

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας**

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



ΕΛΕΝΗ ΚΑΤΣΙΒΕΛΟΥ

**ΑΝΑΣΤΟΛΗ *in vitro* ΤΗΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΒΙΟΥΜΕΝΩΝ
ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΜΕΛΙΩΝ
ΟΛΥΜΠΟΥ**

ΛΑΡΙΣΑ 2018

**Αναστολή in vitro της δημιουργίας βιοϋμένων παθογόνων βακτηρίων
παρουσία μελιών του Ολύμπου.**

**In vitro inhibition of the biofilm formation of pathogenic bacteria in
the presence of Olympus honey.**

Μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής :

- **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.
- **Αμούτζιας Γρηγόριος:** Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας τη χρονική περίοδο από Απρίλιο 2017 μέχρι τον Φεβρουάριο 2018. Η πειραματική διαδικασία έλαβε χώρα στο εργαστήριο

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Μόσιαλο Δημήτριο, Επίκουρο Καθηγητή Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε αλλά και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αναθέτοντας μου αυτή την εργασία, αλλά και την πολύτιμη καθοδήγησή του, χωρίς την οποία, η εκπόνηση και ολοκλήρωση τόσο της πειραματικής διαδικασίας όσο και της συγγραφής θα ήταν ακατόρθωτη. Επίσης, ευχαριστώ τον κύριο Μαρκουλάτο Παναγιώτη, καθηγητή Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τον κύριο Αμούτζια Γρηγόριο, Επίκουρο Καθηγητή Βιοπληροφορικής στη Γενωμική του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε οικογένεια και φίλους, που με στήριξαν, δίνοντάς μου κουράγιο, ώστε να συνεχίσω με όρεξη και μεγαλύτερη αυτοπεποίθηση.

Αναστολή *in vitro* της δημιουργίας βιουμένων παθογόνων βακτηρίων παρουσία μελιών του Ολύμπου

Ελένη Κατσίβελου

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: Βιοτεχνολογία – Ποιότητα
Διατροφής και Περιβάλλοντος

Περίληψη

Πολλά βακτήρια, για να μπορέσουν να επιβιώσουν σε αντίξοες περιβαλλοντικές καταστάσεις, δημιουργούν ένα είδος προστατευτικού καλύμματος, το λεγόμενο βιοϋμένα. Η δημιουργία αυτής της διάταξης, καθιστά ορισμένα βακτήρια πολύ επικίνδυνα για τον ανθρώπινο οργανισμό, διότι τους εξασφαλίζει αντοχή σε διάφορες φαρμακευτικές θεραπείες, με αποτέλεσμα διάφορες λοιμώξεις να απειλούν ακόμα και τη ζωή ενός ασθενούς. Διάφορες έρευνες αποδεικνύουν ότι πιθανή λύση για τη θεραπεία διαφόρων πληγών που έχουν μολυνθεί από τέτοιου είδους βακτήρια, είναι η χρήση του μελιού manuka, που παράγεται στη Νέα Ζηλανδία και είναι ευρέως γνωστό για τις αντιβακτηριακές του ιδιότητες. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η επίδραση ορισμένων μελιών, που προέρχονται από την ευρύτερη περιοχή του Ολύμπου, στη δημιουργία βιοϋμένων από τα παθογόνα βακτήρια *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa*. Για το σκοπό αυτό, έγινε επώαση των παθογόνων βακτηρίων με διάφορες αραιώσεις μελιών Ολύμπου αλλά και μελιού manuka. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, η χρήση των μελιών Ολύμπου, ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις ήταν ικανή να μειώσει αισθητά τη δημιουργία βιοϋμένων. Σε πολλές περιπτώσεις η μείωση ήταν μεγαλύτερη από αυτή του μελιού manuka.

In vitro inhibition of the biofilm formation of pathogenic bacteria in the presence of Olympus honey.

Eleni Katsivelou

University of Thessaly, Dept. of Biochemistry and Biotechnology,
Biotechnology – Nutrition and Environment

Abstract

In order to survive in adverse environmental conditions, many bacteria create a sort of protective cover, the so-called biofilm. Biofilm makes certain bacteria very dangerous to the human body, because it provides resistance to various drug therapies, resulting in several infections, even threatening a patient's life. Several studies have shown that a possible solution for the treatment of various wounds which have been infected by such bacteria, is the use of manuka honey. Manuka honey is produced in New Zealand and it is widely known for its antibacterial properties. In the present study, the effect of Olympus honey on biofilm formation of the pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* has been studied. For this purpose, pathogenic bacteria were incubated with various dilutions of Olympus honey and manuka honey. The results showed that the use of Olympus honey, even at low concentrations, was able to substantially reduce the generation of biofilm. In many cases, the reduction was greater than the one of manuka honey.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	3
Περίληψη	4
Abstract.....	5
Περιεχόμενα.....	6
Εισαγωγή.....	9
1 ΤΟ ΜΕΛΙ.....	10
1.1 Ιστορική αναδρομή	10
1.2 Ορισμός και τρόπος παρασκευής	11
1.2.1 Ορισμός.....	11
1.2.2 Τρόπος παρασκευής του μελιού από τις μέλισσες	12
1.3 Κατηγορίες μελιού	14
1.3.1 Ανάλογα με τον τρόπο παραγωγής ή και εκμετάλλευσης	14
1.3.2 Ανάλογα με τη φυτική προέλευσή του	15
1.3.3 Είδη μελιού στην Ελλάδα	16
1.4 Μέλι Mānuka	25
1.5 Μέλια Ολύμπου	26
1.6 Θρεπτικά συστατικά και σύσταση του μελιού	27
1.7 Θεραπευτικές ιδιότητες και ευεργετικές δράσεις.....	31
1.8 Αντιβακτηριακή και αντιοξειδωτική δράση μελιού	34
1.8.1 Αντιβακτηριακές ιδιότητες	34
1.8.2 Αντιοξειδωτική δράση	37
2 ΒΙΟΪΜΕΝΕΣ	40
2.1 Τι είναι οι βιοϊμένες	40
2.2 Σχηματισμός βιοϊμένων	41
2.2.1 Πώς σχηματίζονται οι βιοϊμένες.....	41
2.2.2 Η σημασία του quorum sensing στο σχηματισμό των βιοϊμένων	42
2.3 Ο ρόλος των βιοϊμένων στην ανθεκτικότητα των βακτηρίων.....	44
3 STAPHYLOCOCCUS AUREUS.....	47
3.1 Γενικές πληροφορίες.....	47

3.2	Παθογένεια	48
4	PSEUDOMONAS AERUGINOSA	52
4.1	Γενικές πληροφορίες.....	52
4.2	Παθογένεια	53
5	ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	56
6	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	57
6.1	Υλικά.....	57
6.2	Μέθοδοι.....	58
6.2.1	Παρασκευή συνθετικού μελιού.....	58
6.2.2	Δημιουργία stock γλυκερόλης.....	58
6.2.3	Καλλιέργειες των βακτηρίων σε τρυβλία με Mueller Hinton II Agar	59
6.2.4	Υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων με Nutrient Broth	59
6.2.5	Παρασκευή διαλύματος crystal violet 0,4% v/v.....	60
6.2.6	Πειραματική διαδικασία.....	60
6.2.7	Δοκιμή για το κατάλληλο υπόστρωμα για τη δημιουργία βιοϋμένων .	63
7	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	64
7.1	Αποτελέσματα για τον <i>Staphylococcus aureus</i>	64
7.2	Αποτελέσματα για την <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	65
8	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	67
9	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69

Εικόνα 1-1: Τοιχογραφία σε σπήλαιο της Βαλένσια που απεικονίζει έναν άνθρωπο να μαζεύει μέλι.....	11
Εικόνα 1-2: Πεύκο (<i>Pinus halepensis</i>)	16
Εικόνα 1-3: Ελάτη (<i>Abies</i> sp)	17
Εικόνα 1-4: Καστανιά (<i>Castanea sativa</i>)	18
Εικόνα 1-5: Πορτοκαλιά (<i>Citrus X sinensis</i>)	19
Εικόνα 1-6: Θυμαρί (<i>Thymus</i> sp)	20
Εικόνα 1-7: Ερείκη (<i>Erica multipolyflora</i>)	21
Εικόνα 1-8: Βαμβάκι (<i>Gossypium</i>)	22
Εικόνα 1-9: Ηλίανθος (<i>Helianthus annuus</i>)	22
Εικόνα 1-10: Πολύκομπο (<i>Polygonum</i> spp).....	23
Εικόνα 1-11: Κουμαριά (<i>Arbutus unedo</i>)	24
Εικόνα 1-12: Manuka φυτό	25
Εικόνα 2-1: Σχηματισμός βιοϋμένα.....	42
Εικόνα 2-2: Quorum sensing	44
Εικόνα 3-1: <i>Staphylococcus aureus</i>	47
Εικόνα 4-1: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53
Εικόνα 6-1: Μικροπλάκα στο πρώτο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας	61
Εικόνα 6-2: Εμφάνιση βιοϋμένων από <i>Ps. aeruginosa</i> μετά από χρώση και έκπλυση	62

Το μέλι είναι το σημαντικότερο βασικό προϊόν της μελισσοκομίας τόσο από ποσοτική όσο και από οικονομική άποψη (R. Krell, 1996), ενώ ταυτόχρονα είναι μια από τις τροφές που συγκεντρώνει ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον, κυρίως λόγω των θρεπτικών συστατικών του αλλά και επειδή παρουσιάζει έντονη αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή και κυτταροπροστατευτική δράση.

Ενώ αποτελεί αδιαμφισβήτητο γεγονός η ύπαρξη αντιοξειδωτικής και αντιβακτηριακής δράσης στο μέλι (Joirisch, 1970· White JW et al, 1963· Herold, 1970· Wadhan, 1998). Υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν, ότι ορισμένα μέλια παρουσιάζουν εντονότερη αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση από άλλα (Σάρδαλου Γ και συν, 2002), γεγονός που ενισχύει την έρευνα με απώτερο σκοπό τη χρήση των συγκεκριμένων μελιών για ιατρικούς σκοπούς.

