 29 |
| 2.1.1. Δείγματα μελιών | 29 |

| | |
|---|-----------|
| 2.1.2. Αντιδραστήρια | 30 |
| 2.1.3. Συνθετικό μέλι..... | 31 |
| 2.2. Μέθοδοι..... | 31 |
| 2.2.1. Προετοιμασία καλλιέργειας <i>P.aeruginosa</i> | 31 |
| 2.2.2. Έλεγχος της επίδρασης των μελιών στην πρωτεόλυση που προκαλεί η <i>P.aeruginosa</i> | 31 |
| 2.2.3. Έλεγχος της επίδρασης των μελιών στην παραγωγή πυοβερδίνης από την <i>P.aeruginosa</i> | 32 |
| 2.2.4. Έλεγχος της επίδρασης των μελιών στην παραγωγή πυοκυανίνης από <i>P.aeruginosa</i> | 33 |
| 3. Αποτελέσματα | 34 |
| 3.1. Αποτελέσματα της επίδρασης των μελιών στην πρωτεόλυση που προκαλεί η <i>P.aeruginosa</i> | 34 |
| 3.2. Αποτελέσματα της επίδρασης των μελιών στην παραγωγή πυοβερδίνης από την <i>P.aeruginosa</i> | 36 |
| 3.3. Αποτελέσματα της επίδρασης των μελιών στην παραγωγή πυοκυανίνης από την <i>P.aeruginosa</i> | 38 |
| 4. Συζήτηση | 41 |
| 5. Βιβλιογραφία..... | 43 |

Περίληψη

Όσο περνούν τα χρόνια, τα φυσικά προϊόντα όπως το μέλι συγκεντρώνουν την προσοχή του ιατρικού κόσμου, καθώς η εμφάνιση και η εξάπλωση βακτηριακών στελεχών ανθεκτικών σε πολλά αντιβιοτικά οδηγεί σε μη αποτελεσματική θεραπεία πολλών λοιμώξεων και αυτό έχει οδηγήσει στην επανεξέταση παλαιότερων εναλλακτικών θεραπειών (Mandal et al., 2010).

Το μέλι είναι γνωστό για τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του εδώ και χιλιάδες χρόνια. Αναστέλλει την βακτηριακή ανάπτυξη κυρίως λόγω του υπεροξειδίου του υδρογόνου και αντιμικροβιακών πρωτεϊνών και πεπτιδίων που υπάρχουν σε αυτό και εν μέρει λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων (Kwakman et al., 2010, Molan, 1999). Επίσης, διάφορα συστατικά του μελιού, όπως αρωματικά οξέα ή φαινολικές ενώσεις και πρωτεΐνες συνεισφέρουν στην συνολική αντιμικροβιακή δραστηριότητα (Weston, 2000).

Στην παρούσα μελέτη 14 δείγματα μελιών από διαφορετικές φυτικές πηγές και γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας, εκτιμήθηκαν για την ικανότητα τους να αναστέλλουν την παραγωγή των μολυσματικών παραγόντων (virulence factors) του gram αρνητικού βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*. Τα 14 δείγματα μελιού συγκρίθηκαν με το μέλι Manuka 15+ (Manuka Health) γνωστό για την ισχυρή αντιμικροβιακή του δράση και ένα συνθετικό μέλι που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο, το οποίο αντιπροσωπεύει τα κυρίαρχα σάκχαρα που βρίσκονται στο μέλι.

Η επίδραση του μελιού ελέγχθηκε ενάντια στην παραγωγή πρωτεασών, πυοβερδίνης και πυοκυανίνης, που αποτελούν βασικούς μολυσματικούς παράγοντες της *P. aeruginosa*. Από την μελέτη των 14 μελιών προέκυψε ότι μερικά από τα μέλια αναστέλλουν την παραγωγή των μολυσματικών παραγόντων της *P. aeruginosa* πιο αποτελεσματικά από το μέλι Manuka και το συνθετικό μέλι.

Από την μελέτη για την αναστολή της πρωτεόλυσης από την *P. aeruginosa* παρατηρήθηκε ότι το συνθετικό μέλι δεν έχει καμία επίδραση στις πρωτεάσες της *P. aeruginosa* ενώ 7 από τα 14 μέλια που ελέγχθησαν είχαν καλύτερη αναστολή των πρωτεασών σε σχέση με το μέλι Manuka 15+. Ενώ τα υπόλοιπα 7 είχαν σχεδόν την ίδια επίδραση στις πρωτεάσες.

Όσον αφορά την αναστολή της παραγωγής της πυοβερδίνης από την *P. aeruginosa* παρατηρήθηκε ότι τα μέλια δεν αναστέλλουν πλήρως την παραγωγή της πυοβερδίνης αλλά την μειώνουν κατά πολύ σε σχέση με το συνθετικό μέλι και το μέλι Manuka 15+.

Επίσης στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία το συνθετικό μέλι ήταν σαφώς καλύτερο από το μέλι Manuka.

Στον έλεγχο για την αναστολή της παραγωγής πυοκυανίνης από την *P. aeruginosa* παρατηρήθηκε ότι όλα τα ελληνικά μέλια μειώνουν την παραγωγή της πυοκυανίνης όπως και το συνθετικό μέλι αλλά το μέλι Manuka και σε αυτή την περίπτωση δεν είχε τα καλύτερα αποτελέσματα.

Abstract

As the years go by, natural products like honey attract attention of the medical world, since the spread of bacterial strains resistant to many antibiotics leads to ineffective treatment of many infections and this has resulted in reviewing past alternative therapies (Mandal et al., 2010).

Honey is known for its biological activities such as antibacterial, antioxidant and anti-inflammatory. Honey inhibits bacterial growth due to high sugar concentration, hydrogen peroxide (H₂O₂) generation and antimicrobial proteins and peptides present in it (Kwakman et al., 2010, Molan, 1999). Also, various components of honey like aromatic acids or phenolic compounds and proteins contribute to the overall antimicrobial activity (Weston, 2000).

In this study 14 samples of honey from different vegetable sources and geographic areas of Greece, were evaluated for their ability to inhibit the production of virulence factors of gram negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. The 14 honey samples were compared with honey Manuka 15+ (Manuka Health) known for its strong antimicrobial activity and a synthetic honey prepared in the laboratory, which represents the predominant sugars found in honey.

The effect of the honey was tested against the production of proteases, pyoverdine and pyocyanine forming of the main contaminants of *P. aeruginosa*. From the study of 14 honeys showed that the honeys inhibit the production of infectious agents of *P. aeruginosa* more efficiently than Manuka honey and synthetic honey.

From the study for inhibition of proteolysis of *P. aeruginosa* observed that the synthetic honey has no effect on proteases while 7 of the 14 tested honeys had better inhibition of proteases in relation to Manuka honey 15+. While the remaining 7 honeys had almost the same effect to proteases.

Regarding the suspension of production of pyoverdine from *P. aeruginosa* was observed that honey does not completely inhibit the production of pyoverdine but greatly reduce it compared to the synthetic honey and Manuka honey 15+. Also in this experimental procedure the synthetic honey was clearly better than Manuka honey in that respect.

In the control to inhibit the production of pyocyanine of *P. aeruginosa* observed that all Greek honeys reduce production of pyocyanine as well as the synthetic honey but Manuka honey did not reveal good results.

1. Εισαγωγή

1.1. Τι είναι μέλι

Σύμφωνα με τον ορισμό του Διεθνούς Οργανισμού Γεωργίας και Τροφίμων (F.A.O.) «μέλι είναι το γλυκό προϊόν το οποίο παράγουν οι μέλισσες (του γένους *Apis*), καθώς αυτές συλλέγουν, μετατρέπουν και αποθηκεύουν στις κηρήθρες τους το νέκταρ και άλλους φυτικούς χυμούς από διάφορα ζωντανά μέρη του φυτού». Το μέλι καταναλώνεται αυτούσιο όπως παράγεται χωρίς επεξεργασία (Ζερφυρίδης, 1998).

Το μέλι ως προϊόν του μελισσιού είναι ο αποθησαυριστικός ιστός του. Από αυτόν αντλούν οι μέλισσες τις θερμίδες τους, όταν τα φυτά δεν προσφέρουν από τα ζωντανά μέρη τους γλυκούς χυμούς τους λόγω αντίξωων καιρικών συνθηκών (συνεχείς βροχές ή ξηρασία κατά την βλαστική περίοδο ή χαμηλές θερμοκρασίες τον χειμώνα). Για όσο διάστημα του έτους τα φυτά εξακολουθούν να προσφέρουν το νέκταρ ή το μελίτωμα, οι μέλισσες αντλούν τη βιολογική ενέργεια κατ' ευθείαν από αυτούς τους ακατέργαστους ακόμη φυτικούς χυμούς.



Πηγή: Healthy Food House, 2013

Μέσα στον πρόλοβο 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

στην νεαρή εργάτρια και παράγουν τον βασιλικό πολτό. Στις μεγαλύτερης ηλικίας εργάτριες συρρικνώνονται και παράγουν το ένζυμο ιμπερτάση, που είναι απαραίτητο για την μετατροπή του νέκταρ σε μέλι και το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης, που μετατρέπει την γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ.

Η κυρίαρχη χημική μετατροπή (μεταβολισμός) του φυτικού χυμού όταν αυτός γίνεται μέλι είναι η αποδόμηση του διζακχαρίτη σουκρόζη (της κοινής ζάχαρης) στα άμεσα αφομοιώσιμα μονοσάκχαρα της γλυκόζης και φρουκτόζης. Η ανασύνθεση δι- και τριζακχαριτών 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 την διάσπαση της γλυκόζης. Επίσης, το μέλι εμπλουτίζεται με ένζυμα από τους αδένες της εργάτριας μέλισσας, τα οποία μεταβολίζουν σάκχαρα. Τέλος, τα διάφορα μεταλλικά στοιχεία του μελιού είναι ακριβώς τα ίδια με αυτά τα οποία περιέχονται και στον πρωτογενή φυτικό χυμό (White, 1993).

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

1.2. Διατροφική αξία μελιού

Αποτελείται κατά 77 - 84% περίπου από διάφορα σάκχαρα και έτσι έχει οσμωτική πίεση τέτοια που δεν επιτρέπει την ανάπτυξη μικροοργανισμών σ' αυτό, γι' αυτό και διατηρείται στην κοινή θερμοκρασία χωρίς προφύλαξη από άποψη μικροβιακών επιμολύνσεων ή θερμοκρασιών διατήρησης. Το μέλι είναι ένα φυσικό προϊόν το οποίο διατηρείται στην κοινή θερμοκρασία όπως παράγεται, χωρίς επεξεργασία, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων και της αποφυγής έτσι της ανάπτυξης μικροβιακών ζυμώσεων. Η θέρμανση που εφαρμόζεται στο μέλι είναι για την κρυστάλλωση και όχι για την προφύλαξη του από τους μικροοργανισμούς. Έτσι το μέλι χρειάζεται προφύλαξη μόνο από την κρυστάλλωση και ο καλύτερος τρόπος αποφυγής της είναι η κατάψυξη, καθόσον κατά την απόψυξη επανέρχεται στην φυσική του κατάσταση. Η κατάψυξη όμως δεν εφαρμόζεται στην πράξη (Ζερφυρίδης, 1998).

Τα σάκχαρα αυτά κατά μέσο όρο επί τοις 100 του βάρους μελιού είναι:

- Φρουκτόζη: 39
- Γλυκόζη: 32
- Μαλτόζη: 7
- Σακχαρόζη: 1,5
- και λοιπά σάκχαρα: 1.

Το μέλι έχει μεγάλη θρεπτική αξία λόγω των σακχάρων του, αφού απορροφάται άμεσα από τον ανθρώπινο οργανισμό (1 κουταλιά της σούπας μέλι αποδίδει στον οργανισμό 64 Kcal). Έχουν αναγνωρισθεί πάνω από 180 διαφορετικές ουσίες στο μέλι που το καθιστούν πολύτιμη τροφή. Περιέχει νερό σε ποσοστό 16%, οργανικά οξέα, πρωτεΐνες και αμινοξέα, μεταλλικά στοιχεία σε μικρές ποσότητες (κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο, σίδηρο κ.α.), ένζυμα, συμπλέγματα πρωτεϊνών, βιταμίνες (B2, B6, C, D, E, παντοθενικό οξύ, φολικό οξύ κ.α.), φυσικές αρωματικές ουσίες κα. Το μέλι έχει υψηλή ενεργειακή και θρεπτική αξία. Τα ανόργανα στοιχεία του μελιού συμμετέχουν σε διάφορα ενζυμικά συστήματα και παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό. Αυτό που προκαλεί ενδιαφέρον δεν είναι τόσο τα επιμέρους θρεπτικά συστατικά του μελιού όσο η συνύπαρξη όλων αυτών και ο τρόπος με τον οποίο δρουν στον ανθρώπινο οργανισμό.

1.3. Ευεργετικές δράσεις του μελιού στον άνθρωπο

Το μέλι έχει ευεργετικές δράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό, κάποιες από αυτές είναι:

- Το μέλι ως δυναμωτικό
- Επιδράσεις στην καρδιά
- Επιδράσεις στο ήπαρ
- Επιδράσεις στο πεπτικό σύστημα
- Επούλωση τραυμάτων
- Αντιφλεγμονώδης δράση
- Αντιοξειδωτική δράση
- Υποβοήθηση του ανοσοποιητικού συστήματος



Πηγή: Bio Honey Quality, 2013

1.4. Είδη μελιού

Το μέλι προέρχεται από διαφορετικές φυτικές πηγές και παίρνει την ονομασία της επικρατέστερης (κατά 70%) πηγής κατά την εποχή της συλλογής του από τις μέλισσες όπως θυμαριού, πεύκου, ηλίανθου κλπ.

Υπάρχουν δυο κατηγορίες μελιού. Το ανθόμελο είναι αυτό που προέρχεται από μεγάλη ποικιλία λουλουδιών όπου κανένα δεν επικρατεί σε μεγάλη αναλογία ώστε να δοθεί η ονομασία του στο μέλι, και το μέλι των μελιτωμάτων που παράγεται από τον χυμό του πεύκου, της ελάτης και άλλων φυτών.

Το ανθόμελο θεωρείται ποιοτικά ανώτερο από το πευκόμελο. Αυτά αποτελούν τα δύο κύρια είδη μελιού της αγοράς. Το ανθόμελο είναι λεπτόρρευστο και αρωματικό και με την πάροδο του χρόνου σε χαμηλές θερμοκρασίες γίνεται παχύρρευστο, κρυσταλλώνει, κοινώς ζαχαρώνει και με τον καιρό στερεοποιείται ενώ το πευκόμελο είναι παχύρρευστο και δεν παθαίνει κρυστάλλωση αλλά θεωρείται ποιοτικά κατώτερο από το ανθόμελο.

Η κρυστάλλωση του μελιού είναι πολύπλοκο φαινόμενο. Εκ πρώτης όψεως οφείλεται στην διαφορετική σχέση φρουκτόζης και γλυκόζης αλλά η θέρμανση σε χαμηλές θερμοκρασίες επαναφέρει το μέλι σε ρευστή κατάσταση και έτσι εικάζεται ότι μπορεί να προκαλείται και από ένζυμα. Όταν όμως το μέλι παραμένει για κάποιο χρονικό διάστημα η κρυστάλλωση επανεμφανίζεται. Το κρυσταλλωμένο μέλι δεν έχει

χάσει τίποτα από την θρεπτική του αξία και πρέπει να καταναλώνεται όπως είναι διότι η θέρμανσή του για να λιώσει και να αποκτήσει την αρχική του ωραία φυσική κατάσταση οπωσδήποτε μετουσιώνει ορισμένα από τα θρεπτικά του συστατικά (Ζερφυρίδης, 1998).

Οι εδαφοκλιματολογικές συνθήκες της Ελλάδας ευνοούν την ανάπτυξη του εντόμου *Marchalina hellenica* (κοινώς βαμβακάδα ή εργάτης) το οποίο παρασιτεί στα πεύκα και εκκρίνει μελίτωμα. Οι μελιτώδεις εκκρίσεις συλλέγονται από τις μέλισσες, μεταποιούνται και αποθηκεύονται ως μέλι. Η μεγαλύτερη παραγωγή μελιού στην Ελλάδα (περίπου 60 - 65%) προέρχεται από τις μελιτώδεις εκκρίσεις του «εργάτη» και το μέλι που παράγεται είναι γνωστό ως πευκόμελο.

Το ακμαίο θηλυκό του εργάτη γεννά 200 - 300 περίπου αυγά σε διάστημα 3 - 4 ημερών, τον Απρίλιο (Νικολόπουλος, 1965). Από τα αυγά αυτά εκκολάπτονται μετά από 15 - 20 ημέρες οι προνύμφες πρώτου σταδίου, οι οποίες ψάχνουν αμέσως και βρίσκουν θέσεις προσήλωσης στο φλοιό του πεύκου. Στις θέσεις αυτές το έντομο εκκρίνει μια βαμβακώδη, κηρώδη ουσία, με την οποία καλύπτεται, έτσι ώστε να προστατευτεί από τους φυσικούς του εχθρούς και τις δυσμενείς συνθήκες του περιβάλλοντος.

Η περίοδος που παράγονται οι μελιτώδεις εκκρίσεις είναι σταθερή από έτος σε έτος και μπορεί να προβλεφθεί με σχετική ακρίβεια.

Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή μελιτωμάτων: Η παραγωγή μελιτωμάτων γνωστή ως «βάρεμα του εργάτη» επηρεάζεται από το μέγεθος (ηλικία) του εντόμου, τη ζωτικότητα του δέντρου, τις κλιματολογικές συνθήκες και το είδος του πεύκου στο οποίο παράγεται το έντομο (Καϊλίδης, 1965). Όσο ο εργάτης είναι μικρότερος σε μέγεθος τόσο μικρότερη ποσότητα τροφών λαμβάνει και τόσο λιγότερα μελιτώματα παράγει. Στην περίοδο των αλλαγών του δέρματος (εκδύσεων) καθώς επίσης και όταν ενηλικιωθεί, το έντομο δεν τρέφεται και δεν παράγει μελίτωμα.

Υψηλές θερμοκρασίες και μεγάλη ξηρασία έχουν ως αποτέλεσμα να λιγοστεύουν τα μελιτώματα, ενώ αντίθετα μέτριες θερμοκρασίες με δροσερό καιρό ευνοούν την κυκλοφορία των χυμών του πεύκου και την άφθονη παραγωγή μελιτοεκκρίσεων.

Ο εργάτης αποβάλλει περισσότερες μελιτοεκκρίσεις, όταν παρασιτεί στην τραχεία (*Pinus brutia* Ten.) παρά στην χαλέπιο πεύκη (*Pinus halepensis* Miller) (Τυπάλδος – Ξυδίας, 1979).

Τα διάφορα είδη μελιού διακρίνονται ανάλογα το φυτό από όπου άντλησαν οι μέλισσες το νέκταρ (θυμαρίσιο, ελάτου, ανθέων), από την περιοχή προέλευσης και τον τρόπο παραλαβής του από τις κηρήθρες.

Το χρώμα του μελιού ποικίλλει από σχεδόν άχρωμο έως καφέ σκούρο. Ως προς τη σύσταση, μπορεί να είναι ρευστό, παχύρευστο ή μη, μερικά ή ολικά κρυσταλλωμένο. Η γεύση και το άρωμα ποικίλουν, αλλά εξαρτώνται από τη φυτική προέλευση.

Κάθε κατηγορία έχει τις εξής ιδιομορφίες που την κάνει να ξεχωρίζει από όλες τις άλλες:

1.4.1. Πεύκο – *Pinus halepensis* (κοινό πεύκο), (μελίτωμα)

Πευκοδάση εμβολιασμένα με τον εργάτη και με μεγάλη παραγωγή μελιτωμάτων βρίσκονται σε αρκετές περιοχές της χώρας και κυρίως στην Εύβοια, Σκόπελο, Σκιάθο, Θάσο, Ζάκυνθο, Ρέθυμνο, Ρόδο, Χαλκιδική κ.α. Το 65% περίπου της συνολικής παραγωγής μελιού στην Ελλάδα, είναι πευκόμελο. Δεν είναι ιδιαίτερα γλυκό γι' αυτό και δεν αρέσει στην γεύση. Είναι από τις κατηγορίες μελιού που δεν κρυσταλλώνουν. Είναι πλουσιότερο από το ανθόμελο σε ιχνοστοιχεία, σε πρωτεΐνες και αμινοξέα. Επίσης έχει τις λιγότερες θερμίδες. Το ανοιξιάτικο πευκόμελο διαφέρει στα οργανοληπτικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά από το φθινοπωρινό πευκόμελο (Θρασυβούλου και Μανίκης, 1990). Το πευκόμελο το οποίο μελετήθηκε στην παρούσα έρευνα παράγεται στην Θάσο όπου το κυρίαρχο είδος πεύκου είναι το Θασίτικο ή αλλιώς Τραχεία Πεύκη – *Pinus brutia* (που μοιάζει με το κοινό πεύκο), και βρίσκεται στις χαμηλότερες περιοχές του νησιού. Ένα άλλος είδος πεύκου που υπάρχει στο νησί είναι το Μαυρόπευκο – *Pinus nigra* και συνιστάται στις υψηλότερες περιοχές μέχρι την κορυφή του.

1.4.2. Ερείκη – *Erica multipolyflora* (φθινοπωρινή σουσούρα), (νέκταρ)

Το μέλι από ερείκη ονομάζεται και «Σουσουρίσιο». Θεωρείται ότι είναι προϊόν με υψηλή θρεπτική αξία, γι' αυτό και διατίθεται κύρια από καταστήματα Υγιεινής Διατροφής. Έχει οσμή και γεύση χαρακτηριστική που αρέσει ιδιαίτερα σε απαιτητικούς καταναλωτές. Μέλι με υψηλή θρεπτική αξία, λιγότερο πλούσιο σε ιχνοστοιχεία σε σχέση με τα μέλια καστανιάς ή βελανιδιάς. Κρυσταλλώνει γρήγορα, σ' έναν με τρεις μήνες. Είναι σκοτεινόχρωμο ενώ μετά την κρυστάλλωση του λαμβάνει μια κοκκινωπή απόχρωση.

1.4.3. **Κουμαριά** – *Arbutus unedo*, (νέκταρ)

Θάμνος που βρίσκεται σχεδόν σε όλη την χώρα. Το αποθηκευμένο στις κηρήθρες μέλι κουμαριάς έχει υψηλά ποσοστά υγρασίας, λόγω προχωρημένης εποχής (φθινόπωρο) και μεγάλη φυσική περιεκτικότητα σε ζύμες, με αποτέλεσμα μερικές φορές να ξινίζει εύκολα και να προκαλεί δυσεντερίες στις μέλισσες. Το μέλι κουμαριάς έχει έντονο άρωμα αλλά ευχάριστο, γεύση πικρή και πικάντικη και χρώμα πολύ σκούρο, σχεδόν μαύρο.

1.4.4. **Ακακία** – *Robinia pseudoacacia*, (νέκταρ)

Η ακακία είναι πολύ διαδεδομένο δέντρο, αυτοφυές σε χέρσα εδάφη και σε ρεματιές, αλλά και καλλωπιστικό που συχνά συναντιέται σε δεντροστοιχίες δρόμων, αυλές σπιτιών και σε δασικές εκτάσεις. Αυτό το μέλι το γνωρίζουν πολύ καλά στην Κεντρική Ευρώπη λόγω των μεγάλων εκτάσεων ακακίας που έχουν εκεί. Η παραγωγή του συγκεκριμένου μελιού εκεί είναι πιο σταθερή απ' ό τι στην Ελλάδα λόγω των διαφορετικών ποικιλιών ακακίας. Δίνει ανοιχτόχρωμο και διαυγές μέλι που δύσκολα κρυσταλλώνει.

1.4.5. **Μέλι ανθέων**, (νέκταρ)

Μέλι που παράγεται την άνοιξη με την ανθοφορία της ελληνικής φύσης. Είναι ανάμεικτο μέλι και οι ιδιότητές του διαφέρουν ανάλογα με το νέκταρ των ελληνικών φυτών που προσκομίζουν στην κυψέλη οι μέλισσες. Παράγεται σε μεγάλες ποσότητες και είναι το μέλι που μπορεί να παράγει ακόμη και ένας άπειρος μελισσοκόμος. Κλασσικό ελληνικό μέλι που μαζί με το πευκόμελο υπερβαίνουν το 80% του ποσοστού της συνολικής ελληνικής παραγωγής. Δυστυχώς το μέλι ανθέων ή ανθόμελο δεν έχει διακριτά στοιχεία ενώ πολλοί μελισσοκόμοι και τυποποιητές το αναμειγνύουν με διάφορα μέλια τα οποία είναι ταυτοποιημένα - π.χ. βαμβακιού - χωρίς να το αναφέρουν στην συσκευασία (για ευνόητους λόγους). Είναι συνήθως ανοιχτόχρωμο μέλι. Η κρυστάλλωση του αν και είναι δύσκολο να προβλεφθεί, γίνεται συνήθως 4 - 6 μήνες μετά την συλλογή του.

1.4.6. **Πορτοκαλιά** – *Citrus aurantium*, (νέκταρ)

Η πορτοκαλιά είναι ο κύριος αντιπρόσωπος των εσπεριδοειδών, αποτελεί μια σημαντική πηγή νέκταρος για την παραγωγή μελιού. Το μέλι πορτοκαλιάς είναι έντονα αρωματικό, ανοιχτού χρώματος, κρυσταλλώνει πολύ γρήγορα, σ' έναν με δυο μήνες και μετατρέπεται σε ασπριδερό μετά την κρυστάλλωση του. Αποτελεί το 10% περίπου της συνολικής ετήσιας παραγωγής.

1.4.7. **Βαμβάκι** – *Gossypium hirsutum*, (νέκταρ)

Η έκκριση νέκταρος από το άνθος του βαμβακιού ξεκινά μερικές ώρες μέχρι και ημέρες πριν να ανοίξει το άνθος και σταματά όταν τα πέταλα αλλάξουν χρώμα και από άσπρα γίνουν ροδοκόκκινα. Το νέκταρ από τα άνθη του βαμβακιού είναι πλούσια σε ζάχαρα (30 - 70%) αλλά δεν προσελκύει ιδιαίτερα τις μέλισσες, λόγω των χαμηλών ποσοστών σουκρόζης που περιέχει. Αντίθετα, οι μέλισσες προσελκύνονται περισσότερο από το νέκταρ που εκκρίνεται από εξωανθικά νεκτάρια που βρίσκονται στην εξωτερική πλευρά των βράκτιων φύλλων καθώς επίσης στη βάση και τους νευρώνες των φύλλων. Το νέκταρ που παράγεται από τους αδένες αυτούς, είναι πλούσιο σε ζάχαρα και γίνεται ακόμη πλουσιότερο με την παθητική εξάτμιση του νέκταρος. Το μέλι από βαμβάκι είναι ανοιχτόχρωμο και μετατρέπεται σε ασπριδερό μετά την κρυστάλλωση του. Η κρυστάλλωση γίνεται σ' ένα με δυο μήνες από τότε που παράγεται.