Ένα κομμάτι της έρευνας με μεγάλο ενδιαφέρον, είναι αυτό της χρήσης μελιού για τη θανάτωση παθογόνων μικροοργανισμών που έχουν απομονωθεί από χρόνιες πληγές ασθενών και κάποιες φορές δεν μπορούν να θεραπευθούν με τη χρήση αντιβιοτικών. Αυτό συμβαίνει διότι κάποια στελέχη αυτών των μικροοργανισμών έχουν αποκτήσει ανοχή σε αντιβιοτικά ή γιατί σχηματίζουν τους λεγόμενους βιοϋμένες, οι οποίοι δρουν προστατευτικά ως προς αυτά τα βακτήρια με αποτέλεσμα να μπορούν να επιβιώσουν σε καταστάσεις σοκ (Allie Clinton et al., 2015 & Jing Lu et al., 2014). Τα βακτηριακά είδη στα οποία έχει γίνει η εντονότερη μελέτη είναι τα: *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa*, τα οποία συσχετίζονται επίσης συχνά με τις χρόνιες πληγές (Amin Omar et al., 2017).

1.1 Ιστορική αναδρομή

Η μέλισσα πρωτοεμφανίστηκε στον πλανήτη πριν από 65 εκατομμύρια χρόνια. Υποθέτοντας λοιπόν, ότι μαζί με τις μέλισσες εμφανίστηκε και το μέλι, συμπεραίνουμε ότι από τότε, μέχρι και τον 16ο μ.Χ. αιώνα, το μέλι ήταν το μοναδικό ζαχαρώδες μη παρασκευασμένο τρόφιμο στον τότε «γνωστό» κόσμο (melissokomia net.gr).

Στην Αρχαία Ελλάδα, οι αναφορές στην Οδύσσεια για το μέλι, αποδεικνύουν όχι μόνο την ύπαρξή του, αλλά και τη χρήση του ως τρόφιμο και μάλιστα ως εκλεκτό τρόφιμο. Βέβαια, τα έργα του Ομήρου δεν αποτελούν μοναδική αναφορά στο μέλι, αφού και πολλοί άλλοι συγγραφείς κάνουν λόγο για αυτό, ενδεικτικά αναφέρονται ορισμένοι: Δημόκριτος, Ξενοφώντας, Αριστοτέλης, Πλάτωνας. Επίσης, ο πατέρας της Ιατρικής Ιπποκράτης (462-352 π.Χ.), συνιστούσε το μέλι σε όλους τους ανθρώπους και κυρίως στους ασθενείς. Τέλος, υπάρχουν πληροφορίες για τον τρόπο με τον οποίο καταναλωνόταν τότε το μέλι:

- Μηλόμελο: Μήλα διατηρημένα σε μέλι καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου έτσι ώστε το μέλι να αποκτήσει τα χαρακτηριστική οσμή των μήλων (ίδια συνταγή γινόταν και με άλλα φρούτα).
- Μελίκρατο: Μέλι με γάλα ως τροφή των παιδιών.
- Οξύμελο: Μέλι με ξύδι για την αντιμετώπιση του πυρετού.
- Υδρόμελο: Ηδύποτο που προκύπτει από αλκοολική ζύμωση του μελιού.
- Οινόμελο: μέλι με κρασί.
- Εφθόν γλεύκος: είδος μουσταλευριάς.

(Λίβερη Αγγελική, 2000· Μπίκος, 1991)

Βέβαια, το μέλι πανευρωπαϊκά δεν εμφανίζεται μόνο στην αρχαία Ελλάδα αλλά και στην Ισπανία και συγκεκριμένα στη Βαλένσια, όπου απεικονίζονται συλλογές μελιού

σε μεσολιθικές σπηλαιογραφίες, κατά την 6η χιλιετία π.Χ. Άλλα ευρήματα που μαρτυρούν την ύπαρξη μελιού εκτός Ευρώπης ανακαλύφθηκαν στην Αφρική (KwaZulu Natal, Zimbabwe), στην Ασία (Bhutan), και την Αυστραλία (Queensland) (Eva Crane, 1999).



Εικόνα 1-1: Τοιχογραφία σε σπήλαιο της Βαλένσια που απεικονίζει έναν άνθρωπο να μαζεύει μέλι.

Είναι φανερό λοιπόν, ότι το μέλι ανέκαθεν αποτελούσε μια σημαντική τροφή αλλά και «φάρμακο» για το ανθρώπινο είδος, διότι συμβάλει στην υγεία και συνδέεται άρρηκτα με τη μακροζωία.

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο, παρουσιάζονται ορισμένα βασικά χαρακτηριστικά και ιδιότητες του μελιού. Γίνεται αναφορά στα είδη μελιού και κυρίως στα ελληνικά μέλια και τέλος, επισημαίνονται τα βασικά χαρακτηριστικά και οι ευεργετικές ιδιότητες του μελιού Manuka που το έχουν κάνει γνωστό και περιζήτητο ανά την υφήλιο.

1.2 Ορισμός και τρόπος παρασκευής

1.2.1 Ορισμός

Μέλι είναι η φυσική γλυκιά ουσία που παράγουν οι μέλισσες του είδους *Apis mellifera* από το νέκταρ των φυτών ή από εκκρίσεις ζώντων μερών φυτών ή εκκρίματα εντόμων απομυζούντων φυτά ευρισκόμενα πάνω στα ζώντα μέρη των φυτών, τα οποία οι μέλισσες συλλέγουν, μετατρέπουν αναμειγνύοντας με ειδικές

ύλες του σώματός τους, αποθέτουν, αφυδατώνουν, εναποθηκεύουν και φυλάσσουν στις κηρήθρες της κυψέλης, προκειμένου να ωριμάσουν (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, Άρθρο 67, 2016).

Ένας περιεκτικός ορισμός για το μέλι έχει διατυπωθεί από τον E. F. Phillips 1930 και αναφέρει ότι: το μέλι είναι ένα αρωματικό, γλοιώδες, γλυκό υλικό που προέρχεται από το νέκταρ των φυτών, το οποίο μαζεύουν οι μέλισσες και το μεταβάλλουν για την τροφή τους σε ένα πυκνότερο υγρό και τελικά το αποθηκεύουν στις κηρήθρες τους. Είναι όξινης αντίδρασης, ρευστό στην αρχική μορφή του, αλλά μεταβάλλεται σε κρυσταλλικό όταν μείνει πολύ καιρό. Αποτελείται κυρίως από δύο απλά ζάχαρα, την γλυκόζη (δεξτρόζη) και την φρουκτόζη (λεβουλόζη), με παρουσία κατά περιπτώσεις πιο σύνθετων υδατανθράκων, με επικρατέστερη συνήθως την λεβουλόζη και περιέχει ανόργανες ουσίες, φυτικά χρωστικά υλικά, μερικά ένζυμα και κόκκους γύρεως.

Στην ουσία λοιπόν, το μέλι αποτελεί την τροφή των μελισσών σε αντίξοες καιρικές συνθήκες, ενώ για τη χρονική περίοδο που τα φυτά μπορούν να «προσφέρουν» νέκταρ ή μελίτωμα οι μέλισσες τα προτιμούν ως τροφή.

1.2.2 Τρόπος παρασκευής του μελιού από τις μέλισσες.

Το νέκταρ είναι ένα ζαχαρούχο υγρό που εκκρίνουν τα άνθη. Αυτό αποτελεί την πρώτη ύλη για τη δημιουργία μελιού. Οι μέλισσες το μαζεύουν στον προλοβό τους και το μεταφέρουν στην κυψέλη, όπου άλλες μέλισσες το παραλαμβάνουν από το στόμα τους και το αποθηκεύουν μέσα στις κηρήθρες (Δερματόπουλος Β., 1977). Πριν τοποθετηθεί το νέκταρ στις κηρήθρες, οι μέλισσες που το έχουν στον προλοβό τους απελευθερώνουν διάφορα ένζυμα σ' αυτό από τους σιελογόνους και υποφαρυγγικούς αδένες. Οι υποφαρυγγικοί αδένες, είναι πολύ ανεπτυγμένοι στη νεαρή εργάτρια και παράγουν το βασιλικό πολτό. Αντίθετα, εμφανίζονται συρρικνωμένοι στις εργάτριες μεγαλύτερης ηλικίας και παράγουν το ένζυμο ιμπερτάση, που είναι απαραίτητο για τη μετατροπή του νέκταρος σε μέλι και το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης, που μετατρέπει τη γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ. Για να

μετατραπεί το νέκταρ (φυτικός χυμός) σε μέλι γίνεται χημική αποδόμηση του δισακχαρίτη σουκρόζη (κοινή ζάχαρη) και παράγονται τα σταμονοσάκχαρα της γλυκόζης και φρουκτόζης, που έχουν την ιδιότητα να αφομοιώνονται άμεσα. Στη συνέχεια, γίνεται η ανασύνθεση δι- και τριζαχαριτών, αλλά είναι ποσοτικά πολύ περιορισμένη. Οι αρωματικές (διάφορα τερπένια) και οι χρωστικές ουσίες που περιέχονται στον φυτικό χυμό δεν μεταβολίζονται, ενώ το μέλι εμπλουτίζεται ακόμη περισσότερο με το άρωμα των οργανικών οξέων από τη διάσπαση της γλυκόζης. Ο μεταβολισμός των σακχάρων συνεχίζεται στους αδένες των μελισσών εργατριών, καθώς προστίθενται και άλλα ένζυμα. Τα διάφορα μεταλλικά στοιχεία του μελιού παραμένουν ακριβώς τα ίδια με αυτά που περιέχονται στον πρωτογενή φυτικό χυμό (Zanber & Maurizio, 1984). Όσο το νέκταρ βρίσκεται στις κηρήθρες χάνει ένα μεγάλο κομμάτι της υγρασίας του (από 90% γίνεται 16-17%) λόγω της ζέστης που επικρατεί μέσα στην κυψέλη και του φτερουγίσματος των μελισσών που προκαλεί ρεύμα αέρος από μέσα προς τα έξω. Στη συνέχεια, με τα ένζυμα που έχει πάρει από τα στομάχια των μελισσών, συνεχίζεται και ολοκληρώνεται ο μεταβολισμός των σακχάρων μέσα στις κηρήθρες. Τέλος, οι μέλισσες το σφραγίζουν με ένα λεπτό στρώμα από κερί για να διατηρηθεί (Δερματόπουλος Β., 1977 & Anthimidou and Mossialos 2013).