Μεγάλο πρόβλημα για τις μέλισσες και το μέλι είναι οι ψεκασμοί με εντομοκτόνα υψηλής μελισσοτοξικότητας στην ανθοφορία. Οι μεγάλες απώλειες μελισσών αποθαρρύνουν τους μελισσοκόμους, οι οποίοι αποφεύγουν την καλλιέργεια. Ένα δεύτερο πρόβλημα είναι η πρόσφατη χρησιμοποίηση υβριδίων ή σειρών βαμβακιού με μικρή νεκταροέκκριση, τα οποία δεν επισκέπτονται οι μέλισσες (Τσέλλιος και Θρασυβούλου, 1989). Επίσης, ανακύπτει θέμα και με τα εντομοκτόνα που ανιχνεύονται στο μέλι καθώς περνάνε από την μέλισσα στο μέλι. Παρά τα προβλήματα, το βαμβάκι τον Αύγουστο είναι μια από τις κύριες πηγές νέκταρος για τον Έλληνα μελισσοκόμο.

1.4.8. **Βελανιδιά** – *Quercus macrolepis*, (μελίτωμα)

Δασικό δέντρο με μεγάλη εξάπλωση σε όλη την ορεινή χώρα και ενδιαφέρον από μελισσοκομική πλευρά. Κατά τον μήνα Ιούλιο, δίνει μελιτώδεις εκκρίσεις. Το μέλι βελανιδιάς ή «δέντρου», όπως λέγεται από τους μελισσοκόμους, έχει σκοτεινό χρώμα, γεύση ευχάριστη και δύσκολα κρυσταλλώνει. Το μέλι βελανιδιάς είναι ένα από τα πιο πλούσια μέλια σε ιχνοστοιχεία.

1.4.9. **Έλατο** – *Abies sp.*, (μελίτωμα)

Δίνει μέλι εξαιρετικής ποιότητας από μελιτοεκκρίσεις εντόμων τον Ιούνιο. Το ελληνικό έλατο, γνωστό ως ελάτη η Κεφαλληνική (*Abies cephalonica*), συναντιέται μόνο στην Ελλάδα και ειδικότερα στην Ευρυτανία, τον Ταΰγετο, το Περούλι, την Πάρνηθα και άλλες περιοχές. Το μέλι που παράγεται είναι δυο ειδών. Το ένα, γνωστό ως βανίλια, είναι εξαιρετικά πυκνόρρευστο, δεν κρυσταλλώνει, παρουσιάζει αναλαμπές χρωμάτων και έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε ανάγοντα ζάχαρα. Παράγεται στο

Μαίναλο ή στον Πάρνωνα της Πελοποννήσου. Αυτό του Μαινάλου είναι το μοναδικό ελληνικό μέλι που έχει χαρακτηριστεί στην Ευρωπαϊκή Ένωση ως Π.Ο.Π. Το δεύτερο είδος μοιάζει με το συνηθισμένο μέλι που παράγεται από την ευρωπαϊκή ελάτη (*Abies alba*), γνωστό ως δασόμελο.

Στα διάφορα είδη ελάτης, έχουν αναφερθεί τα κοκκοειδή *Physokermes hemictyphus* και *Eulecanium sericeum* και οι αφίδες *Mindarus abietinus*, *Cinara confinis* και *C.pectinatae* ως παράσιτα που παράγουν μελιτώδεις εκκρίσεις εκμεταλλεύσιμες από τις μέλισσες.

1.4.10. **Ηλίανθος** – *Helianthus annuus*, (νέκταρ)

Είναι ανοιχτόχρωμο μέλι που κρυσταλλώνει σ' έναν με δυο μήνες. Στην κρυσταλλική του μορφή είναι κιτρινωπό. Μέλι που κατά κύριο λόγο συλλέγεται στον Έβρο, όπου υπάρχουν εκτάσεις με το συγκεκριμένο καλλιεργούμενο φυτό. Είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ποιότητα της διατροφής μας.

1.4.11. **Καστανιά** – *Castanea sativa*

Το μέλι που συλλέγεται από την καστανιά είναι εξαιρετικής ποιότητας, σκοτεινόχρωμο, έντονα αρωματικό και αρκετά ανθεκτικό στην θέρμανση (Θρασυβούλου και Μανίκης, 1997). Κρυσταλλώνει αργά σε ένα με δυο χρόνια. Το μέλι καστανιάς έχει χαρακτηριστικά μελιτώματος, κατατάσσεται όμως στα ανθόμελα, γιατί τα ζάχαρα του είναι αριστερόστροφα. Το μέλι καστανιάς λέγεται ότι ευνοεί την κυκλοφορία του αίματος και είναι πλούσιο -ίσως το πιο πλούσιο- σε ιχνοστοιχεία, κάλιο, μαγνήσιο, μαγγάνιο και βάριο. Το μέλι καστανιάς, αν και δεν το γνωρίζουμε στην Ελλάδα, είναι περιζήτητο στις αγορές της Κεντρικής Ευρώπης.

1.4.13. **Σιδηρίτης ή τσάι του βοουνού** – *Sideritis spp.*, (νέκταρ)

Το μέλι από Σιδηρίτη είναι από τα καλύτερα μέλια, παράγεται όμως σε μικρές ποσότητες και είναι τοπικής σημασίας.

1.4.14. **Πολύκομβος** – *Polygonum spp.*, (νέκταρ)

Σκοτεινόχρωμο μέλι με χαρακτηριστική μυρωδιά. Η γεύση του δεν αρέσει ιδιαίτερα και γι' αυτό δεν συναντάται ως αμιγές μέλι στην ελληνική αγορά. Είναι από τα πιο πλούσια σε ένζυμα μέλια και αντέχει περισσότερο στην θέρμανση. Επίσης, έχει υψηλά ποσοστά μεταλλικών στοιχείων, που του προσδίδουν υψηλή θρεπτική αξία.

1.4.15. **Ευκαλύπτος** – *Eucalyptus spp.*, (νέκταρ)

Υπάρχουν πολλά μελισσοκομικά είδη ευκαλύπτου που ανθίζουν σχεδόν όλες τις εποχές. Το μέλι του ευκαλύπτου είναι συνήθως ανοιχτόχρωμο.

1.4.16. **Θυμάρι** – *Thymus sp.*, (νέκταρ)

Στην Ελλάδα απαντιέται το είδος *Thymus serpyllus* σε αλπικές βοσκές ή σε βράχους της βορειοηπειρωτικής Ελλάδας μέχρι την Θεσσαλία και την Εύβοια. Επίσης υπάρχει το γνωστό θρουμί (*Thymus capitatus*), που επίσης ονομάζεται θυμάρι. Είναι ένα από τα σπουδαιότερα μελισσοκομικά φυτά για την χώρα μας, γιατί από αυτό παράγεται το χαρακτηριστικό σε άρωμα και γεύση εξαιρετικής ποιότητας θυμαρίσιο μέλι με ανοιχτόχρωμη λαμπερή εμφάνιση. Η παραγωγή του ανέρχεται περίπου σε ποσοστό 10% της συνολικής παραγωγής μελιού στην Ελλάδα. Κρυσταλλώνει σε διάστημα 6 με 18 μηνών από την παραγωγή του.

1.5. Το μέλι ως αντιμικροβιακός παράγοντας

Για πολλές εκατοντάδες χρόνια το μέλι χρησιμοποιούνταν για θεραπεία πληγών καθώς και ως θεραπεία παθήσεων του γαστρεντερικού συστήματος (Zumla and Luat, 1989, Olaitan et al., 2007). Με την έλευση των αντιβιοτικών, η κλινική εφαρμογή του μελιού μειώθηκε στην δυτική ιατρική αν και σε πολλούς πολιτισμούς συνέχισε να χρησιμοποιείται (Kwakman et al., 2010). Βέβαια η ευρεία χρήση των αντιβιοτικών δημιούργησε διάφορες αντιδράσεις με αποτέλεσμα να ξανά χρησιμοποιηθούν φυσικά συστατικά όπως το μέλι (Mandal et al., 2010).

Το μέλι έχει ευρύ φάσμα δράσης κατά παθογόνων μικροοργανισμών και βακτηρίων που προσβάλλουν τον άνθρωπο και τα τρόφιμα (Cooper et al., 2002, Kwakman et al., 2008, Mundo et al., 2004, Taormina et al., 2001). Η ισχυρή in vitro δράση του μελιού έναντι βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά (Cooper et al., 2002) και η επιτυχής εφαρμογή του στη θεραπεία χρόνιων μολυσμένων πληγών που δεν ανταποκρίνονται στην αντιβιοτική θεραπεία (Efem, 1988), προσέλκυσε εκ νέου το ενδιαφέρον της μοντέρνας ιατρικής για το μέλι ως εναλλακτική θεραπεία. Βρέθηκε ότι το μέλι είναι πολύ αποτελεσματικό έναντι διαφόρων κλινικών στελεχών των βακτηρίων και ενισχύει την επίδραση των αντιβιοτικών όταν εφαρμόζεται σε δίσκους αντιβιοτικού (Wang et al., 2012).

Η ισχυρή αντιμικροβιακή δράση του μελιού καθώς και η ικανότητα του να παρεμποδίζει την ανάπτυξη βακτηρίων σε μολυσμένες πληγές καθώς και να τις καθαρίζει αναγνωρίστηκαν σε διάφορες μελέτες που έχουν γίνει (Zumla and Luat,

1989). Σύμφωνα με τους Cooper et al. (2002), το μέλι είναι αποτελεσματικό *in vitro* ενάντια σε βακτήρια που μολύνουν πληγές όπως *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* και άλλα. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι όταν το μέλι δοκιμάστηκε ενάντια κλινικά απομονωμένων στελεχών του *S. aureus* και *P. aeruginosa*, σκότωσε τα κύτταρα που ήταν σε ελεύθερη διαβίωση σε όλα τα στελέχη που δοκιμάστηκαν (Alandejani et al., 2009). Το πιο σημαντικό είναι ότι το μέλι είναι ικανό να σκοτώσει τα βακτήρια ακόμη και στην πιο ανθεκτική κατάσταση των βιοφίλμ τους και έτσι αποδεικνύεται πιο αποτελεσματικό από οποιοδήποτε μεμονωμένο συχνά χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό (Wang et al., 2012).

Τα μέλια διαφέρουν στην δραστικότητα τους ενάντια στα βακτήρια και αυτό ίσως οφείλεται στις διαφορές των φυτικών πηγών τους. Χωρίζονται σε ποικιλίες που διαφοροποιούνται λόγω του τύπου του φυτού από το οποίο συλλέγονται το νέκταρ και η γύρη, την χώρα προέλευσης καθώς και τον τρόπο παραγωγής (Carnwath et al., 2013). Σε μεγάλο μέρος των ερευνών που έχουν γίνει για την χρήση του μελιού σε μικροβιακές λοιμώξεις και επούλωση τραυμάτων δεν αναφέρεται ο τύπος του μελιού που έχει χρησιμοποιηθεί (Al-Waili et al., 2013).

Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του μελιού δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητές. Οι μέλισσες παράγουν μέλι από νέκταρ λουλουδιών από την εξάτμιση του νερού και προσθέτοντας πεπτικά ένζυμα (Molan, 1999). Τα δύο μεγαλύτερα συστατικά του μελιού είναι τα σάκχαρα (81%) και το νερό (17%). Το υπόλοιπο 1 - 2% περιέχει διάφορα ένζυμα και ενώσεις, των οποίων η σύνθεση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη βακτηριοκτόνο δράση του μελιού και ποικίλλει ευρέως ανάλογα με την πηγή νέκταρ (Molan, 1999). Προσπάθειες για τον εντοπισμό της πηγής της βακτηριοκτόνου δράσεως του μελιού έχει οδηγήσει στην ανακάλυψη των μορίων όπως μεθυλγλυοξάλη (Kwakman et al., 2010), αλλά επακριβώς χαρακτηρισμός των αποτελεσμάτων τους είναι δύσκολος λόγω του μεγάλου αριθμού των συστατικών και της δυνατότητας συνδυαστικών επιδράσεων (Wang et al., 2012).

Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού οφείλεται κυρίως στην ενζυμική παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου μέσω του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης (Kwakman et al., 2010, Molan, 1999), της οξύτητας του και της ώσμωσης του (Anthimidou and Mossialos, 2012). Επιπρόσθετα, συστατικά του μελιού, όπως αρωματικά οξέα ή φαινολικές ενώσεις και πρωτεΐνες συνεισφέρουν στην συνολική αντιμικροβιακή δραστηριότητα (Weston, 2000).