Πολλά είδη φυτών είναι εφοδιασμένα με αδένες που εκκρίνουν γλυκά υγρά και είναι τοποθετημένοι έξω από τα άνθη, το μέλι που προέρχεται από αυτές τις πηγές ονομάζεται φυτικό μελίτωμα. Επειδή η χημική σύνθεσή του είναι ίδια μ' εκείνο που προέρχεται από τα νεκτάρια των λουλουδιών περιλαμβάνεται στο γενικό ορισμό «μέλι». Η κυριότερη πηγή μελιτώματος δεν είναι οι φυτικές εκκρίσεις αλλά οι εκκρίσεις εντόμων. Μερικά έντομα «μυζητικά» των φυτών αποβάλουν τους υδατάνθρακες που δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν από τους χυμούς των φυτών που απομυζούν χωρίς να τους μετουσιώνουν. Έτσι, σχηματίζονται σταγονίδια που πέφτουν πάνω στα φύλλα και στα στελέχη και σκεπάζουν ακόμα και το έδαφος κάτω από τα δένδρα. Όταν αυτοί οι χυμοί περιέχουν αρκετό σάκχαρο, ώστε να είναι ελκυστικοί, οι μέλισσες τους μαζεύουν και τους επεξεργάζονται όπως το νέκταρ και τους σφραγίζουν μέσα στις κηρήθρες (Δερματόπουλος Β., 1977).

Η ικανότητα των μελισσών να μετατρέπουν το ευαίσθητο σε ζυμώσεις (και επομένως σε αλλοιώσεις) νέκταρ και αντίστοιχα το μελίτωμα, στο εξαιρετικά συντηρήσιμο μέλι, αποτελεί βασικό μηχανισμό προσαρμογής, ο οποίος διασφαλίζει την επιβίωση τους (White, 1993).

Άλλα προϊόντα που παράγουν οι μέλισσες και παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον είναι η γύρη, η πρόπολη, το κερι και ο βασιλικός πολτός. Αυτά χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο στη φαρμακοβιομηχανία, στη βιομηχανία καλλυντικών και στη διατροφή του ανθρώπου.

1.3 Κατηγορίες μελιού

Σύμφωνα με την Οδηγία 2001/110EC της Ευρωπαϊκής Ένωσης αλλά και τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, Άρθρο 67, το μέλι διαχωρίζεται:

1.3.1 Ανάλογα με τον τρόπο παραγωγής ή και εκμετάλλευσης

1. Μέλι στραγγισμένο: το μέλι που λαμβάνεται με στράγγιση των αποσφραγισμένων κηρηθρών που δεν περιέχουν γόνο.
2. Μέλι φυγοκεντρήσεως: το μέλι που λαμβάνεται με φυγοκέντρηση των αποσφραγισμένων κηρηθρών που δεν περιέχουν γόνο.
3. Μέλι πίεσεως: το μέλι που λαμβάνεται με πίεση των κηρηθρών που δεν περιέχουν γόνο, χωρίς θέρμανση ή με ήπια θέρμανση έως 45°C.
4. Μέλι κηρήθρας: το μέλι το οποίο έχουν εναποθέσει οι μέλισσες στα επικαλυμμένα κελιά κηρηθρών κατασκευασμένων πρόσφατα από τις ίδιες ή σε λεπτά φύλλα κηρήθρας τα οποία γίνονται μόνον από κηρό μέλισσας, που δεν περιέχουν γόνο, και πωλείται σε κηρήθρες ολόκληρες ή κομμάτια κηρήθρων.
5. Μέλι με τεμάχια κηρήθρας ή τεμάχια κηρήθρας με μέλι: το μέλι που περιέχει ένα ή περισσότερα τεμάχια μελιού κηρήθρας.
6. Διηθημένο μέλι: το μέλι που λαμβάνεται με την αφαίρεση ξένων ανόργανων ή οργανικών ουσιών κατά τρόπον ώστε να αφαιρείται σημαντικό μέρος της γύρης.

7. Μέλι ζαχαροπλαστικής: Το μέλι το οποίο α) είναι κατάλληλο για βιομηχανικές χρήσεις ή ως συστατικό σε άλλα τρόφιμα που στη συνέχεια υφίστανται μεταποίηση και β) μπορεί: να παρουσιάζει ασυνήθιστη γεύση ή οσμή, ή να έχει αρχίσει να υφίσταται ή να έχει υποστεί ζύμωση, ή να έχει υπερθερμανθεί.

1.3.2 Ανάλογα με τη φυτική προέλευσή του

το ελληνικό μέλι διακρίνεται σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

1. **ανθόμελο ή μέλι νέκταρος**, που παράγεται από το νέκταρ των λουλουδιών, π.χ. πορτοκαλιάς, βαμβακιού, ηλίανθου, ερείκης, καστανιάς και
2. **μέλι από μελιτώματα**¹ (συχνά λέγεται και «δασόμελο»), που παράγεται από εκκρίματα των φυτών ή εντόμων που απομυζούν τα φυτά. Στην κατηγορία αυτή ανήκει το μέλι του πεύκου, της ελάτης και άλλων δασικών φυτών.

¹ Ως μελίτωμα ορίζεται ο σακχαρούχος χυμός που παράγεται από έντομα με στοματικά μόρια προσαρμοσμένα στη μύζηση και εισροή ρευστών τροφών. Οι τροφές αυτές προσλαμβάνονται κατ' ευθείαν από τα αγωγία στοιχεία του φυτού ξενιστή. Ο φυτικός χυμός εισέρχεται στο σώμα του εντόμου κατά κύριο λόγο παθητικά, εξ αιτίας της πίεσης που επικρατεί στο φυτό, είτε ενεργητικά σαν αποτέλεσμα απομύζησης. Στο πεπτικό σύστημα του εντόμου ο χυμός αναμιγνύεται με πεπτικά υγρά, πλούσια σε ένζυμα και μετά τη λειτουργία της πέψης, η ποσότητα που πλεονάζει αποβάλλεται από τα απεκκριτικά όργανα των εντόμων, με τη μορφή μικρών διάφανων σταγόνων, του μελιτώματος, τις οποίες συλλέγουν οι μέλισσες και μετατρέπουν σε μέλι.

1.3.3 Είδη μελιού στην Ελλάδα

Κύριες κατηγορίες αμιγών² μελιών που παράγονται στη Ελλάδα και έχουν ταυτοποιηθεί³ είναι οι εξής:

Μέλι από:

1. Πεύκο - μέλι από μελιτώματα



Εικόνα 1-2: Πεύκο (*Pinus halepensis*)

Το πευκόμελο προέρχεται από τις μελιτώδεις εκκρίσεις του εντόμου *Marchalina hellenica* (γνωστό ως «Βαμβακάδα» ή «Εργάτης»), όταν παρασιτεί στη Χαλέπιο (*Pinus halepensis*) και Τραχεία πεύκη (*Pinus brutia*). Θεωρείται μέλι υψηλής θρεπτικής αξίας, λόγω του υψηλού ποσοστού τέφρας που διαθέτει. Η υψηλή διατροφική αξία, κατά κύριο λόγο οφείλεται στο πλήθος των διαφορετικών ουσιών που έχει στη σύστασή του. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις συναντώνται μέταλλα και ιχνοστοιχεία όπως ασβέστιο, μαγνήσιο, ψευδάργυρος, σίδηρος, χαλκός κ.α. Δεν είναι πάρα πολύ γλυκό στη γεύση, λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα και δεν κρυσταλλώνει για περισσότερο από ενάμιση χρόνο. Επίσης είναι το μέλι με το

² Ως αμιγές ορίζεται το μέλι εκείνο που με βάση τα χαρακτηριστικά του κατατάσσεται σε μια κατηγορία μελιού συγκεκριμένης φυτικής προέλευσης. (Θρασυβούλου Α. και συν, 2002 1^ο Επιστημονικό Συνέδριο Μελισσοκομίας – Σηροτροφίας Αθήνα, 29 Νοεμβρίου – 1 Δεκεμβρίου 2002).

³ Με τον όρο ταυτότητα εννοούμε το σύνολο των φυσικοχημικών, οργανοληπτικών και μικροσκοπικών χαρακτηριστικών που ορίζουν μια συγκεκριμένη κατηγορία αμιγούς μελιού. (Θρασυβούλου Α. και συν, 2002 1^ο Επιστημονικό Συνέδριο Μελισσοκομίας – Σηροτροφίας Αθήνα, 29 Νοεμβρίου – 1 Δεκεμβρίου 2002)

μικρότερο θερμιδικό φορτίο (Γούναρη, 2013) (Anthimidou and Mossialos, 2013). Το χρώμα του είναι χαρακτηριστικό και πιο σκούρο από το θυμαρίσιο. Το πευκόμελο που παράγεται την άνοιξη είναι πιο ανοιχτόχρωμο και πιο διαυγές από εκείνο που παράγεται το φθινόπωρο. Έχει ιδιαίτερο άρωμα, το οποίο παρομοιάζεται με το άρωμα ιωδίου. Οι μελιτοεκκρίσεις ξεκινούν από τα μέσα Αυγούστου και διαρκούν έως την επόμενη άνοιξη. Βέβαια οι αξιοποιήσιμες για την παραγωγή του εκκρίσεις είναι από τον Αύγουστο μέχρι τον Οκτώβριο. Στην Ελλάδα κατέχει περίπου το 65% της συνολικής παραγωγής μελιού και οι κυριότερες περιοχές παραγωγής του είναι η βόρεια Εύβοια, η Χαλκιδική, η Θάσος, η Σκόπελος, η Ζάκυνθος και η Ρόδος (Θρασυβούλου και συν., 2002· Μπίκος Θ., 1991).

2. Ελάτη - μέλι από μελιτώματα



Εικόνα 1-3: Ελάτη (*Abies* sp)

Το μέλι από ελάτη προέρχεται από τις μελιτώδεις εκκρίσεις εντόμων, όπως τα *Cinara confinis* και *Physokermes hemicryfus*, που παρασιτούν στα έλατα. Είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία και περιέχει μικρή ποσότητα βιταμινών, αυτή η ποσότητα όμως βοηθάει στην καλύτερη αφομοίωση των σακχάρων από τον ανθρώπινο οργανισμό. Όπως και το πευκόμελο, έτσι και το μέλι ελάτης δεν κρυσταλλώνει λόγω χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζης. Έχει έντονα μελί χρώματα και γενικά το χρώμα διαφέρει ανάλογα με την περιοχή προέλευσής του. Το άρωμα είναι ασθενές. Χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου είδους μελιού είναι η ιδιαίτερα καλή του γεύση. Η μεγαλύτερη

παραγωγή παρατηρείται τον Μάιο – Ιούνιο. Στην Ελλάδα το μέλι ελάτης αποτελεί το 5% του παραγόμενου μελιού και προέρχεται κυρίως από τις ορεινές περιοχές της Ευρυτανίας, της Πίνδου, του Ολύμπου, της Βοιωτίας από τα βουνά Μαίναλο, Πάρνωνα, Ελικώνα και Χελμό στην Πελοπόννησο και από την Πάρνηθα στην Αττική (<http://melissokomianet.gr/meli-elatou/> , http://www.honey-center.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=64&Itemid=59&lang=). Αξίζει να σημειωθεί ότι μέλι Ελάτης Μαινάλου-Βανίλιας, αναγνωρίστηκε ως Π.Ο.Π. (Απόφαση 313049 ΦΕΚ/Β 16.1.1994) με χημικά χαρακτηριστικά εκείνα του μελιού ελάτης και με επιπλέον χαρακτηριστικό την υγρασία (14%-15,5%) και τη φαινόμενη σακχαρόζη (8%-18%).