1.6. Αντιβακτηριακή δράση μελιού

Είναι πλέον επιστημονικά τεκμηριωμένη η βιολογική δράση του μελιού. Σημαντικό ρόλο παίζουν:

1. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου και το γλυκονικό οξύ. Το τελευταίο είναι και το ποσοτικά κυρίαρχο μεταξύ οξέων στο μέλι. Τη στιγμή κατά την οποία το νέκταρ συλλέγεται από την μέλισσα, αυτό έχει ουδέτερο pH. Καθώς ωριμάζει για να γίνει τελικά μέλι, η συλλέκτρια μέλισσα του προσθέτει το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης από τους υποφαρυγγικούς της αδένες. Με το ένζυμο αυτό η γλυκόζη μετατρέπεται σε γλυκονικό οξύ, ενώ ως παραπροϊόν της βιοχημικής αντίδρασης σχηματίζεται το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2). Χάρη σε αυτά τα δυο συστατικά του μελιού τα περισσότερα βακτήρια δεν μπορούν να αναπτυχθούν μέσα στην μάζα του. Το H_2O_2 όχι μόνο αναχαιτίζει την ανάπτυξη των βακτηρίων αλλά και τα θανατώνει. Το H_2O_2 σε μικρές συγκεντρώσεις βρέθηκε επίσης ότι συμμετέχει ως ένας από τους αυξητικούς παράγοντες στην επούλωση πληγών, όταν σε αυτές εφαρμόζονται επιθέματα με μέλι (Kwakman et al., 2010). Η καταλάση είναι ένζυμο το οποίο ανήκει στις λειτουργικές πρωτεΐνες και επιταχύνει την αντίδραση διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου: $H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$. Η μετατροπή αυτή είναι αναγκαία για τη ζωή του κυττάρου, γιατί το H_2O_2 που παράγεται κατά τις αντιδράσεις μεταβολισμού είναι ιδιαίτερα τοξικό. Στα θηλαστικά η καταλάση βρίσκεται κυρίως στα κύτταρα του ήπατος και των νεφρών. Η καταλάση βρίσκεται επίσης και σε φυτικά κύτταρα της γύρης και του νέκταρος, κατά συνέπεια ανιχνεύεται και στο μέλι. Τα επίπεδα του H_2O_2 στο μέλι καθορίζονται από τα επίπεδα της οξειδάσης της γλυκόζης (η οποία το παράγει) και της καταλάσης (η οποία το διασπάει) (Weston, 2000). Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις του H_2O_2 σε διαφορετικά μέλια έχουν ως αποτέλεσμα τις διαφορές στην αντιμικροβιακή δράση των μελιών.
2. Η συγκέντρωση των σακχάρων του μελιού παίζει έναν ακόμη σημαντικό ρόλο (Kwakman and Zaat, 2012). Υπάρχουν πολλά σάκχαρα στο μέλι, για την ακρίβεια είναι ένα υπέρκορο υδατικό διάλυμα σακχάρων, που σημαίνει ότι περιέχει σάκχαρα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από εκείνες οι οποίες μπορούν κανονικά να ανευρίσκονται μέσα στην υγρή φάση του. Αυτό του δίνει υπέροχη γεύση, αλλά επίσης σημαίνει ότι το μέλι περιέχει πολύ λίγο νερό (Wang et al., 2012). Για παράδειγμα, όταν τοποθετήσουμε μέλι πάνω σε μια πληγή, το μέλι λειτουργεί σαν σφουγγάρι και απορροφάει όλο το περίσσιο νερό που υπάρχει.

Αυτό το φαινόμενο λέγεται ώσμωση. Λόγω της ώσμωσης, το μέλι τραβάει όλα τα υγρά από την μολυσμένη πληγή και αυτό βοηθάει στο να σκοτωθούν τα βακτήρια, τα οποία χρειάζονται τα υγρά για να μπορέσουν να αναπτυχθούν.

3. Άλλος παράγοντας που σχετίζεται με την αντιμικροβιακή δράση του μελιού είναι η οξύτητα του. Το pH του είναι μεταξύ 3 και 4 (περίπου το ίδιο με τον χυμό πορτοκαλιού ή μ' ένα κουτάκι Coca Cola). Τα βακτήρια σκοτώνονται σε όξινο περιβάλλον σαν αυτό. Αλλά αν το μέλι αραιωθεί (για παράδειγμα με την απελευθέρωση υγρών του σώματος από μια πληγή), μπορεί να μειωθεί η οξύτητα του, αφήνοντας τα βακτήρια να αναπτυχθούν ξανά.
4. Τέλος, το μέλι περιέχει φυτοχημικά όπως η μεθυλγλυοξάλη (MGO) (Mavric et al., 2008), φαινολικά οξέα, λυσοζύμη, φλαβονοειδή (Cooper et al., 2002), πρωτεΐνες και ολιγοπεπτίδια (Mundo et al., 2004), που φαίνεται ότι παίζουν ρόλο στην αντιμικροβιακή του δράση.

1.7. Μέλι Manuka και άλλα αντιβακτηριακά μέλια

Το μέλι Manuka προέρχεται από το φυτό *Leptospermum scoparium* γηγενές της Νέας Ζηλανδίας και νοτιοανατολικής Αυστραλίας (Anthimidou and Mossialos, 2012). Είναι θάμνος ή μικρό δέντρο ιδιαίτερα γνωστό στην φυλή Maori, οι οποίοι το χρησιμοποιούσαν για αιώνες στην παραδοσιακή ιατρική τους. Το χρησιμοποιούσαν επίσης για τις θεραπευτικές, αντιβιοτικές και αντιβακτηριακές του ιδιότητες.

Μελέτες έδειξαν ότι το *Leptospermum scoparium* βρισκόταν στην Αυστραλία στην αρχή της ξηρασίας την εποχή του Μειόκαινου και εξαπλώθηκε σχετικά πρόσφατα από την ανατολική Αυστραλία στην Νέα Ζηλανδία. Τώρα βρίσκεται σε όλη τη Νέα Ζηλανδία αλλά είναι ιδιαίτερα κοινό στις ξηρότερες ανατολικές ακτές του Βόρειου και Νότιου Νησιού, στην Αυστραλία, στην Τασμανία, στην Βικτωρία και στη Νέα Νότια Ουαλία.

Το πανεπιστήμιο του Waikato στο Χάμιλτον της Ν. Ζηλανδίας μελέτησε πρώτο τη σύνθεση του μελιού αυτού και την αντιμικροβιακή του δράση. Η μοντέρνα ιατρική ανέπτυξε μια σχολαστική μέθοδο για να μετράει την αντισηπτική του ισχύ, το Unique Manuka Factor (UMF). Η μονάδα μέτρησης UMF κατηγοριοποιεί το μέλι με βάση την αντιμικροβιακή του δύναμη. Κάθε παρτίδα ελέγχεται συστηματικά από εγκεκριμένο εργαστήριο, και ταξινομείται κατά αύξουσα σειρά αποδοτικότητας σε κλίμακα από το 0 ως και το 25. Όσο πιο υψηλότερο επίπεδο, τόσο πιο αποδοτική είναι η αντισηπτική δράση του Manuka. Η UMF, η μοναδική αξιόπιστη μονάδα μέτρησης αποδοτικότητας

του μελιού Manuka, έχει προκύψει από την σύγκριση της αντισηπτικής του ιδιότητας, με αυτή του διαλύματος καρβοξυλικού οξέως (πανίσχυρο αντισηπτικό μόριο το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στην μοντέρνα ιατρική) .

Τον Ιανουάριο του 2008 ο καθηγητής Thomas Henle, στο πανεπιστήμιο της Δρέσδης στη Γερμανία, αναγνώρισε την μεθυλγλυοξάλη (MGO) ως την δραστική ουσία του μελιού Manuka η οποία ανιχνεύεται σε εξαιρετικά υψηλά επίπεδα (Adams et al., 2008, Mavric et al., 2008). Η MGO στο μέλι Manuka εμφανίζεται από την μετατροπή της δυδροξυ ακετόνης (DHA) που βρίσκεται σε εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις στο νέκταρ των λουλουδιών του Manuka (Adams et al., 2009). Είναι άγνωστο πως το DHA σχηματίζεται στο νέκταρ και γιατί είναι παρόν σε τόσο μεγάλες ποσότητες στο δέντρο Manuka.

Τώρα πλέον η MGO αναγράφεται στην συσκευασία του μελιού Manuka. Για παράδειγμα, MGO 100 σημαίνει ότι 100 mg μεθυλγλυοξάλης περιέχονται σε 1 Kg μελιού. Το μέλι Manuka έχει εγκριθεί επίσημα για ιατρικούς σκοπούς (Sherlock et al., 2010).

Εκτός από το μέλι Manuka υπάρχουν και άλλα μέλια με αντιβακτηριακή δράση όπως το μέλι Revamil source (RS) (Kwakman et al., 2011), το μαλαισιανό μέλι tualang και το μέλι Ulmo (Sherlock et al., 2010).

Το μέλι Revamil source (RS) παράγεται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες σε θερμοκήπια. Οι παράγοντες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την αντιμικροβιακή δράση αυτού του μελιού είναι η υψηλή συγκέντρωση σε σάκχαρα, του υπεροξειδίου του υδρογόνου, η μεθυλγλυοξάλη, το χαμηλό pH και το κατιονικό αντιμικροβιακό πεπτίδιο η bee - defensin 1 (Kwakman et al., 2011). Μαζί με το μέλι Manuka έχουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση (Kwakman et al., 2008, Allen, 1991) και είναι εγκεκριμένα για επάλειψη σε πληγές.

Το μέλι Ulmo προέρχεται από το δέντρο Ulmo – *Eucryphia cordifolia* γηγενές της Χιλής. Η ισχυρή αντιμικροβιακή του δράση οφείλεται κυρίως στο υπεροξειδίου του υδρογόνου (Sherlock et al., 2010). Είναι πιθανή εναλλακτική θεραπεία για πληγές αλλά χρειάζεται περαιτέρω έρευνα.

1.8. *Pseudomonas aeruginosa*

Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι είδος βακτηρίου μέλος του γένους *Pseudomonas* και είναι η πιο συχνή αιτία λοιμώξεων από ψευδομονάδα στον άνθρωπο. Η *P. aeruginosa* είναι ένα Gram - αρνητικό και κατά κανόνα κινητό αερόβιο βακτήριο. Δεν

σχηματίζει εφησυχάζουσες μορφές και δεν παράγει σπόρους (μη σπορογόνο). Είναι βακτηρίδιο έχει δηλαδή ραβδοειδές σχήμα. Το μήκος της ράβδου του κυμαίνεται από 1 - 5 μm και το πλάτος από 0,5 - 1,0 μm. Εξωτερικά του κυττάρου σε μερικά στελέχη υπάρχει πολυσακχαρικό έλυτρο που το προστατεύει από την φαγοκυττάρωση και από επικίνδυνες για αυτό ουσίες. Επίσης είναι ανθεκτικό βακτήριο ενάντια στα αντιβιοτικά. Τα κύτταρα του βακτηριδίου *P. aeruginosa* διατάσσονται μεμονωμένα, σε ζεύγη και σε μικρές αλυσίδες.

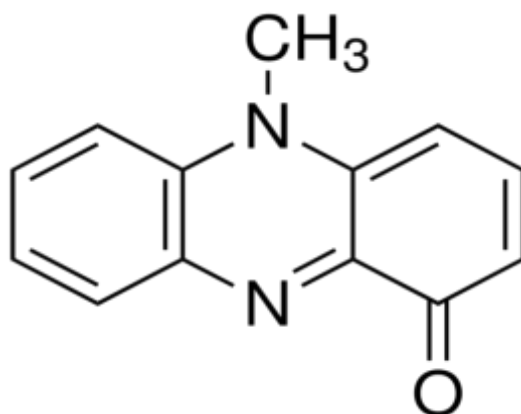


Πηγή: Environmental Health Perspectives, 2013

Η *P. aeruginosa* αναπτύσσεται μόνο σε αερόβιες συνθήκες, και σε κοινά θρεπτικά υλικά. Ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης είναι οι 37°C μπορεί όμως να αναπτυχθεί και σε 4 - 43°C. Όλα τα στελέχη της *P. aeruginosa* αναπτύσσονται στους 42°C. Επιπλέον παράγουν οξειδάση και καταλάση, αλλά όχι υδρόθειο. Διασπών οξειδωτικώς την γλυκόζη, χωρίς την παραγωγή αερίου, όμως δεν την ζυμώνουν. Αντίθετα δεν διασπών την μαλτόζη και την λακτόζη. Προκαλούν οξειδωτική διάσπαση του γλυκονικού καλίου, παράγοντας 2 - κετογλυκονικό κάλιο. Στα περισσότερα στελέχη συναντάμε κινητικότητα (90% των στελεχών) και την δυνατότητα υδρόλυσης της αργίνης (96 - 98% των στελεχών).

Ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των στελεχών της παράγουν την χρωστική πράσινη πυοκυανίνη (Pyocyanine). Σημαντικό είναι ότι από όλα τα είδη της ψευδομονάδας μόνο

η *P. aeruginosa* έχει αυτήν την ιδιότητα. Η πυοκυανίνη έχει χαρακτηριστεί ως μπλε, δευτεροταγής μεταβολίτης με την ικανότητα να οξειδώνει και να μειώνει άλλα μόρια και μπορεί να σκοτώνει τα μικρόβια που ανταγωνίζονται την *P. aeruginosa*, καθώς και κύτταρα των πνευμόνων θηλαστικών τα οποία η *P. aeruginosa* έχει μολύνει κατά τη διάρκεια κυστικής ίνωσης. Η *P. aeruginosa* ονομάζεται και πυοκυανική.