3. Καστανιά - μελίτωμα και άνθη



Εικόνα 1-4: Καστανιά (*Castanea sativa*)

Η καστανιά θεωρείται σπουδαίο μελισσοκομικό φυτό λόγω της εξαιρετικής ποιότητας γύρης που δίνει και το νέκταρ υψηλής διατροφικής αξίας που παράγει. Όμως το μέλι καστανιάς προέρχεται και από μελιτώδεις εκκρίσεις της αφίδας *Myzocallis castaniocola*, που λαμβάνουν χώρα Μάιο με Ιούλιο. Είναι μέλι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία και αμινοξέα και συμβάλλει στην καλή κυκλοφορία του αίματος. Επίσης διαθέτει στυπτικές και απολυμαντικές ιδιότητες των ουρικών οδών. Κρυσταλλώνει σε λεπτούς κόκκους και αργά (1-2 χρόνια). Το χρώμα του διαφοροποιείται ανάλογα με την προέλευσή του, από ανοιχτό μέχρι σκούρο καφέ και αν πρόκειται για

μελίτωμα εμφανίζει συχνά κοκκινωπό χρωματισμό. Θεωρείται έντονα αρωματικό μέλι ενώ η γεύση του είναι δυνατή και ελαφρώς πικρή. Στην Ελλάδα κυρίως παράγεται στη χερσόνησο του Αγίου Όρους (<http://melissokomianet.gr/meli-kastanias/> , http://www.honey-center.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=64&Itemid=59&lang=).

4. Πορτοκαλιά (και εσπεριδοειδών με έντονο άρωμα) – μέλι ανθέων



Εικόνα 1-5: Πορτοκαλιά (*Citrus X sinensis*)

Το μέλι εσπεριδοειδών έχει την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ψευδάργυρο συγκριτικά με τα υπόλοιπα μέλια. Επειδή η θρεπτική του αξία χάνεται με την πάροδο του χρόνου, συνίσταται η κατανάλωσή του να γίνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό που ενισχύει την άμεση κατανάλωσή του είναι η γρήγορη κρυστάλλωση που υφίσταται. Το χρώμα του είναι ανοιχτό κίτρινο και χαρακτηρίζεται από έντονο ευχάριστο άρωμα και ιδιαίτερη γεύση. Στην Ελλάδα το μέλι εσπεριδοειδών σε συνδυασμό με το μέλι άλλων οπωροφόρων αποτελεί το 25% της συνολικής παραγωγής μελιού (http://www.honey-center.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=64&Itemid=59&lang=).

5. Θυμαρί – μέλι ανθέων



Εικόνα 1-6: Θυμαρί (Thymus sp)

Το θυμαρίσιο μέλι αναφέρεται ως τονωτικό μέλι και έχει αντισηπτικές ιδιότητες, επίσης αυξάνει την ενεργητικότητα και τις φυσικές δυνάμεις του ανθρώπου. Είναι πλούσιο σε μέταλλα (όπως χαλκός και σίδηρος) και κρυσταλλώνει σε διάστημα 6-18 μηνών. Έχει χαρακτηριστικό ανοιχτό κεχριμπαρένιο χρώμα και είναι έντονα αρωματικό. Ενώ έχει ευχάριστη γεύση, κάποιες φορές αφήνει αίσθηση καψίματος στο στόμα λόγω μεγάλης περιεκτικότητας σε φρουκτόζη. Στην Ελλάδα η παραγωγή του καταλαμβάνει περίπου το 10% της συνολικής παραγωγής μελιού και οι κύριες περιοχές παραγωγής του είναι τα ελληνικά νησιά (Κρήτη, Κύθηρα και Δωδεκάνησα) (http://www.honey-center.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=64&Itemid=59&lang=).

6. Ερείκη ή σούσουρα – μέλι ανθέων και μέλι από μελιτώματα



Εικόνα 1-7: Ερείκη (*Erica multipolyflora*)

Το μέλι ερείκης διακρίνεται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την εποχή παραγωγής του: φθινόπωρο και άνοιξη, η διαφορά των δύο έγκειται στη γεύση και το χρώμα. Θεωρείται μέλι υψηλής διατροφικής αξίας και είναι ιδιαίτερα τονωτικό για τον ανθρώπινο οργανισμό διότι είναι πλούσιο σε φυσικά θρεπτικά στοιχεία, βιταμίνες, ένζυμα και αμινοξέα. Βέβαια είναι λιγότερο πλούσιο σε ιχνοστοιχεία σε σχέση με τα μέλια καστανιάς ή βελανιδιάς. Κρυσταλλώνει μέσα σε 1-3 μήνες λόγω της υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης που έχει και είναι το μέλι που ξινίζει πιο εύκολα από όλα τα υπόλοιπα είδη, διότι έχει υψηλή υγρασία και μεγάλη περιεκτικότητα σε σακχαρομύκητες. Για τους παραπάνω λόγους συνίσταται η άμεση κατανάλωσή του. Το χρώμα της φθινοπωρινής παραγωγής είναι κοκκινωπό – σκουρόχρωμο και γίνεται πιο ανοιχτόχρωμο κατά την ανοιξιάτικη παραγωγή. Έχει χαρακτηριστικό λεπτό άρωμα και δυνατή γεύση (Anthimidou and Mossialos, 2013' http://www.honey-center.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=64&Itemid=59&lang=).

7. Βαμβάκι – μέλι ανθέων



Εικόνα 1-8: Βαμβάκι (Gossypium)

Το μέλι βαμβακιού έχει έντονη βακτηριοστατική δράση, καθώς έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου. Είναι μέλι που κρυσταλλώνει γρήγορα και το χρώμα του είναι αρκετά άσπρο, σημαντικός λόγος για τον οποίο δεν προτιμάται από το καταναλωτικό κοινό. Έχει διακριτικό άρωμα και απαλή γεύση. Αποτελεί το 10% της συνολικής ελληνικής παραγωγής και είναι μία από τις αμιγείς κατηγορίες μελιού που παράγει η Θεσσαλία (http://www.honey-center.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=64&Itemid=59&lang=).

8. Ηλίανθος – μέλι ανθέων



Εικόνα 1-9: Ηλίανθος (Helianthus annuus)

Το μέλι του ηλίανθου είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες. Πρόκειται για μέλι που κρυσταλλώνει μέσα σε ένα μήνα σχηματίζοντας λεπτούς κρυστάλλους. Είναι ανοιχτόχρωμο, και έχει λεπτό άρωμα και απαλή γεύση. Στην κρυσταλλική του μορφή είναι κιτρινωπό. Ο ηλίανθος καλλιεργείται σε μεγάλες εκτάσεις, κυρίως στη Β. Ελλάδα, και δίνει πλούσια παραγωγή μελιού (http://www.honey-center.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=64&Itemid=59&lang=).

Δύο ακόμη είδη μελιού που συναντώνται στην Ελλάδα είναι το μέλι από:

9. Πολύκομπο – μέλι ανθέων



Εικόνα 1-10: Πολύκομπο (Polygonum spp)

Θεωρείται μέλι υψηλής θρεπτικής αξίας. Είναι από τα πιο πλούσια σε ένζυμα μέλια και περιέχει υψηλά ποσοστά μεταλλικών στοιχείων. Είναι σκοτεινόχρωμο μέλι με χαρακτηριστική οσμή. Η γεύση του δεν αρέσει ιδιαίτερα γι' αυτό και δεν συναντάται ως αμιγές μέλι στην ελληνική αγορά. Αντιθέτως προσφέρεται για ανάμιξη μ' άλλα είδη μελιού (<http://melissokomianet.gr/polykompos-polygonum/>).

Και το μέλι από:

10. Κουμαριά – μέλι ανθέων



Εικόνα 1-11: Κουμαριά (*Arbutus unedo*)

Πρόκειται για ένα πολύ θρεπτικό μέλι. Το μέλι της κουμαριάς είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία και βιταμίνες, κάνει καλό στον άνθρωπο και μάλιστα έχει βρεθεί ότι είναι διουρητικό και κατεβάζει την πίεση. Χαρακτηρίζεται από υψηλά ποσοστά υγρασίας και μεγάλη φυσική περιεκτικότητα σε ζύμες. Τα δύο αυτά χαρακτηριστικά του προσδίδουν μια ξινή (ή κατά άλλους, πικρή) γεύση. Έχει ευχάριστο άρωμα και πολύ σκούρο, σχεδόν μαύρο χρώμα (Anthimidou and Mossialos, 2013' <http://melissokomianet.gr/koumaria-albutus-unedo/>).

1.4 Μέλι Mānuka



Εικόνα 1-12: Manuka φυτό

Το μέλι Mānuka προέρχεται από το νέκταρ του φυτού *Leptospermum scoparium*, το οποίο είναι γηγενές της Νέας Ζηλανδίας και της νοτιοανατολικής Αυστραλίας (https://en.wikipedia.org/wiki/M%C4%81nuka_honey). Έχει χαρακτηριστική γεύση, χρώμα και συνοχή, και κατά συνέπεια, ένα μοναδικό σύνολο φυσικών χαρακτηριστικών, σαφώς διαφορετικών από άλλους τύπους μελιού που συγκομίζονται στη Νέα Ζηλανδία. Το χρώμα περιγράφεται ως σκοτεινό κρέμ έως σκούρο καφέ, το άρωμα ως «αρωματική υγρή γη», ενώ έχει ελαφρώς πικρή γεύση ορυκτού (Jonathan McD C Stephens, 2006). Το μέλι αυτού του τύπου, πρέπει να περιέχει ένα ποσοστό mānuka. Δηλαδή, μπορεί να είναι πολυανθικό (άρα να περιλαμβάνει και άλλους τύπους μελιού) καθώς και μονοανθικό (άρα να μην περιλαμβάνει άλλους τύπους μελιού). Ένα μέλι τύπου mānuka της Νέας Ζηλανδίας πρέπει:

- α) να προέρχεται από γνωστές περιοχές παραγωγής mānuka εντός της Νέας Ζηλανδίας και σε μια εποχή που συμπίπτει με την άνθηση mānuka και
- β) να προέρχεται από το νέκταρ του φυτικού είδους *Leptospermum scoparium* (Ministry for Primary Industries New Zealand, 2014).