Χημικός τύπος Πυοκυανίνης

Πηγή: Wikipedia, 2013

Στελέχη που παράγουν πυοκυανίνη χαρακτηρίζονται εύκολα ως *P. aeruginosa* και δεν χρειάζονται άλλες δοκιμασίες για την τυποποίηση του μικροβίου.

Ο σίδηρος είναι ένα απαραίτητο στοιχείο για σχεδόν όλα τα βακτήρια, αλλά υπό αερόβιες συνθήκες και σε ουδέτερο pH, ο σίδηρος σχηματίζει αδιάλυτο Fe (III) και συνεπώς δεν είναι εύκολα διαθέσιμος. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα της προσβασιμότητας σιδήρου πολλά βακτήρια παράγουν χημικά παράγοντα σιδήρου που ονομάζονται σιδηροφόρα (Yeterian et al., 2010). Τα σιδηροφόρα έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν παράγοντες παθογένειας και τα σιδηροφόρα στην *P. aeruginosa* έχει αποδειχθεί ότι λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια (Kronka et al., 2013).

Οι φθορίζουσες ψευδομονάδες είναι γνωστό ότι παράγουν μια ποικιλία δευτερογενών μεταβολιτών όπως η πυοβερδίνη (Manwar et al., 2004, Mossialos and Amoutzias, 2009), η οποία παρουσιάζει τις πιο σύνθετες χημικές δομές μεταξύ των σιδηροφόρων της *P. aeruginosa*. Από την πρώτη δομή πυοβερδίνης που διευκρινίστηκε στην αρχή της δεκαετίας του 1980 περίπου 50 δομικά διαφορετικές δομές πυοβερδίνης έχουν αναγνωρισθεί μέχρι τώρα (Meyer et al., 2008). Η πυοβερδίνη αντιπροσωπεύει το κύριο σύστημα πρόσληψης σιδήρου των φθορίζον ψευδομονάδων και είναι απαραίτητη

για την μόλυνση σε πολλά διαφορετικά μοντέλα νόσου (Mossialos and Amoutzias, 2007).

Στην *P. aeruginosa* η παραγωγή των περισσότερων μολυσματικών της παραγόντων έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζεται από την αίσθηση μεγέθους πληθυσμού (Quorum sensing, QS) (Annaroorani et al., 2013) γι' αυτό και η αναστολή του είναι επιθυμητή (Kohler et al., 2010).

Στα βακτήρια, η διαφοροποίηση και ο συντονισμός της έκφρασης των γονιδίων επηρεάζονται από την πυκνότητα του πληθυσμού μέσω της ρυθμιζόμενης παραγωγής μικρών μορίων που λειτουργούν ως σήματα (Hazan et al., 2010).

Το Quorum sensing (QS) είναι ένας όρος που περιγράφει την βακτηριακή επικοινωνία που χρησιμοποιείται από πολλά βακτηριακά είδη και βασίζεται στην παραγωγή και ανίχνευση διάχυτων μορίων σήματος (Atkinson and Williams, 2009). Αυτά τα μόρια ενεργοποιούν σήματα, με αποτέλεσμα συλλογικές αλλαγές στην συμπεριφορά. Παρεμπόδιση του QS διαταράσσει τα αμυντικά μέτρα και την ρύθμιση της παθογένειας, με αποτέλεσμα την αποδυνάμωση μιας λοίμωξης που καθιστά αυτά τα μόρια πιο ευάλωτα σε βακτηριοκτόνα στοιχεία. Επιπλέον, αφού το QS δεν είναι απαραίτητο για την επιβίωση, μια στρατηγική για αναστολή του θα μειώσει την μολυσματικότητα ελαχιστοποιώντας ταυτόχρονα την επιλογή για αντίσταση (Wang et al., 2012).

Υπάρχουν δύο γνωστά QS συστήματα της *P. aeruginosa* τα οποία είναι τα LasIR και RhlIR (Smith and Iglewski, 2003). Όμως, ένα τρίτο σύστημα του QS γνωστό ως PQS ταυτοποιήθηκε σε αυτό το παθογόνο (McKnight et al., 2000) αλλά έχει αποδειχθεί σε προηγούμενες έρευνες ότι τα PQS, Las και Rhl συστήματα είναι αλληλένδετα το ένα στο άλλο (Diggle et al. 2003).

Για να επιταχύνει και να διευκολύνει την παθογένεια της, η *P. aeruginosa* παράγει Las και RHL μολυσματικούς παράγοντες, όπως είναι η έκκριση εξωτοξίνης, έξω-ενζύμων όπως οι πρωτεάσες, σερίνης, ελαστάσης και η παραγωγή βιοφίλμ (Annaroorani et al., 2013). Οι πρωτεάσες είναι πρωτεολυτικά ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση των πρωτεϊνών και με βάση τις δομές τους ή τις ιδιότητες του ενεργού κέντρου τους, χωρίζονται σε διάφορα είδη. Οι πρωτεάσες είναι βιομηχανικά σημαντικά ένζυμα και αποτελούν το ένα τέταρτο της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής ενζύμων (Raj et al., 2012). Αποτελεί πολύ γνωστό γεγονός ότι η εξωκυτταρική παραγωγή πρωτεασών σε μικροοργανισμούς επηρεάζεται σημαντικά από συστατικά, κυρίως πηγές άνθρακα, αζώτου και μεταλλικών ιόντων (Raj et al., 2012). Η *P. aeruginosa* εκκρίνει

πρωτεάσες σαν μολυσματικούς παράγοντες όπως η ελαστάση ή η αλκαλική πρωτεάση (Bardoel et al., 2012).

Η *P. aeruginosa* δεν προκαλεί συνήθως ασθένειες σε υγιείς ανθρώπους. Είναι ένας ευκαιριακά παθογόνος μικροοργανισμός. Ονομάζεται ευκαιριακός, επειδή η συμπεριφορά του εξαρτάται από τις συνθήκες. Μπορεί όμως να προκαλέσει θανατηφόρες λοιμώξεις σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα, σε ασθενείς με σοβαρά εγκαύματα (Kronka et al., 2013), με σοβαρές δερματικές βλάβες και σε ασθενείς που πάσχουν από κυστική ίνωση (Wang et al., 2012). Έχει ελάχιστες διατροφικές απαιτήσεις και μπορεί να ανεχθεί μια μεγάλη ποικιλία περιβαλλοντικών συνθηκών.

Η *P. aeruginosa* προκαλεί ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις όπως ουρολοιμώξεις, μηνιγγίτιδα, λοιμώξεις από καθετήρες, σηψαιμία, πνευμονία, διαπυήσεις τραυμάτων κ.α. Προκαλεί όμως και εξωνοσοκομειακές λοιμώξεις όπως ωτίτιδα, λοιμώξεις τραυμάτων, επιπεφυκίτιδα κ.α. Είναι υπεύθυνη για το 16% της νοσοκομειακής πνευμονίας, το 12% των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος, το 8% λοιμώξεων χειρουργικών τραυμάτων και το 10% λοιμώξεων του αίματος.

Η *P. aeruginosa* όπως και πολλά άλλα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, μπορεί να αποικοδομήσει τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες, όπως τις μεθυλοβενζίνες, που είναι τα υποπροϊόντα του πετρελαίου και χρησιμοποιούνται συνήθως ως διαλύτες για σμάλτα και χρώματα, καθώς και στην παραγωγή φαρμάκων και χημικών ουσιών. Οι μεθυλοβενζίνες θεωρούνται περιβαλλοντικοί ρύποι που τις συναντάμε στην ατμόσφαιρα, στα υπέδαφος, στα εδάφη, και στα επιφανειακά ύδατα. Η *P. aeruginosa* μπορεί να διασπάσει το τολουόλιο, που είναι η απλούστερη μορφή του μεθυλοβενζολίου. Αυτό γίνεται με την οξείδωση μας μεθυλίου σε αλδεΐδες, αλκοόλη και οξύ το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε κατεχολαμίνες. Ως εκ τούτου, η *P. aeruginosa* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της ρύπανσης.

Έχουν γίνει διάφορες έρευνες όπου έχει αποδειχθεί ότι το Manuka Honey καθώς και πολλά Ελληνικά μέλια αναστέλλουν την ανάπτυξη και την δράση της *P. aeruginosa* (Anthimidou and Mossialos, 2012, Sherlock et al., 2010).

1.9. Σκοπός της παρούσας μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της δράσης ελληνικών τύπων μελιού διαφόρων φυτικών πηγών όσο αφορά την πιθανή αναστολή μολυσματικών παραγόντων της *Pseudomonas aeruginosa*.

Στην παρούσα μελέτη εξετάσθηκαν 14 είδη μελιού ενάντια στην παραγωγή πρωτεασών, πυοβερδίνης και πυοκυανίνης από την *P. aeruginosa* συγκριτικά με το μέλι Manuka 15+ και ένα συνθετικό μέλι που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο.

Και στις 3 πειραματικές διαδικασίες εξετάσθηκε η ανάπτυξη της *P. aeruginosa* σε κατάλληλα θρεπτικά μέσα που ευνοούν την παραγωγή των ουσιών που εξετάσθηκαν και η επίδραση της προσθήκης των μελιών σε αυτά.

2. Πειραματικό μέρος

2.1. Υλικά

2.1.1. Δείγματα μελιών

Τα μέλια που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Εξετάστηκαν τα παρακάτω 14 δείγματα μελιών (Πίνακας 1). Κάθε δείγμα κατείχε ένα νούμερο κωδικό και λεπτομέρειες για την φυτική πηγή του.

Τα δείγματα μελιού ήταν αποθηκευμένα σε γυάλινα ή πλαστικά δοχεία σε θερμοκρασία δωματίου σε κλειστό χώρο.

Πίνακας 1. Δείγματα μελιών

| Κωδικός Δείγματος | Τύπος Μελιού | Ημερομηνία Παραγωγής | Περιοχή | Παραγωγός |
|-------------------|---------------------------|----------------------|--|---|
| 1 | Ρείκι Κωνοφόρο | 20-05-2009 | Δρυμός Σκυρίτιδος Βλαχοκερασιά Αρκαδίας | Ρουμελιώτης Βασίλειος <i>Αρκαδικό Μέλι</i> |
| 2 | Έλατο Μαινάλου | 15-06-2010 | Λειβιδίου | Ρουμελιώτης Βασίλειος <i>Αρκαδικό Μέλι</i> |
| 3 | Έλατο Βανίλια Μαινάλου | 15-06-2009 | Λειβιδίου | Ρουμελιώτης Βασίλειος <i>Αρκαδικό Μέλι</i> |
| 4 | Έλατο Βανίλια Μαινάλου | 15-06-2008 | Λειβιδίου | Ρουμελιώτης Βασίλειος <i>Αρκαδικό Μέλι</i> |
| 5 | Κουμαριά και Ρείκι | 30-11-2010 | Καλτεζές Αρκαδίας | Ρουμελιώτης Βασίλειος <i>Αρκαδικό Μέλι</i> |
| 6 | Καστανιά | 07-2009 | Άνω Δόλνα Αρκαδίας | Ρουμελιώτης Βασίλειος <i>Αρκαδικό Μέλι</i> |
| 7 | Πευκόμελο | 2010 | Θάσος | κ. Δρακάκη |
| 8 | Μέντα, ρίγανη, τσάι | 2010 | Δυτικός Όλυμπος | Αρβανίτης <i>Μελίχρυσος</i> |
| 14 | Ανθόμελο | 07-2010 | Βούρικας | Λαμπάδας Βάιος Αγροτικός Μελισσοκομικός |
| 19 | Ηλιάνθος | 2010 | Κομοτηνή | Συνεταιρισμός Νικήτης Χαλκιδικής |

| | | | | |
|----|--|------|--|---|
| 20 | Πορτοκάλι (σχεδόν 80% από άνθη πορτοκαλιάς) Βαμβάκι (με 20% περίπου άλλων ανθέων) | 2010 | Άργος | Αγροτικός Μελισσοκομικός Συνεταιρισμός Νικήτης Χαλκιδικής |
| 21 | Καστανιά με λίγο Πεύκο | 2010 | Σέρρες | Αγροτικός Μελισσοκομικός Συνεταιρισμός Νικήτης Χαλκιδικής |
| 23 | Μέλι Ανθέων (Άγρια ρίγανη και άγριο τριφύλλι) | 2010 | Άγιο Όρος | Αγροτικός Μελισσοκομικός Συνεταιρισμός Νικήτης Χαλκιδικής |
| 26 | Μέλι Ανθέων (Άγρια ρίγανη και άγριο τριφύλλι) | 2010 | Ορεινά λιβάδια και δάση του Ολύμπου | Σαμαράς Γεώργιος Κέντρο Μελισσοκομίας Θεσσαλίας (Βόλος) |

2.1.2. Αντιδραστήρια

Το μέλι Manuka που χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση με τα Ελληνικά μέλια ήταν της εταιρείας Manuka Health New Zealand, με OMF 15+ και MGO 550.



Το γάλα που χρησιμοποιήθηκε για την μέθοδο της αναστολής των πρωτεασών της *P. aeruginosa* ήταν γάλα αποβουτυρωμένο σε σκόνη στιγμιαίας διάλυσης του εμπορίου.

2.1.3. Συνθετικό μέλι

Το συνθετικό μέλι φτιάχτηκε στο εργαστήριο και χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικό control.