Το μέλι mānuka, χρησιμοποιείται πλέον στην ιατρική λόγω της έντονης αντιμικροβιακής δράσης του. Μετά από έρευνες που διεξήχθησαν στο συγκεκριμένο

μέλι, παρατηρήθηκε ότι παρουσιάζει έντονη μη υπεροξειδική αντιβακτηριακή δράση. Η δράση αυτή ονομάστηκε UMF® (Unique Mānuka Factor) και είναι μετρήσιμη. Το μέλι mānuka με υψηλότερη τιμή UMF® έχει μεγαλύτερη αντιβακτηριακή δράση και συνεπώς είναι πιο επιθυμητό για την παραγωγή θεραπευτικών προϊόντων. (Jonathan McD C Stephens, 2006). Οι έρευνες έδειξαν ότι η δραστική ουσία του μελιού mānuka είναι η μεθυλγλυοξάλη (MGO), ουσία που ανιχνεύτηκε σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις σύμφωνα με τους Adams et al., 2008.

1.5 Μέλια Ολύμπου

Τα μέλια Ολύμπου είναι κυρίως πολυανθικά μέλια, τα οποία παράγονται από τα φυτά που υπάρχουν στις δασικές και λιβαδικές περιοχές του Ολύμπου. Ανάλογα βέβαια με την εποχή του τρύγου, μπορεί να υπάρξει και μίξη μελιού ανθέων και μελιτώματος, αφού ως γνωστό ο Όλυμπος φημίζεται για τη μεγάλη ποικιλία φυτών και δέντρων που ευδοκούν στην ευρύτερη περιοχή.

Τα βασικότερα φυτά από τα οποία αποτελούνται τα μέλια Ολύμπου είναι:

- το αρκουδοπούρναρο (ή ίληξ),
- το αγριοτρίφυλλο,
- η καβαλαριά (ή αγριόβικος),
- η ακακία,
- το έλατο,
- τα αγριόβατα (ή βατομουριές),
- το γαλαζάκι (ή βερόνικα),
- η βελανιδιά,
- η καστανιά,
- η λαδανιά,
- διάφορα είδη αγκαθιών (όπως γαϊδουράγκαθο), τα
- το τσάι και
- το ζαρμπούνι

(<https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%8C%CE%BB%CF%85%CE%BC%CF%80%CE%BF%CF%82#%CE%A7%CE>

<https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%8C%CE%BB%CF%85%CE%BC%CF%80%CE%BF%CF%82#%CE%A7%CE%BB%CF%89%CF%81%CE%AF%CE%B4%CE%B1%BB%CF%89%CF%81%CE%AF%CE%B4%CE%B1>).

1.6 Θρεπτικά συστατικά και σύσταση του μελιού

Ο κος Μπίκος, αναφέρει στο βιβλίο του «Όλα για το μέλι», 1991: «Το μέλι δεν είναι απλώς μια “χημική αποθήκη” κάποιων στοιχείων χρήσιμων για την επιβίωση, αλλά κυρίως μια αρμονική συνεύρεση των στοιχείων αυτών, που του προσθέτουν μοναδικές ιδιότητες.

Ουσιαστικά, το μέλι είναι ένα πυκνό, υπέρκορο υδατικό διάλυμα απλών και σύνθετων ζαχάρων. Το βασικό συστατικό του δηλαδή, είναι τα σάκχαρα και κυρίως η φρουκτόζη και η γλυκόζη, αλλά και πλήθος άλλων συστατικών όπως είναι το νερό, κάποια οργανικά οξέα, διάφορες πρωτεΐνες, μέταλλα και ιχνοστοιχεία. Στο μέλι έχουν ανιχνευτεί και πιστοποιηθεί πάνω από 182 διαφορετικές ουσίες (Winston 1987· Μπίκος 1991).

Η σύνθεση του μελιού εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως: είδη φυτών απ’ όπου συλλέγουν οι μέλισσες, φύση του εδάφους, ράτσα μελισσών, φυσιολογική κατάσταση μελισσιού κτλ και ποικίλλει από είδος σε είδος. Κατά μέσο όρο, το μέλι περιέχει:

Κύρια συστατικά
<ul style="list-style-type: none"> ○ Νερό: 17% ○ Γλυκόζη: 31% ○ Φρουκτόζη: 38% ○ Μαλτόζη: 7,5% ○ Σακχαρόζη: 1,5%
Δευτερεύοντα συστατικά
<ul style="list-style-type: none"> ○ Άλλα Σάκχαρα ○ Οξέα ○ Ένζυμα ○ Βιταμίνες ○ Inhibine⁴ και άλλους αντιβιοτικούς παράγοντες που προέρχονται από τα φυτά ή από τις μέλισσες

(Pierre Jean-Prost, 1979)

Αναλυτικότερα τα συστατικά του είναι τα εξής:

- **Νερό** 16% – 17% (φυσική υγρασία). Η φυσική υγρασία του μελιού είναι αυτή που παραμένει μετά την ωρίμανση του νέκταρος. Η περιεκτικότητα του μελιού σε υγρασία εξαρτάται από την ωρίμανση του μελιού, την αρχική υγρασία του νέκταρος, το ρυθμό έκκρισης του νέκταρος και από τη δύναμη του μελισσιού.
- **Σάκχαρα** περίπου 83%. Οι μονοσακχαρίτες είναι τα απλούστερα σάκχαρα και τα κυριότερα είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Τα δύο αυτά σάκχαρα έχουν περίπου ίση ποσότητα στο μέλι με τη φρουκτόζη να καταλαμβάνει την πρώτη θέση (σε περιεκτικότητα). Υπάρχουν πολλοί δισακχαρίτες όπως η σουκρόζη, η λακτόζη και η μαλτόζη και άλλα σάκχαρα όπως οι ολιγοσακχαρίτες ή ανώτερα σάκχαρα που περιέχουν τρία ή περισσότερα απλά σάκχαρα στο

⁴ Το H₂O₂ για πολλά χρόνια θεωρείτο ως ο κύριος ανασταλτικός παράγοντας του μελιού στην ανάπτυξη των βακτηρίων. Παράγοντας που είχαν ονομάσει “inhibine” (Θρασυβούλου Α., 2002).

μόριό τους. Πολλά από τα σάκχαρα δεν ανευρίσκονται στο νέκταρ, αλλά σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης και αποθήκευσής του με τις επιδράσεις των ενζύμων της μέλισσας και των οξέων του μελιού

- **Οξέα.** Το κυριότερο είναι το γλυκονικό οξύ που βρίσκεται σε όλα τα μέλια και προέρχεται από τη δραστηριότητα της οξειδάσης της γλυκόζης που προσθέτουν οι μέλισσες κατά την ωρίμανσή του μελιού. Άλλα οξέα είναι το οξικό, το βουτυρικό, το κιτρικό, το μυρμηκικό, το γαλακτικό, το μηλεϊκό, το μηλικό, το οξαλικό, το πυροβουτανικό, το πυρουβικό κ.α. Το μέλι περιέχει περίπου 20 οργανικά οξέα.
- **Ένζυμα.** Βρέθηκε ότι το μέλι περιέχει ιμπερτάση, διαστάση, καταλάση, φωσφατάση, περοξειδάση κλπ. Δεν βρέθηκαν πρωτεαλυτικά ή λιπολυτικά ένζυμα.
- **Πρωτεΐνες και αμινοξέα.** Υπάρχουν μικρές ποσότητες πρωτεϊνών στο μέλι επιπρόσθετα από τις πρωτεΐνες των ενζύμων που βρίσκονται σ' αυτό. Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα μπορούν να προέλθουν από το νέκταρ ή τη γύρη, αλλά και από το σώμα των μελισσών. Η προλίνη είναι το κυριότερο αμινοξύ του μελιού. Επίσης, το μέλι διαθέτει περίπου 20 πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης σε μικρές ποσότητες, με κυριότερη την αλβουμίνη.
- **Μέταλλα** όπως κάλιο, ασβέστιο, χλώριο, νάτριο, που συμμετέχουν στην λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών.
- **Ιχνοστοιχεία** όπως σίδηρος, μαγγάνιο, χαλκός, μαγνήσιο και ίχνη ιωδίου, κ.α.
- **Βιταμίνες** όπως νιασίνη (B3), θειαμίνη (B1), ασκορβικό οξύ (C), ριβοφλαβίνη (B2), παντοθενικό οξύ (B5) και πυριδοξίνη (B6).

(Χαριζάνης Π., 1993)

Πίνακας 1-1: Μέση σύσταση του ελληνικού μελιού, με βάση 144 δείγματα από μέλια ανθέων και 30 μελιτωμάτων (Thrasynoulou and Manikis, 1995).

Συστατικό	Μέλι ανθέων*		Μέλι μελιτώματος**	
	Μέση τιμή	Διακύμανση	Μέση τιμή	Διακύμανση
Υγρασία (%)	17,2	14,9-23,0	15,9	13,0-18,9
Φρουκτόζη (%)	38,52	28,0-46,1	28,35	22,2-33,9
Γλυκόζη (%)	31,98	23,4-39,2	22,5	13,4-31,9
Σουκρόζη (%)	3,29	0,0-7,0	3,68	0,01-12,0
Μαλτόζη (%)	-	-	6,24	0,5-11,2
pH	4,0	3,3-5,4	4,9	4,5-5,9
Αγωγιμότητα (mS/cm)	0,64	0,15-2,06	1,33	1,01-1,69
Τέφρα (%)	0,32	0,1-1,2	0,75	0,4-1,1
HMF (mg/Kg)	5,1	0,0-11,9	2,4	0,0-8,2
Διαστάση (DU)	22,92	8,6-51,0	23,45	10,4-37,2
Προλίνη (mg/Kg)	550	264-1205	452	290-673

Η διαιτητική αξία του μελιού είναι σημαντική και οφείλεται στα συστατικά του και κυρίως στη συνύπαρξη όλων αυτών των συστατικών. Δίνει άμεση ενέργεια στον άνθρωπο λόγω της μεγάλης περιεκτικότητάς του σε σάκχαρα (1 κουταλιά της σούπας μέλι αποδίδει 64 Kcal). Το γεγονός ότι αποτελείται κυρίως από απλά σάκχαρα δίνει τη δυνατότητα στον ανθρώπινο οργανισμό να τα απορροφήσει άμεσα. Σε αντίθεση με τη ζάχαρη, το μέλι είναι ένα ανεπεξέργαστο προϊόν που δεν επιδέχεται επεξεργασία και περιέχει διάφορα μέταλλα, ένζυμα, αμινοξέα κ.α. Η καθημερινή χρήση του δίνει ευεξία στον οργανισμό. Επίσης, η γλυκόζη για να αξιοποιηθεί σωστά από τον ανθρώπινο οργανισμό χρειάζεται να ενωθεί με φωσφόρο και το μέλι έχει στη σύστασή του φωσφορικά άλατα (Θρασυβούλου Α., 2005).

1.7 Θεραπευτικές ιδιότητες και ευεργετικές δράσεις

Το 1979 ο Pierre Jean-Prost, καθηγητής γεωπόνος – μηχανικός αγρονομίας, στο βιβλίο του «Μελισσοκομία», χαρακτήρισε το μέλι ως φυσικό τρόφιμο και φάρμακο. Έγραψε χαρακτηριστικά ότι: Είναι φυσικό τρόφιμο γιατί βρίσκεται στη φύση, μεταβάλλεται λίγο και ικανοποιεί τις ενεργητικές ανάγκες του οργανισμού μας χάρη στα σάκχαρα που περιέχει. Είναι φάρμακο, γιατί έχει προληπτικές ή θεραπευτικές ιδιότητες για τις ανθρώπινες ασθένειες, όπως και των ζώων, και γιατί μπορεί να διορθώσει και να μεταβάλει τις οργανικές λειτουργίες. Βέβαια, σύμφωνα με τις αγρονομικές διατάξεις το μέλι είναι τρόφιμο και όχι φάρμακο όπως διατύπωσε ο Χαριζάνης Π. το 1993.

Τα απλά και σύνθετα σάκχαρα του μελιού, τα μεταλλικά στοιχεία, τα λιπαρά και ανόργανα οξέα, τα αμινοξέα, οι αρωματικές ουσίες, τα αντιβιοτικά, οι βιταμίνες, τα ένζυμα και τα άλλα συστατικά που συνυπάρχουν στο μέλι και η οργανική τους διασύνδεση του προσδίδουν μοναδικές ιδιότητες (Θρασυβούλου Α. 2005).

Οι αδιαφιλονίκητες ιατρικές ιδιότητες του μελιού προέρχονται κατά κύριο λόγο από τα δευτερεύοντα συστατικά του. Τα μέλια με σκούρο χρώμα έχουν μεγαλύτερη ιατρική αξία από τα λευκά μέλια (Pierre Jean-Prost, 1979) όπως για παράδειγμα το πευκόμελο, που είναι πλούσιο σε μεταλλικά ιχνοστοιχεία (Δερματόπουλος Β., 1977).

Το μέλι έχει χρησιμοποιηθεί στην παραδοσιακή ιατρική ως δυναμωτικό και καταπραϋντικό, σε περιπτώσεις κόπωσης, ανορεξίας, αδιαθεσίας και δυσκοιλιότητας, για την αντιμετώπιση των κοινών κρυολογημάτων, την επούλωση πληγών του δέρματος και άλλων παθήσεων του ανθρώπινου οργανισμού (Θρασυβούλου Α., 2005).

Αναφέρονται ορισμένες παθήσεις στις οποίες το μέλι λειτουργεί είτε ως θεραπευτικός παράγοντας, είτε ως προληπτικό μέσο.

Αναπνευστικά προβλήματα και αλλεργίες: το μέλι έχει αντιβηχικές, αποχρεμπτικές και καταπραϊντικές ιδιότητες που καταπολεμούν ρινίτιδες, ιγμορίτιδες και κόρυζες (=οξύς κατάρρους των ρινικών βλεννογόνων) (Clement H., 2007). Η συχνή κατανάλωσή του, βοηθά στην αντιμετώπιση προβλημάτων που προέρχονται από την αιώρουμένη στο περιβάλλον γύρη. Αυτό οφείλεται στη μικρή ποσότητα γύρης που περιέχει και βοηθά τον οργανισμό να αποκτήσει ανοσία (Θρασυβούλου Α. 2005).

Πεπτικές παθήσεις: εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς του σε φρουκτόζη, το μέλι έχει μια ήπια καθαρτική ιδιότητα. Συνίσταται σε περιπτώσεις απώλειας της όρεξης, σε διαταραχές αφομοίωσης ή σε πεπτικές ανεπάρκειες, κυρίως ενζυματικές. Χρησιμοποιείται για την προστατευτική δράση του στα τοιχώματα του στομάχου, και στη θεραπεία γαστρο-δωδεκαδακτυλικών ελκών (συγκεκριμένα το μέλι manuka), σε εντερικές λοιμώξεις και σε κάθε είδους ηπατικές ανεπάρκειες, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων του αλκοολισμού(Clement H., 2007).

Καρδιο-αγγειακές παθήσεις: χάρη στη γλυκουτίλη, ουσία που υπάρχει στο μέλι, ο καρδιακός μυς χρησιμοποιεί όσο καλύτερα γίνεται τα σάκχαρα που δέχεται. Τα γλυκίδια αυτά είναι άμεσα αφομοιώσιμα, είναι ένα ιδανικό καύσιμο για τον αθλούμενο πριν από μια έντονη και παρατεταμένη προσπάθεια. Η ακετυλοχολίνη που περιέχεται στο μέλι επιτρέπει να βραδύνει και να ισορροπήσει ο καρδιακός ρυθμός, γεγονός που ευνοεί τη μείωση της αρτηριακής πίεσης και εξασφαλίζει καλύτερη κυκλοφορία του αίματος στις στεφανιαίες αρτηρίες(Clement H., 2007). Επίσης, το μέλι λειτουργεί αποτρεπτικά στην αρτηριοσκλήρυνση. Τα αγγεία στην αρτηριοσκλήρυνση σκληρύνονται λόγω της καθίζησης των συμπλόκων πρωτεϊνών με σάκχαρο μέσω του μηχανισμού της γλυκοζυλίωσης. Όταν η πηγή σακχάρου είναι το μέλι, τότε παρεμποδίζεται ο μηχανισμός της γλυκοζυλίωσης (Θρασυβούλου Α. 2005).

Οφθαλμικές παθήσεις: το μέλι μπορεί να ανακουφίσει την επιπεφυκίτιδα, την κερατίτιδα, τη βλεφαρίτιδα, τις ασθένειες του αμφιβληστροειδούς. Στις ειδικές αυτές περιπτώσεις, το κολλύριο μελιού μειώνει την ξηρότητα των ματιών, το δάκρυσμα, τη δυσάρεστη αίσθηση «κόκκου άμμου», τη φωτοφοβία και το οίδημα των βλεφάρων (Clement H., 2007).

Ασθένειες των παιδιών: το μέλι δίνει αρκετές θερμίδες, ανοίγει την όρεξη, έχει αναστονωτικές και ενεργητικές ιδιότητες και επιτρέπει στο παιδί να αντιμετωπίσει μια σειρά από ασθένειες όπως ιγμορίτιδες, φαρυγγίτιδες, ρινίτιδες, λαρυγγίτιδες,

ωτίτιδες, απλές ή ασθματικές βροχίτιδες και διάφορους βήχες (ξηρούς ή μη). Ορισμένα μέλια βοηθούν στην καταπολέμηση της αναιμίας διότι είναι πλούσια σε σίδηρο, που με τη συμβολή των ενζύμων - που προέρχονται από την έκκριση σιέλου της μέλισσας - αφομοιώνεται. Το ίδιο ισχύει και με το κοβάλτιο, που βρίσκεται στη σύνθεση της βιταμίνης B12, που και αυτή είναι απαραίτητη για την παραγωγή των ερυθρών αιμοσφαιρίων από το μυελό των οστών (Clement H., 2007).

Αντικαρκινικές ιδιότητες: το μέλι περιέχει διάφορα συστατικά με αντικαρκινικές ιδιότητες, όπως τα καφεϊκά οξέα κ.α. Τα οξέα αυτά εμποδίζουν την ανάπτυξη σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων του εντέρου (Θρασυβούλου Α., 2005).

Επούλωση πληγών: ο Clement στο βιβλίο του «Σύγχρονη Μελισσοκομία» αναφέρει ότι γενικά το μέλι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να επουλωθούν εγκαύματα, χιονίστρες, σχισμές, ραγάδες και μολυσμένες πληγές. Εστιάζει στην επούλωση πληγών με μέλι και γράφει ότι μετά από πειράματα του καθηγητή Μπερνάρ Ντεκάρτ⁵ η θεραπεία με μέλι ήταν θεαματική. Η θεραπευτική δράση που ασκείται παράλληλα με τη θεραπευτική επιφέρουν μια θαυμάσια επούλωση. Επιπλέον, τα αποτελέσματα αυτής της «ήπιας ιατρικής» αποδεικνύονται πιο γρήγορα από εκείνα τις χημικής ιατρικής. Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές παρόμοιες έρευνες για την αντιμετώπιση χρόνιων και μολυσματικών πληγών, όπως η έρευνα του Dumronglert το 1983, του Hamdy το 1989 και του ιατρού Franco Feraboli⁶ (Θρασυβούλου Α., 2005).

⁵ Προϊστάμενος στο CHU της Λιμόζ.

⁶ Ιατρός στο νοσοκομείο της Cremona στο τμήμα Ορθοπαιδικής και Τραυματολογίας.

1.8 Αντιβακτηριακή και αντιοξειδωτική δράση μελιού

1.8.1 Αντιβακτηριακές ιδιότητες

Η αντιβακτηριακή συμπεριφορά ενός μελιού εξαρτάται από το είδος του και τη συγκέντρωσή του και μπορεί να είναι βακτηριοστατική⁷ ή βακτηριοκτόνος⁸ (Θρασυβούλου Α., 2005).

Οι αντιμικροβιακές ιδιότητές του οφείλονται στην υψηλή περιεκτικότητα σε ζάχαρη, το χαμηλό pH και την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου από το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης που προέρχεται από τις μέλισσες (Stephens et al., 2009). Εντούτοις, νεότερες μελέτες δείχνουν ότι η αντιμικροβιακή δράση οφείλεται κυρίως σε άλλους παράγοντες, όπως τα φυτοχημικά του συστατικά, δηλαδή φαινολικά οξέα, πτητικές ουσίες, φλαβονοειδή κ.α. (Θρασυβούλου Α., 2002). Άλλα σημαντικά μόρια που χαρίζουν στο μέλι αυτές τις ιδιότητες είναι η μεθυλογλυοξάλη (MGO) αλλά και η πρωτεΐνη bee defensin-1 (Kwakman et al., 2010 Kwakman and Zaat, 2012).