Ζυγίσθηκαν και αναμείχθηκαν 3,0 g σουκρόζης, 15 g μαλτόζης, 80,1 g φρουκτόζης και 67 g γλυκόζης (Sigma-Aldrich, Athens, Greece) σε 34 mL απιονισμένο νερό. Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 56°C μέχρι να διαλυθεί και έπειτα φυλάσσονταν σε κλειστό χώρο σε θερμοκρασία 24°C. Αυτό το διάλυμα αντιπροσωπεύει τα τέσσερα κυρίαρχα σάκχαρα που βρίσκονται στο μέλι (Sherlock et al., 2010, Anthimidou and Mossialos, 2012).

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Προετοιμασία καλλιέργειας *P. aeruginosa*

Για την προετοιμασία των καλλιεργειών της *P. aeruginosa* χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες (glycerol stock) που διατηρούνται στους -80°C.

Για την στερεή καλλιέργεια *P. aeruginosa*, με μικροβιολογικό κρίκο και σε ασηπτικό περιβάλλον παίρνεται μια μικρή ποσότητα βακτηρίων από την καλλιέργεια stock και τοποθετείται σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό υπόστρωμα LB agar. Γίνεται επίστρωση στο τρυβλίο και το τρυβλίο τοποθετείται για επώαση σε κλίβανο στους 37°C για 24 h.

Για την υγρή καλλιέργεια *P. aeruginosa*, παίρνεται από το τρυβλίο που αναπτύχθηκε η *P. aeruginosa* με μικροβιολογικό κρίκο και σε ασηπτικό περιβάλλον ένα κομμάτι από τις αποικίες και τοποθετείται σε vial με θρεπτικό υπόστρωμα LB Broth (5 mL). Έπειτα το vial τοποθετείται σε επωαστήρα υπό ανάδευση (incubator shaker) για 24 h στους 37°C στις 210 στροφές.

2.2.2. Έλεγχος της επίδρασης των μελιών στην πρωτεόλυση που προκαλεί η *P. aeruginosa*

Για τον έλεγχο της αναστολής των πρωτεασών της *P. aeruginosa* χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα PCA και 1,5% αποβουτυρωμένο γάλα. Για τον έλεγχο των μελιών προστέθηκε στο μίγμα PCA και γάλατος 4% ποσότητα μελιού. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε το Manuka Honey

(MH) και ως αρνητικό control το συνθετικό μέλι (SH) που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο.

Έπειτα έγινε προσθήκη 2 μL από υγρή καλλιέργεια της *P. aeruginosa* σε $\text{OD}_{600\text{nm}}=2,0$. Τα τρυβλία στην συνέχεια επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 25°C) για 48 h έως ότου παρατηρηθούν διαυγές φωτοστέφανα γύρω από τις αποικίες (Wang et al., 2012).

Για κάθε δείγμα μελιού έγιναν τρεις επαναληπτικές μετρήσεις και η συγκέντρωση του κάθε μελιού ήταν 4%.

2.2.3. Έλεγχος της επίδρασης των μελιών στην παραγωγή πυοβερδίνης από την *P. aeruginosa*

Για τον έλεγχο παραγωγής πυοβερδίνης από την *P. aeruginosa* χρησιμοποιήθηκαν vials με 5 mL θρεπτικό υπόστρωμα King's Broth (για 50 mL King's Broth χρειάζονται 1 g bacteriological peptone, 0,5 mL γλυκερόλη, 0,075 g KH_2PO_4 και 0,075 g MgSO_4) με την προσθήκη 4% ποσότητας μελιού. Σαν θετικό control χρησιμοποιήθηκε το Manuka Honey (MH) ενώ σαν αρνητικό control το συνθετικό μέλι (SH) που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο. Έπειτα έγινε προσθήκη 5 μL από υγρή καλλιέργεια της *P. aeruginosa* σε $\text{OD}_{600\text{nm}}=2,0$.

Στην συνέχεια, τα vials τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα στους 37°C για 24 h υπό ανάδευση στις 210 rpm.

Εμφάνιση πράσινο-κίτρινου χρώματος στα vials είναι ένδειξη έκκρισης πυοβερδίνης από την *P. aeruginosa*.

Τέλος, 1,5 mL από κάθε vial τοποθετήθηκε σε erpendorf και τοποθετήθηκαν για φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 3 min.

Το υπερκείμενο μετρήθηκε φωτομετρικά στα 405 nm και έπειτα υπολογίστηκε η συγκέντρωση της πυοβερδίνης με βάση τον τύπο 1:

$$A = e \times b \times C \quad [1]$$

Όπου: A η απορρόφηση στα 405nm

e ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης = $1,4 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

b = 1cm

C η συγκέντρωση

Για κάθε δείγμα μελιού έγιναν τρεις επαναληπτικές μετρήσεις με συγκέντρωση 4% κάθε μελιού και η απόδοση της συγκέντρωσης της πυοκυανίνης αναφέρεται στο μέσο όρο των μετρήσεων \pm την τυπική απόκλιση τους.

2.2.4. Έλεγχος της επίδρασης των μελιών στην παραγωγή πυοκυανίνης από *P. aeruginosa*

Για τον έλεγχο παραγωγής της πυοκυανίνης από την *P. aeruginosa* χρησιμοποιήθηκαν vials με 5 mL θρεπτικό υπόστρωμα LB Broth με την προσθήκη 4% ποσότητας μελιού. Σαν θετικό control χρησιμοποιήθηκε το Manuka Honey (MH) και σαν αρνητικό control το συνθετικό μέλι (SH) που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο. Έπειτα έγινε προσθήκη 5 μ L από υγρή καλλιέργεια της *P. aeruginosa* σε $OD_{600nm}=2,0$.

Στην συνέχεια, τα vials τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα στους 37°C για 24 h υπό ανάδευση στις 210 rpm.

Εμφάνιση πράσινο-κίτρινου χρώματος στα vials είναι ένδειξη έκκρισης πυοκυανίνης από την *P. aeruginosa*.

Έπειτα, 1 mL από κάθε vial τοποθετήθηκε σε erpendorf και μετρήθηκε σε φωτόμετρο η απορρόφηση στα 600 nm για να δούμε πόσο πυκνή είναι η καλλιέργεια. Τα υπόλοιπα 4 mL από τα vials μοιράστηκαν σε erpendorfs για φυγοκέντριση στις 12.000 rpm για 5 min. Ποσότητα 750 μ L από το υπερκείμενο από κάθε erpendorf αναμίχθηκε με ίση ποσότητα χλωροφόρμιου. Η κατώτερη μπλε φάση απομακρύνθηκε και αναμίχθηκε με ίση ποσότητα HCl 0,2 N. Παρατηρήθηκε νέος διαχωρισμός φάσεων και αποσπάστηκε η κόκκινη φάση η οποία μετρήθηκε φωτομετρικά στα 520 nm (Hazan et al., 2010).

Η συγκέντρωση της πυοκυανίνης υπολογίστηκε από τον τύπο $mg/L = A \times 17,072$.

Για κάθε δείγμα μελιού έγιναν τρεις επαναληπτικές μετρήσεις με συγκέντρωση 4% κάθε μελιού και η απόδοση της συγκέντρωσης της πυοκυανίνης αναφέρεται στο μέσο όρο των μετρήσεων \pm την τυπική απόκλιση τους.

3. Αποτελέσματα

Από βιβλιογραφικές αναφορές είναι τεκμηριωμένο ότι το μέλι Manuka έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες και ιδιαίτερα ενάντια σε βακτήρια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά (Cooper et al., 2002). Επίσης είναι πολύ αποτελεσματικό έναντι διαφόρων κλινικών στελεχών των βακτηρίων και ενισχύει την επίδραση των αντιβιοτικών όταν εφαρμόζεται σε δίσκους αντιβιοτικού (Wang et al., 2012). Επίσης έχουν γίνει και άλλες έρευνες που αποδεικνύουν την δράση Ελληνικών τύπων μελιού ενάντια στην *P. aeruginosa* (Anthimidou and Mossialos, 2012).

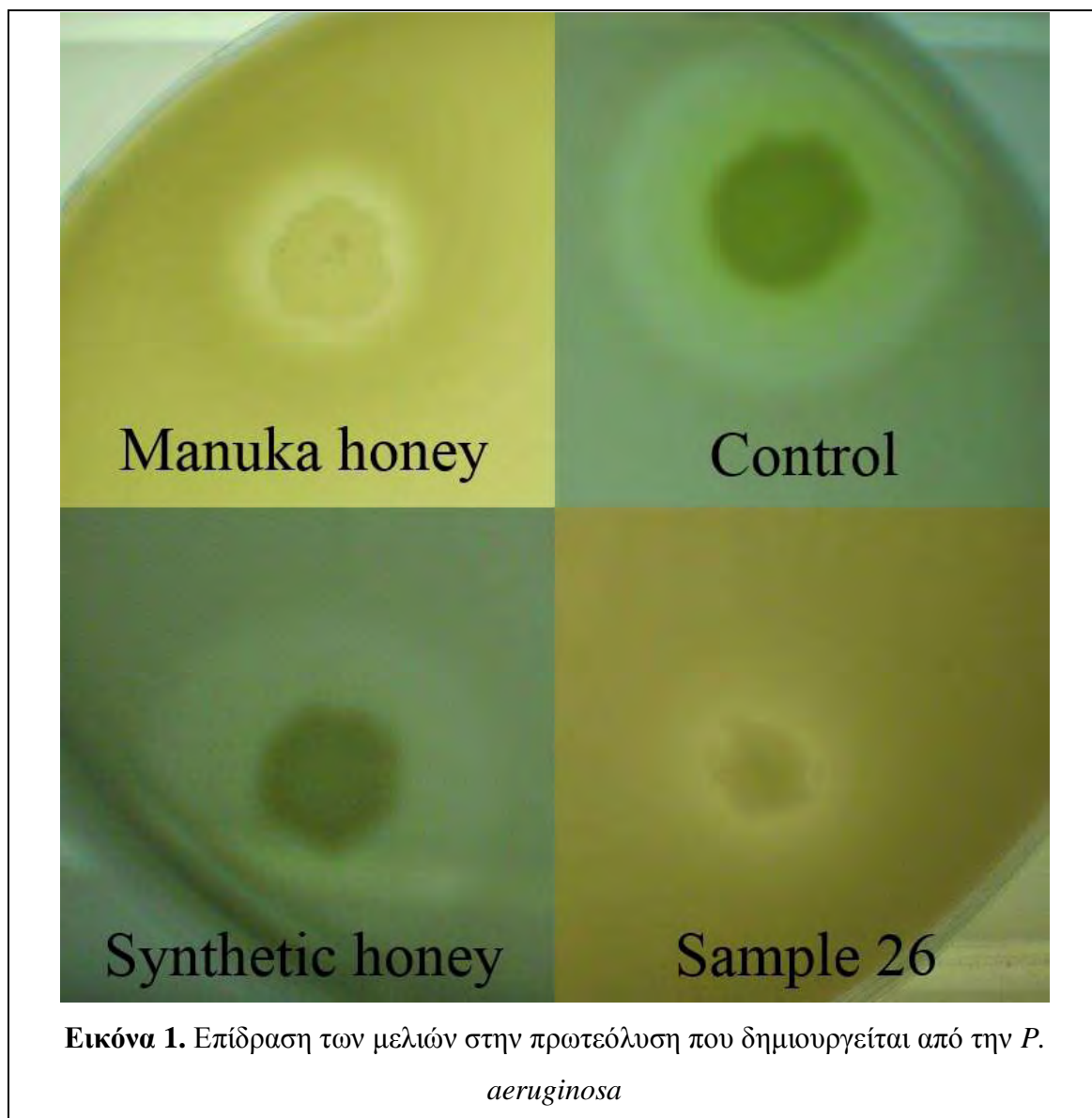
Βέβαια το κάθε μέλι διαφέρει στην δραστηριότητα του ενάντια στα βακτήρια και αυτό ίσως οφείλεται στις διαφορές των φυτικών πηγών του.

3.1. Αποτελέσματα της επίδρασης των μελιών στην πρωτεόλυση που προκαλεί η *P. aeruginosa*

Συνολικά μελετήθηκαν 14 μέλια από διαφορετικές φυτικές πηγές από διάφορα μέρη της Ελλάδας για τον έλεγχο της αναστολής της δράσης των πρωτεασών της *P. aeruginosa* με θετικό control το μέλι Manuka 15+ και αρνητικό control το συνθετικό μέλι.

Τα ελληνικά μέλια έδειξαν ίδια ή ακόμη και καλύτερη αναστολή της πρωτεόλυσης σε σχέση με την αναστολή που δημιουργούσε το μέλι Manuka με καλύτερα τα μέλια με αριθμό 14 και 26 τα οποία είναι μέλια ανθέων καθώς με την προσθήκη των μελιών σχεδόν εξαλείφθηκε το διαυγές φωτοστέφανο που δημιουργείται από την διάσπαση της καζεΐνης.

Το συνθετικό μέλι παρουσίασε μηδενική ή ελάχιστη αναστολή της πρωτεόλυσης καθώς δεν παρουσίασε καμία μείωση του φωτοστέφανου γύρω από τις αποικίες.