Ωστόσο, δεν είναι όλα τα μέλια ίδια και οι αντιμικροβιακές τους ιδιότητες ποικίλλουν ανάλογα με την πηγή της χλωρίδας, τη γεωγραφική τοποθεσία, τις καιρικές συνθήκες, την αποθήκευση (χρόνο και θερμοκρασία) και τις διάφορες επεξεργασίες (π.χ. θέρμανση). Αυτοί οι παράγοντες οδηγούν σε διαφορές στα επίπεδα των αντιβακτηριακών συστατικών.

Βασικές ουσίες και παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την αντιμικροβιακή δράση του μελιού:

1.8.1.1 Υψηλή συγκέντρωση σακχάρων

Το μέλι είναι ένα υπέρκορο υδατικό διάλυμα σακχάρων. Αυτό σημαίνει, ότι περιέχει σάκχαρα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από εκείνες που μπορούν κανονικά να ανευρισκονται μέσα στην υγρή φάση του. Η υψηλή αυτή περιεκτικότητα σε σάκχαρα

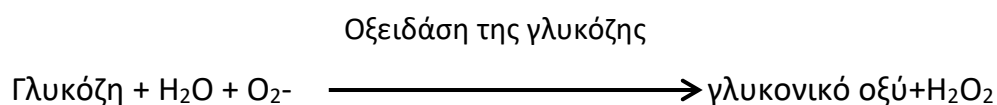
⁷ Καθυστερεί την ανάπτυξη βακτηρίων και καθώς αυξάνεται βαθμιαία η συγκέντρωσή του αναστέλλει την ανάπτυξή τους.

⁸ Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από αυτές που χρειάζονται για να αναπτυχθεί βακτηριοστατική δράση μπορεί να θανατώσει τα βακτήρια.

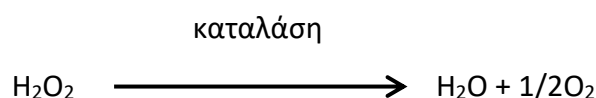
και η χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό, δημιουργεί ένα υψηλό ωσμωτικό δυναμικό με αποτέλεσμα να απορροφά το νερό και να αφυδατώνει τα βακτήρια (Molan PC, 1992).

1.8.1.2 Υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂).

Η οξειδάση της γλυκόζης, είναι ένα από τα ένζυμα που μεταβολίζουν τη γλυκόζη και προστίθεται στο νέκταρ από τις μέλισσες. Το συγκεκριμένο ένζυμο, σε αερόβιες συνθήκες, διασπά τη γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η λειτουργία του H₂O₂ είναι η πρόληψη της αλλοίωσης του «άγουρου» μελιού όταν η συγκέντρωση σακχάρων δεν έχει φθάσει ακόμα σε επίπεδα ικανά να αποτρέψουν την ανάπτυξη μικροβίων. Κατά την ωρίμανση του μελιού η οξειδάση της γλυκόζης αδρανοποιείται, αλλά ανακτά τη δραστηριότητά της όταν το μέλι αραιώνεται (Kwakman and Zaat, 2012 · Krell R., 1996). Στην ουσία το H₂O₂ λειτουργεί ως αντιμικροβιακός παράγοντας διότι έχει την ικανότητα να αναχαιτίζει την ανάπτυξη των βακτηρίων αλλά και να τα θανατώνει (Θρασυβούλου Α., 2002).



Ωστόσο, η παρουσία του ενζύμου καταλάση στο μέλι περιορίζει την ποσότητα του H₂O₂. Η καταλάση είναι το ένζυμο που επιταχύνει την αντίδραση διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Θρασυβούλου Α., 2005).



Πίνακας 1-2: Περιεκτικότητα του μελιού σε H₂O₂ (Γούναρη, 2004).

Είδος μελιού	H ₂ O ₂ σε µg/g μελιού
Βαμβακιού	292,0
Μελιτώματος	185,6
Καστανιάς	180,5
Ανθόμελο άνοιξης	97,0
Θυμαριού, Μέντας	57,5
Πορτοκαλιάς	4,3
Ανθόμελο φθινοπώρου	3,5
Ανθόμελο καλοκαιριού	1,0

1.8.1.3 Οξύτητα

Το μέλι είναι ελαφρώς όξινο (το pH του κυμαίνεται μεταξύ 3,2 και 4,5), λόγω ύπαρξης οργανικών οξέων. Οι χαμηλές τιμές pH μπορούν να επιβραδύνουν ή και να αναστείλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων. Βέβαια, σε περίπτωση που το μέλι αραιωθεί η οξύτητα μπορεί να μην είναι τόσο αποτελεσματική (Molan PC, 1992).

1.8.1.4 Μεθυλογλυοξάλη

Νέες μελέτες προσανατολίζονται στη μη υπεροξειδιακή αντιβακτηριακή δράση του μελιού. Ένα μη υπεροξειδιακό αντιμικροβιακό συστατικό που βρίσκεται σε αφθονία στο μέλι Μαпука⁹ είναι η μεθυλογλυοξάλη (MGO). Η MGO σχηματίζεται από σάκχαρα κατά τη διάρκεια θερμικής επεξεργασίας ή παρατεταμένης αποθήκευσης των τροφίμων ή ποτών που περιέχουν υδατάνθρακες. Εντούτοις, τα υψηλά επίπεδα της MGO στο μέλι Μαпука σχηματίζονται από τη μετατροπή της διύδροξυακετόνης (DHA) που υπάρχει σε εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις στο νέκταρ των λουλουδιών του είδους *L. scorarium*. Η μετατροπή της DHA είναι μη ενζυμική και γίνεται με βραδύ ρυθμό κατά τη διάρκεια αποθήκευσης του μελιού. Λόγω ισχυρής συσχέτισης των επιπέδων της MGO και της ικανότητας του μελιού να αναστέλλει την ανάπτυξη του

⁹ Από το νέκταρ του δέντρου μαпука (*Leptospermum scorarium*) - που είναι γηγενές στη Νέα Ζηλανδία - παράγεται μέλι, το οποίο είναι γνωστό για την αντιμικροβιακή δράση του.

S. aureus, έχει προταθεί ότι η MGO είναι πλήρως υπεύθυνη για την μη υπεροξειδική αντιμικροβιακή δράση του μελιού Manuka (Kwakman et al 2012) .

1.8.1.5 Bee defensin-1 (Αμυντοσίνη-1)

Η αμυντοσίνη-1 είναι ένα αντιμικροβιακό πεπτίδιο που πρόσφατα εντοπίστηκε στις μέλισσες. Έχει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση, αλλά μόνο έναντι των Gram(+) βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων του *B. subtilis*, *S. aureus* και *Raenibacillus larvae*. Η αμυντοσίνη-1 εκκρίνεται από τον υποφαρυγγικό αδένα των μελισσών οι οποίες χρησιμοποιούν τις εκκρίσεις του υποφαρυγγικού αδένα για την παραγωγή του βασιλικού πολτού και μελιού. Ωστόσο, η ποσότητα της αμυντοσίνης-1 σε βασιλικό πολτό και μέλι ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό , με μερικά δείγματα να στερούνται εντελώς αυτού του πεπτιδίου (Kwakman et al 2012) .

1.8.1.6 Φαινολικές ενώσεις

Έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές φαινολικές ενώσεις που έχουν αντιμικροβιακή δράση στο μέλι. Όμως, η δραστηριότητα των μεμονωμένων φαινολικών ενώσεων που έχουν απομονωθεί από το μέλι είναι πολύ χαμηλή για να συμβάλει ουσιαστικά στην αντιμικροβιακή δράση. Ίσως ο συνδυασμός των διαφόρων φαινολικών αντί των μεμονωμένων ενώσεων θα μπορούσε να συμβάλει ουσιαστικά στην δραστηριότητα του μελιού (Kwakman et al 2012).

1.8.2 Αντιοξειδωτική δράση

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται κάθε είδος ατόμου, μορίου ή ιόντος, το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα αδέσμευτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στοιβάδα και έχει τη δυνατότητα ελεύθερης, ανεξάρτητης ύπαρξης (Halliwell, 1987). Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του αερόβιου οξειδωτικού μεταβολισμού και είναι εξαιρετικά ενεργές σε χημικές αντιδράσεις με άλλα μόρια. Κυρίαρχο ρόλο για την υγεία του ανθρώπου έχουν οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS¹⁰), οι οποίες παράγονται

¹⁰ ROS: Reactive Oxygen Species. Ορισμένες ROS είναι οι εξής: υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂) μονήρες οξυγόνο (O[·]), σουπεροξειδική ανιονική ρίζα (O₂⁻), όζον (O₃).

φυσιολογικά στον οργανισμό ως αποτέλεσμα του κυτταρικού μεταβολισμού και άλλων λειτουργικών διεργασιών (Yiannakopoulou, 2009; Θρασυβούλου Α., 2005).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, υπάρχει ισορροπία μεταξύ των προοξειδωτικών¹¹ και αντιοξειδωτικών ουσιών στον οργανισμό. Όταν διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ αυτών, λόγω αυξημένης παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου ή ανεπάρκειας αντιοξειδωτικών μηχανισμών, τότε προκύπτει το οξειδωτικό stress. Το οξειδωτικό stress είναι υπεύθυνο για διάφορες ασθένειες του ανθρώπου λόγω των βλαβών που προκαλεί στα κυτταρικά λιπίδια, τις πρωτεΐνες και το DNA (Yiannakopoulou, 2009). Ορισμένες από αυτές τις ασθένειες είναι ο καρκίνος, οι καρδιακές παθήσεις, η αρθρίτιδα, οι ανοσολογικές ανωμαλίες και η πρόωρη γήρανση (Σάνδαλου και συν., 2002).

Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να χαρακτηριστεί οποιαδήποτε ουσία, η οποία, όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες των υποστρωμάτων που πρόκειται να οξειδωθούν, καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωση αυτών των υποστρωμάτων (Halliwell B, 2001). Οι αντιοξειδωτικές ουσίες, βοηθούν στην αποφυγή της βλάβης των κυτταρικών συστατικών, που είναι αποτέλεσμα των χημικών αντιδράσεων από τις οποίες προκύπτουν ελεύθερες ρίζες και στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης (Yiannakopoulou, 2009; Θρασυβούλου Α., 2005).