Εικόνα 1. Επίδραση των μελιών στην πρωτεόλυση που δημιουργείται από την *P. aeruginosa*

Πίνακας 2. Αποτελέσματα δράσης μελιών στην αναστολή της πρωτεόλυσης

| | Αναστολή Πρωτεόλυσης <i>P. aeruginosa</i> | | | |
|-----------------------|--|--------------|----------------|--------------|
| | Καμία* | Κακή* | Μέτρια* | Καλή* |
| Συνθετικό Μέλι | √ | | | |
| 1 | | | √ | |
| 2 | | | √ | |
| 3 | | | √ | |
| 4 | | | √ | |
| 5 | | | √ | |
| 6 | | | | √ |
| 7 | | | | √ |

| | | |
|----|---|---|
| 8 | | √ |
| 14 | | √ |
| 19 | | √ |
| 20 | | √ |
| 21 | √ | |
| 23 | √ | |
| 26 | | √ |

* Τα «Καμία, Κακή, Μέτρια, Καλή» αναφέρονται στην σύγκριση της αναστολής της πρωτεόλυσης της *Pseudomonas aeruginosa* σε σχέση με το μέλι Manuka.

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η δράση των μελιών ίσως εξαρτάται από την φυτική πηγή τους καθώς τα μέλια ανθέων είχαν την καλύτερη δράση ενώ για παράδειγμα, τα μέλια ελάτου δεν είχαν τόσο καλή.

Αυτό που έχει μεγαλύτερη σημασία είναι ότι ενώ τα σάκχαρα αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των μελιών και ενώ το συνθετικό μέλι είναι ένα διάλυμα το οποίο αντιπροσωπεύει τα τέσσερα κυριότερα σάκχαρα του μελιού, δεν είχε καμιά δράση ενάντια στην πρωτεόλυση που προκαλεί η *P. aeruginosa*.

Αυτό μας αποδεικνύει ότι η αντιμικροβιακή δράση των μελιών δεν εξαρτάται πλήρως από την συγκέντρωση των σακχάρων του αλλά από διάφορες άλλες ενώσεις που υπάρχουν στην δομή του.

3.2. Αποτελέσματα της επίδρασης των μελιών στην παραγωγή πυοβερδίνης από την *P. aeruginosa*

Συνολικά μελετήθηκαν 14 μέλια με διαφορετικές φυτικές πηγές από διάφορα μέρη της Ελλάδας για τον έλεγχο της αναστολής της παραγωγής πυοβερδίνης από την *P. aeruginosa* ενώ σαν θετικό control χρησιμοποιήθηκε το μέλι Manuka 15+ και σαν αρνητικό control το συνθετικό μέλι.

Με την παραγωγή της πυοβερδίνης αναμενόταν αλλαγή του χρώματος του θρεπτικού μέσου στο vial σε πράσινο - κίτρινο χρώμα το οποίο παρατηρήθηκε μόνο στο vial που χρησιμοποιήθηκε σαν control ενώ στα vials που είχε προστεθεί 4% ποσότητα μελιού δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή του χρώματος.



Εικόνα 2. Αλλαγή χρώματος σε θρεπτικό υπόστρωμα με την παραγωγή πυοβερδίνης από *P. aeruginosa*

Σε αυτή την πειραματική διαδικασία, τα ελληνικά μέλια μείωσαν αισθητά την παραγωγή πυοβερδίνης χωρίς να την αναστέλλουν τελείως σε σχέση με το μέλι Manuka το οποίο είχε την μικρότερη μείωση.

Το μέλι 26 το οποίο είναι μέλι ανθέων (άγρια ρίγανη και άγριο τριφύλλι) μείωσε περισσότερο την παραγωγή της πυοβερδίνης χωρίς βέβαια να έχει μεγάλη διαφορά από τα υπόλοιπα μέλια.

Επίσης παρατηρήθηκε ότι το συνθετικό μέλι είχε καλύτερη επίδραση στην παραγωγή της πυοβερδίνης καθώς μείωσε περισσότερο την συγκέντρωση της πυοβερδίνης από το μέλι Manuka αλλά όχι καλύτερη από τα ελληνικά μέλια.

Η συγκέντρωση της πυοβερδίνης υπολογίστηκε με βάση τον τύπο 1.

Πίνακας 3. Αποτελέσματα δράσης μελιών στην αναστολή παραγωγής της πυοβερδίνης

| | C Πυοβερδίνης* |
|----------------------------|----------------------------------|
| Control | $0,40 \times 10^{-4} \pm 0,04$ M |
| Συνθετικό Μέλι (SH) | $0,13 \times 10^{-4} \pm 0,02$ M |
| Manuka Honey (MH) | $0,23 \times 10^{-4} \pm 0,01$ M |

| | |
|----|----------------------------------|
| 1 | $0,07 \times 10^{-4} \pm 0,00$ M |
| 2 | $0,07 \times 10^{-4} \pm 0,01$ M |
| 3 | $0,08 \times 10^{-4} \pm 0,01$ M |
| 4 | $0,08 \times 10^{-4} \pm 0,01$ M |
| 5 | $0,09 \times 10^{-4} \pm 0,01$ M |
| 6 | $0,07 \times 10^{-4} \pm 0,00$ M |
| 7 | $0,07 \times 10^{-4} \pm 0,01$ M |
| 8 | $0,08 \times 10^{-4} \pm 0,01$ M |
| 14 | $0,07 \times 10^{-4} \pm 0,00$ M |
| 19 | $0,08 \times 10^{-4} \pm 0,01$ M |
| 20 | $0,09 \times 10^{-4} \pm 0,01$ M |
| 21 | $0,10 \times 10^{-4} \pm 0,00$ M |
| 23 | $0,08 \times 10^{-4} \pm 0,01$ M |
| 26 | $0,06 \times 10^{-4} \pm 0,00$ M |

* Η συγκέντρωση (C) της πυοβερδίνης αναφέρεται στον μέσο όρο \pm την τυπική απόκλιση των τριών μετρήσεων που έγιναν για κάθε μέλι.

Με βάση τα αποτελέσματα για τον έλεγχο αναστολής της παραγωγής της πυοβερδίνης από τα ελληνικά μέλια παρατηρούμε ότι η αντιμικροβιακή δράση των μελιών ενάντια στην πυοβερδίνη εξαρτάται από διάφορες ουσίες που συντελούν την δομή κάθε μελιού αλλά και από την συγκέντρωση σακχάρων καθώς και το συνθετικό μέλι που είναι ένα διάλυμα το οποίο αντιπροσωπεύει τα τέσσερα κυριότερα σάκχαρα του μελιού, είχε πολύ καλά αποτελέσματα ενάντια στην παραγωγή της πυοβερδίνης.

3.3. Αποτελέσματα της επίδρασης των μελιών στην παραγωγή πυοκυανίνης από την *P. aeruginosa*

Συνολικά μελετήθηκαν 14 μέλια με διαφορετικές φυτικές πηγές από διάφορα μέρη της Ελλάδας για τον έλεγχο της αναστολής της παραγωγής πυοκυανίνης από την *P. aeruginosa* με θετικό control το μέλι Manuka 15+ και αρνητικό control το συνθετικό μέλι.

Με την παραγωγή της πυοκυανίνης αναμενόταν αλλαγή του χρώματος του θρεπτικού μέσου στο vial σε πράσινο - κίτρινο χρώμα το οποίο παρατηρήθηκε μόνο στο vial που χρησιμοποιήθηκε σαν control ενώ στα vials που είχε προστεθεί 4% ποσότητα μελιού δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή του χρώματος.

Σε αυτή την πειραματική διαδικασία, τα ελληνικά μέλια μείωσαν αισθητά την παραγωγή πυοκυανίνης σε σχέση με το μέλι Manuka το οποίο είχε την μικρότερη μείωση.

Η συγκέντρωση της πυοκυανίνης υπολογίστηκε από τον τύπο 2:

$$\text{mg/L} = A \times 17,072 \quad [2]$$

Όπου: A η απορρόφηση του κάθε δείγματος στα 520 nm

Πίνακας 4. Αποτελέσματα δράσης μελιών στην αναστολή παραγωγής της πυοκυανίνης

| | C Πυοκυανίνης |
|----------------------------|----------------------|
| Control | 7,52 ± 0,20 mg/L |
| Συνθετικό Μέλι (SH) | 6,63 ± 0,10 mg/L |
| Manuka Honey (MH) | 7,88 ± 0,10 mg/L |
| 1 | 6,51 ± 0,10 mg/L |
| 2 | 6,72 ± 0,10 mg/L |
| 3 | 6,50 ± 0,10 mg/L |
| 4 | 6,65 ± 0,10 mg/L |
| 5 | 7,07 ± 0,10 mg/L |
| 6 | 6,72 ± 0,10 mg/L |
| 7 | 6,41 ± 0,10 mg/L |
| 8 | 6,38 ± 0,05 mg/L |
| 14 | 6,50 ± 0,06 mg/L |
| 19 | 6,53 ± 0,05 mg/L |
| 20 | 7,20 ± 0,10 mg/L |
| 21 | 7,42 ± 0,05 mg/L |
| 23 | 6,50 ± 0,10 mg/L |
| 26 | 6,63 ± 0,10 mg/L |

* Η συγκέντρωση (C) της πυοκυανίνης αναφέρεται στον μέσο όρο ± την τυπική απόκλιση των τριών μετρήσεων που έγιναν για κάθε μέλι αφού πρώτα είχε γίνει κανονικοποίηση των δειγμάτων με το control.

Τα μέλια 7 (πευκόμελο) και 8 (μέντα, ρίγανη, τσάι) εμφάνισαν την μεγαλύτερη μείωση στην παραγωγή της πυοκυανίνης χωρίς βέβαια να έχουν μεγάλη διαφορά από τα υπόλοιπα μέλια.

Επίσης παρατηρήθηκε ότι το συνθετικό μέλι είχε καλύτερη επίδραση στην παραγωγή της πυοκυανίνης από την *P. aeruginosa* καθώς μείωσε περισσότερο την συγκέντρωση της πυοκυανίνης από το μέλι Manuka αλλά δεν ξεπέρασε την επίδραση που είχαν τα ελληνικά μέλια.

Με βάση τα αποτελέσματα που είχαμε για την αναστολή της παραγωγής της πυοκυανίνης από τα ελληνικά μέλια παρατηρούμε ότι η αντιμικροβιακή δράση των μελιών εξαρτάται από διάφορες ουσίες που συντελούν την δομή κάθε μελιού αλλά και από την συγκέντρωση σακχάρων καθώς και το συνθετικό μέλι είχε πολύ καλά αποτελέσματα ενάντια στην παραγωγή της πυοκυανίνης αλλά δεν ξεπέρασε τα ελληνικά μέλια.

4. Συζήτηση

Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται εξάπλωση ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων (συμπεριλαμβανομένων νοσοκομειακών παθογόνων όπως η *P. aeruginosa*) γι' αυτό είναι αναγκαία η εύρεση εναλλακτικών θεραπειών. Η χρήση του μελιού αποτελεί μια τέτοια θεραπεία καθώς βοηθά στην επούλωση πληγών, εγκαυμάτων και έχει γίνει γνωστό για την αντιμικροβιακή του δράση (Alandejani et al., 2009, Wang et al., 2012).

Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού οφείλεται κυρίως στο υπεροξειδίο του υδρογόνου (Kwakman et al., 2010, Molan, 1999) και στην συγκέντρωση των σακχάρων του (Kwakman and Zaat, 2012). Επιπρόσθετα, συστατικά του μελιού, όπως αρωματικά οξέα ή φαινολικές ενώσεις και πρωτεΐνες συνεισφέρουν στην συνολική αντιμικροβιακή δραστηριότητα (Weston, 2000). Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού εξαρτάται από την φυτική πηγή από την οποία προέρχεται, από την γεωγραφική περιοχή της φυτικής πηγής, τις περιβαλλοντικές συνθήκες, οι οποίες επηρεάζουν τη φυτική πηγή.

Το μέλι Manuka έχει εγκριθεί για ιατρική χρήση σε επουλώσεις πληγών και έλκων λόγω της ισχυρής αντιμικροβιακής του δράσης. Είναι αποτελεσματικό έναντι βακτηρίων όπως η *P. aeruginosa* (Cooper and Molan, 1999) κ.α. Η μονάδα μέτρησης UMF (Unique Manuka Factor) κατηγοριοποιεί το μέλι με βάση την αντιμικροβιακή του δύναμη, όσο πιο υψηλότερο επίπεδο, τόσο πιο αποδοτική είναι η αντισηπτική δράση του Manuka. Επίσης έχει μια δραστική ουσία, την μεθυλγλυοξάλη (MGO) η οποία ανιχνεύεται σε εξαιρετικά υψηλά επίπεδα (Adams et al., 2008, Mavric et al., 2008).

Στην συγκεκριμένη μελέτη έγινε μια εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης ελληνικών τύπων μελιού διαφόρων φυτικών πηγών ενάντια στους μολυσματικούς παράγοντες της *P. aeruginosa*.

Συγκεκριμένα εξετάστηκαν 14 είδη μελιού ενάντια στην παραγωγή πρωτεασών, πνοβερδίνης και πνοκυανίνης από την *P. aeruginosa* με θετικό control το μέλι Manuka 15+ και αρνητικό control ένα συνθετικό μέλι που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο.

Τα ελληνικά μέλια έδειξαν ίδια ή ακόμη και καλύτερη αναστολή της πρωτεόλυσης της *P. aeruginosa* σε σχέση με το μέλι Manuka με καλύτερο το μέλι 26 το οποίο είναι μέλι ανθέων (άγρια ρίγανη και άγριο τριφύλλι) καθώς με την προσθήκη του σχεδόν εξαλείφθηκε το διαυγές φωτοστέφανο που δημιουργείται από την διάσπαση της καζεΐνης. Το συνθετικό μέλι παρουσίασε μηδενική αναστολή της πρωτεόλυσης καθώς δεν παρουσίασε καμία μείωση του φωτοστέφανου γύρω από τις αποικίες. Αυτό έρχεται

σε αντίθεση με την έρευνα των Wang et al. (2012) καθώς αποδεικνύει ότι η συγκέντρωση σακχάρων δεν παίζει τόσο σημαντικό ρόλο στον έλεγχο των πρωτεασών της *P. aeruginosa* αφού ενώ το συνθετικό μέλι είναι ένα διάλυμα το οποίο αντιπροσωπεύει τα τέσσερα κυριότερα σάκχαρα του μελιού, δεν είχε καμιά δράση ενάντια στην πρωτεόλυση που προκαλεί η *P. aeruginosa*. Αυτό μας αποδεικνύει ότι η αντιμικροβιακή δράση των μελιών δεν εξαρτάται πλήρως από την συγκέντρωση των σακχάρων του αλλά από διάφορες άλλες ενώσεις που υπάρχουν στην δομή του οι οποίες αποτελούν μια ποικιλία βιοδραστικών φυτοχημικών όπως τα φλαβονοειδή, φαινολικά και πεπτίδια/πρωτεΐνες (Mohammed and Azim, 2012).

Όσον αφορά τον έλεγχο για την αντιμικροβιακή δράση των μελιών ενάντια στην παραγωγή πυοβερδίνης, τα ελληνικά μέλια μείωσαν αισθητά την παραγωγή χωρίς να την αναστέλλουν τελείως σε σχέση με το μέλι Manuka το οποίο είχε την μικρότερη μείωση. Το μέλι με τον αριθμό 26 και αυτή την φορά ήταν το πιο αποτελεσματικό καθώς μείωσε περισσότερο την παραγωγή της πυοβερδίνης χωρίς βέβαια να έχει μεγάλη διαφορά από τα υπόλοιπα μέλια. Επίσης παρατηρήθηκε ότι το συνθετικό μέλι είχε καλύτερη επίδραση στην παραγωγή της πυοβερδίνης καθώς μείωσε περισσότερο την συγκέντρωση από το μέλι Manuka αλλά δεν είχε καλύτερη από τα ελληνικά μέλια.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα για την αναστολή της παραγωγής της πυοκυανίνης παρουσία μελιού παρατηρήθηκε μείωση με την προσθήκη των μελιών. Τα μέλια 7 (πευκόμελο) και 8 (μέντα, ρίγανη, τσάι) εμφάνισαν την μεγαλύτερη μείωση χωρίς βέβαια να έχουν μεγάλη διαφορά από τα υπόλοιπα μέλια και το συνθετικό μέλι, το οποίο εμφάνισε καλή μείωση σχεδόν ίδια με τα υπόλοιπα μέλια. Αυτό μας υποδεικνύει ότι σημαντικό ρόλο στην μείωση της πυοκυανίνης παίζει η συγκέντρωση σακχάρων του μελιού σε συνδυασμό με τις υπόλοιπες ενώσεις που αποτελούν το κάθε μέλι.

5. Βιβλιογραφία

Διαδίκτυο

1. Healthy Food House. Διαθέσιμο στο διαδίκτυο:
<http://www.healthyfoodhouse.com/the-amazing-benefits-of-honey/> (πρόσβαση: 22 Σεπτεμβρίου 2013)
2. Bio Honey Quality. Διαθέσιμο στο διαδίκτυο:
<http://biohoneyquality.wordpress.com/> (πρόσβαση: 22 Σεπτεμβρίου 2013)
3. Environmental Health Perspectives. Διαθέσιμο στο διαδίκτυο:
<http://ehp.niehs.nih.gov/120-a190/> (πρόσβαση: 22 Σεπτεμβρίου 2013)
4. Wikipedia. Διαθέσιμο στο διαδίκτυο: <http://en.wikipedia.org/wiki/Pyocyanine>
(πρόσβαση: 22 Σεπτεμβρίου 2013)
5. Pro – Health and Sports Nutrition. Διαθέσιμο στο διαδίκτυο: <http://www.pro-healthstore.co.uk/shop/manuka-honey-umh-15> (πρόσβαση: 22 Σεπτεμβρίου 2013)

Ελληνική

1. Ζερφυρίδης, Γ. (1998). Διατροφή του Ανθρώπου. Τέταρτη Έκδοση. Εκδόσεις Γιαχούδη. Θεσσαλονίκη, Ελλάδα.
2. Θρασυβούλου, Α. και Μανίκης, Ι. (1990). Κατηγορίες Ελληνικού Μελιού. Μελισσοκομική Επιθεώρηση **6**, 158-160.
3. Θρασυβούλου, Α. και Μανίκης, Ι. (1997). Η θέρμανση του μελιού χρήσιμη αλλά και επικίνδυνη. Μελισσοκομική Επιθεώρηση **11(2)**, 79-80.
4. Καϊλίδης, Σ.Δ. (1965). *Monophlebus hellenicus* (= *Marchalina hellenica*) Genn, Το μελισσοτροφικό έντομο της πεύκης. Δασικά χρονικά 81/82 **7-8**, 1-16.
5. Νικολόπουλος, Χ. (1965). Μορφολογία και βιολογία του είδους *Marchalina hellenica* (Gennadius). Έκδοση της Ανώτατης Γεωπονικής Σχολής 32.
6. Τσέλλιος, Δ. και Θρασυβούλου, Α. (1989). Μελισσοκομικοί χειρισμοί και μελισσοκομικά φυτά **2(7-8)**, 208-210.
7. Τυπάλδος - Ξυδίας, Α. (1979). Θάσος και Κασσάνδρα: οι μεγαλύτερες μελισσοκομικές περιφέρειες της Ελλάδας. Μελισσοκομική Ελλάς **29**, 105-111.

Ξενόγλωσση

1. Adams, C., Boulton, C., Deadman, B., Farr, J., Grainger, M., Manley-Harris, M. and Snow, M. (2008). Isolation by HPLC and characterization of the bioactive fraction of New Zealand Manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydrate research* **343**, 651-659.
2. Adams, C., Manley-Harris, M. and Molan, P. (2009). The origin of methylglyoxal in New Zealand Manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydrate research* **344**, 1050-1053.
3. Alandejani, T., Marsan, J., Ferris, W., Slinger, R. and Chan, F. (2009). Effectiveness of honey on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **141**, 114-118.
4. Allen, K., Molan, P. and Reid, G. (1991). A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **43** (12), 817-822.
5. Al-Waili, N., Al Ghamdi, A., Javed Ansari, M., Al-Attal, Y., Al-Mubarak, A. and Salom, K. (2013). Differences in composition of honey samples and their impact on the antimicrobial activities against drug multiresistant bacteria and pathogenic fungi. *Archives of Medical Research* **44** (4), 307-316.
6. Annapoorani, A., Kalpana, B., Syed Musthafa, K., Karutha Pandian, S. and Veera Ravi, A. (2013). Antipathogenic potential of *Rhizophora spp.* against the quorum sensing mediated virulence factors production in drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Phytomedicine* **20** (11), 956-963.
7. Anthimidou, E. and Mossialos, D. (2012). Antibacterial Activity of Greek and Cypriot Honeys against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in Comparison to Manuka Honey. *Journal of Medicinal Food* **16** (1), 42-47.
8. Atkinson, S. and Williams, P. (2009). Quorum sensing and social networking in the microbial world. *Journal of the Royal Society Interface* **6** (40), 959-978.
9. Bardoel, B., VanKessel, K., Van Strijp, J. and Milder, F. (2012). Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence: Characterization of the AprA–AprI Interface and Species Selectivity. *Journal of Molecular Biology* **415** (3), 573-583.
10. Carnwath, R., Graham, E., Reynolds, K. and Pollock, P. (2013). The antimicrobial activity of honey against common equine wound bacterial isolates.

The Veterinary Journal <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.07.003> (Article in press).

11. Cooper, R., Molan, P. and Harding, K. (2002). The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *Journal of Applied Microbiology* **93**, 857-863.
12. Diggle, S., Winzer, K., Chhabra, S., Worrall, K., Camara, M. and Williams, P. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Molecular Microbiology* **50**, 29–43.
13. Efem, S. (1988). Clinical observations on the wound healing dressing with pure natural honey. *British Journal of Surgery* **75**, 679-681.
14. Hazan, R., He, J., Xiao, G., Dekimpe, V., Apidianakis, Y., Lesic, B., Deziel, E., Astrakas, C., Lepine, F. and Rahme, L. (2010). Homeostatic Interplay between Bacterial Cell-Cell Signaling and Iron in Virulence. *PLoS Pathogens* **6** (3), e1000810.
15. Kohler, T., Perron, G., Buckling, A. and Van Delden, C. (2010). Quorum sensing inhibition selects for virulence and cooperation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens* **6** (5), 1-6.
16. Kronda, J., Cooper, R. and Maddocks, S. (2013). Manuka honey inhibits siderophore production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology* **115** (1), 86-90.
17. Kwakman, P. and Zaat, S. (2012). Antibacterial Components of Honey. *IUBMB Life* **64** (1), 48-55.
18. Kwakman, P., te Velde, A., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, C. and Zaat, S. (2010). How honey kills bacteria. *The FASEB Journal* **24** (7), 2576-2582.
19. Kwakman, P., te Velde, A., de Boer, L., Vandenbroucke-Grauls, C. and Zaat, S. (2011). Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity. *Plos One* **6** (3), e17709.
20. Kwakman, P., Van Den Akker, J., Güçlü, A., Aslami, H., Binnekade, J., De Boer, L., Boszhard, L. et al. (2008). Medical-grade honey kills antibiotic-resistant bacteria in vitro and eradicates skin colonization. *Clinical Infectious Diseases* **46** (11), 1677-1682.

21. Mandal, S., DebMandal, M., Kumar Pal, N. and Saha, S. (2010). Antibacterial activity of honey against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **3** (12), 961-964.
22. Manwar, A., Khandelwal, S., Chaudhari, B., Meyer, J. and Chincholkar, S. (2004). Siderophore production by a Marine *Pseudomonas aeruginosa* and its antagonistic action against phytopathogenic fungi. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **118** (1-3), 243-251.
23. Mavric, E., Wittmann, S., Barth, G. and Henle, T. (2008). Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Molecular Nutrition & Food Research* **52**, 483-489.
24. McKnight, S., Iglewski, B. and Pesci, E. (2000). The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **182** (10), 2702–2708.
25. Meyer, J., Gruffaz, C., Raharinosy, V., Bezverbnaya, I., Schäfer, M. and Budzikiewicz, H. (2008). Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. *Biometals* **21** (3), 259-271.
26. Mohammed, E. and Azim, M. (2012). Characterisation of natural honey proteins: Implications for the floral and geographical origin of honey. *International Journal of Food Science and Technology* **47** (2), 362–368.
27. Molan, P. (1999). The role of honey in the management of wounds. *Journal of Wound Care* **8** (8), 415-418.
28. Mossialos, D. and Amoutzias, G. (2007). Siderophores in fluorescent pseudomonads: new tricks from an old dog. *Future Microbiology* **2** (4), 387-395.
29. Mossialos, D. and Amoutzias, G. (2009). Role of siderophores in cystic fibrosis pathogenesis: Foes or friends? *International Journal of Medical Microbiology* **299** (2), 87-98.
30. Mundo, M., Padilla-Zakour, O. and Worobo, R. (2004). Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *International Journal of Food Microbiology* **97** (1), 1-8.

31. Olaitan, P., Adeleke, O. and Ola, I. (2007). Honey: A reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences* **7** (3), 159-165.
32. Raj, A., Khess, N., Pujari, N., Bhattacharya, S., Das, A. and Sundara Rajan, S. (2012). Enhancement of protease production by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dairy effluent sludge and determination of its fibrinolytic potential. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2** (3), 1845-1851.
33. Sherlock, O., Dolan, A., Athman, R., Power, A., Gethin, G., Cowman, S. and Humphreys, H. (2010). Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Complementary and Alternative Medicine* **10** (47), 1-5.
34. Smith, R. and Iglewski, B. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *Journal of Clinical Investigation* **112** (10), 1460–1465.
35. Taormina, P., Niemira, B. and Beuchat, L. (2001). Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *International Journal of Food Microbiology* **69**, 217-225.
36. Visca, P., Imperi, F. and Lamont, I. (2007). Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends in Microbiology* **15** (1), 22-30.
37. Wang, R., Starkey, M., Hazan, R. and Rahme, L. (2012). Honey's ability to counter bacterial infections arises from both bactericidal compounds and QS inhibition. *Frontiers in Microbiology* **3** (144), 1-8.
38. Weston, R. (2000). The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chemistry* **71** (2), 235-239.
39. White, J.W.Jr. (1993). Honey, in the hive and the honey bee. *Dadant and Sons Publication Hamilton-Illinois* 869-895.
40. Yeterian, E., Martin, L., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I. and Schalk, I. (2010). Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino Acids* **38** (5), 1447-1459.
41. Zumla, A. and Luat, A. (1989). Honey - a remedy rediscovered. *Journal of the Royal Society of Medicine* **82**(7), 384-385.