Στο μέλι έχουν βρεθεί διάφορες ουσίες με αντιοξειδωτική δράση όπως: βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη), βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), βιταμίνη A (β-καροτίνη) και ένζυμα όπως: καταλάση και υπεροξειδάση. Επίσης, αναφέρεται ότι η αντιοξειδωτική δράση του οφείλεται κυρίως στις διάφορες φαινολικές ουσίες που περιέχει (Θρασυβούλου Α., 2005).

Η αντιοξειδωτική δράση του μελιού, αν και μικρή σε σχέση με άλλες τροφές (π.χ. πορτοκάλι και μπρόκολο), είναι υπαρκτή και έχει αποδειχθεί από αναλύσεις που διεξήχθησαν στο Πανεπιστήμιο του Illinois των Η.Π.Α. (Frankel et al., 1998). Από διάφορες έρευνες προκύπτει ότι η αντιοξειδωτική δράση του μελιού ποικίλει πολύ και εξαρτάται από τα επιμέρους συστατικά του. Γενικά, τα σκουρόχρωμα μέλια έχουν

¹¹ Προοξειδωτικά είναι οι ελεύθερες ρίζες.

ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση, όντας πλουσιότερα σε φαινολικές ουσίες και μέταλλα (Σάνδαλου και συν., 2002).

2.1 Τι είναι οι βιοϋμένες

Ένας βακτηριακός βιοϋμενας (ή αλλιώς βιοφίλμ), είναι μια δομημένη κοινότητα μικροοργανισμών, που είναι εγκλεισμένη σε μια εξω-πολυσακχαρική (EPS) ή εξω-πολυμερική ουσία και διαχωρίζεται από ένα δίκτυο ανοικτών διαύλων ύδατος. Αυτή η κοινότητα προσκολλάται σε μια αδρανή ή ζωντανή επιφάνεια (π.χ. μέταλλα και δόντια) και συνήθως υπάρχει διασύνδεση υγρού-στερεού. Τα βιοφίλμ είναι πολυμικροβιακά και μπορεί να αποτελούνται όχι μόνο από βακτηριακά κύτταρα αλλά και από μύκητες, ιούς, πρωτεΐνες, εξωκυτταρικό DNA και άλλους βιογονικούς παράγοντες. Η αρχιτεκτονική των βιοϋμένων, αποτελεί ένα άριστο περιβάλλον για τις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου, συμπεριλαμβανομένης της διακυτταρικής ανταλλαγής γενετικού υλικού, των σημάτων επικοινωνίας, των μεταβολιτών και τη διάχυση των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών στην κοινότητα των βιοϋμένων. Οι βιοϋμένες, αποτελούνται κατά ~15% κατ 'όγκο από τους μικροοργανισμούς δηλαδή τα κύτταρα και κατά ~85% κατ 'όγκο από τη μήτρα δηλαδή το εξωπολυμερές. Μετά από έρευνες παρατηρήθηκε ότι τα ζωντανά βιοφίλμ είτε είναι ανεπτυγμένα εργαστηριακά και αποτελούνται από έναν μικροοργανισμό, είτε είναι πολύπλοκες πολυκυτταρικές κοινότητες που αναπτύσσονται σε φυσικά οικοσυστήματα, έχουν δείξει ότι η βασική δομή της κοινότητας είναι καθολική, με μερικές διαφορές μικρής σημασίας. Η μήτρα στην οποία ενσωματώνονται τα μικρόβια σε ένα βιοφίλμ προστατεύει τα άτομα από την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, την τοξικότητα μετάλλων, την έκθεση σε οξύ, την αφυδάτωση και την αλατότητα, τη φαγοκυττάρωση, τα αντιβιοτικά και τους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Το προστατευτικό εξωπολυμερές (EPS), η μεταβολική ευελιξία και η φαινοτυπική πλαστικότητα των μικροβίων είναι πιθανό να εξηγήσουν πώς τα βακτήρια μπορούν να επιβιώσουν σε τόσους πολλούς τύπους περιβαλλόντων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που είναι αφιλόξενοι σε υψηλότερες μορφές ζωής. Με το σχηματισμό οργανωμένων κοινοτήτων με άλλα μικρόβια, μπορούν να επεκτείνουν ακόμη

περισσότερο την ικανότητά τους να προσαρμόζονται και να ευδοκιμούν ακόμα και στα πιο εχθρικά περιβάλλοντα (Hall-Stoodley L et al., 2004 & Amin Omar et al., 2017 & Allie Clinton et al., 2015 & Rodney M. Donlan and J. William Costerton, 2002).

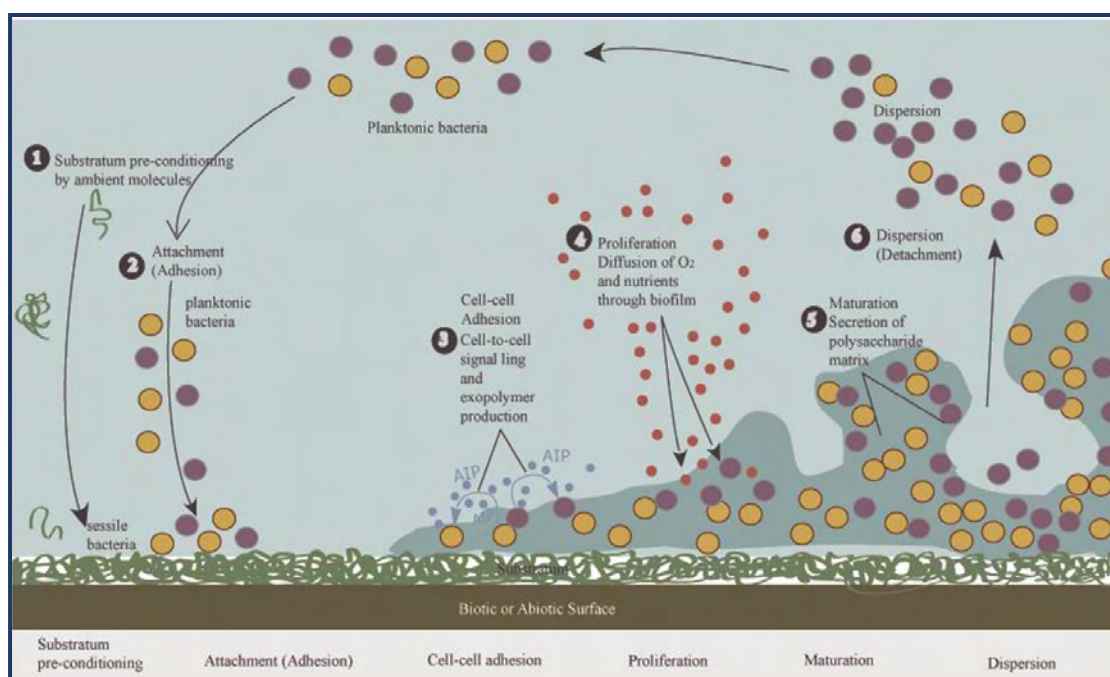
2.2 Σχηματισμός βιοϋμένων

2.2.1 Πώς σχηματίζονται οι βιοϋμένες

Τα βακτήρια που αναπτύσσονται πλαγκτονικά έχουν έντονη τάση αλληλεπίδρασης με επιφάνειες. Ο σχηματισμός των βιοϋμένων ξεκινά όταν ένα βακτήριο που έχει αναπτυχθεί σε πλαγκτονικό περιβάλλον βρεθεί σε μια εκτεθειμένη και καλυμμένη με λεπτό υμένιο επιφάνεια. Εκεί ξεπερνά τις απωθητικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ υποστρώματος και επιφάνειας του βακτηρίου και κάνει μια αρχική προσκόλληση σε αυτή την επιφάνεια του υποστρώματος. Μελέτες με "άγρια" στελέχη έδειξαν ότι οι λείες επιφάνειες αποικίζονται τόσο εύκολα όσο οι τραχείες επιφάνειες και ότι τα φυσικά χαρακτηριστικά μιας επιφάνειας επιδρούν μόνο σε μικρό βαθμό στην προσκόλληση των βακτηρίων. Στη συνέχεια, μπορεί να σχηματιστούν διαφορετικοί τύποι βιοϋμένων, οι οποίοι εξαρτώνται από το περιβάλλον. Μόλις γίνει η προσκόλληση σε μια επιφάνεια, αναπτύσσεται μια μικρή αποικία αποτελούμενη από αρχικά βακτήρια. Σε αυτό το σημείο τα βακτήρια είναι βυθισμένα σε μια προστατευτική μήτρα και αρχίζουν να εκφράζουν τον φαινότυπο του βιοϋμένα. Αυτό περιλαμβάνει την αύξηση της ανθεκτικότητας στην αντιμικροβιακή θεραπεία και την ανοσία του ξενιστή. Τα βακτηριακά κύτταρα εντός της εκκολαπτόμενης αποικίας, απελευθερώνουν μόρια μικρού μοριακού βάρους (μόρια αίσθησης/ανίχνευσης απαρτίας), τα οποία τελικά φθάνουν σε κρίσιμη συγκέντρωση καθώς ο προσκολλημένος πληθυσμός αυξάνει σε μέγεθος¹². Σε αυτό το κρίσιμο επίπεδο, τα μόρια ανίχνευσης απαρτίας ενεργοποιούν μια αλλαγή έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, βοηθώντας τη βακτηριακή κοινότητα να σχηματίσει ένα ώριμο βιοφίλμ. Μόλις το βιοφίλμ εδραιωθεί και ωριμάσει σε μια επιφάνεια, απελευθερώνει πλαγκτονικά κύτταρα τα οποία μεταναστεύουν ώστε να βρουν μια νέα θέση για αποικισμό (Amin Omar et al., 2017 & J. William Costerton et al., 1987 &

¹² Αίσθηση μεγέθους πληθυσμού ή Quorum Sensing.

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



Εικόνα 2-1: Σχηματισμός βιοϋμένα

2.2.2 Η σημασία του quorum sensing στο σχηματισμό των βιοϋμένων

Η αίσθηση μεγέθους πληθυσμού (QS) είναι ένας μηχανισμός σηματοδότησης μεταξύ των κυττάρων, που αναφέρεται στην ικανότητα των βακτηρίων να ανταποκρίνονται στα χημικά μόρια που μοιάζουν με ορμόνες και ονομάζονται αυτόεπαγωγείς (AIs)¹³ (Nicola C. Reading and Vanessa Sperandio, 2005).

Η αίσθηση μεγέθους πληθυσμού, αποτελεί βασική διαδικασία που εμπλέκεται στο σχηματισμό και στην έκφραση ειδικών ιδιοτήτων των βιοϋμένων. Τα μόρια

¹³ AIs = autoinducers

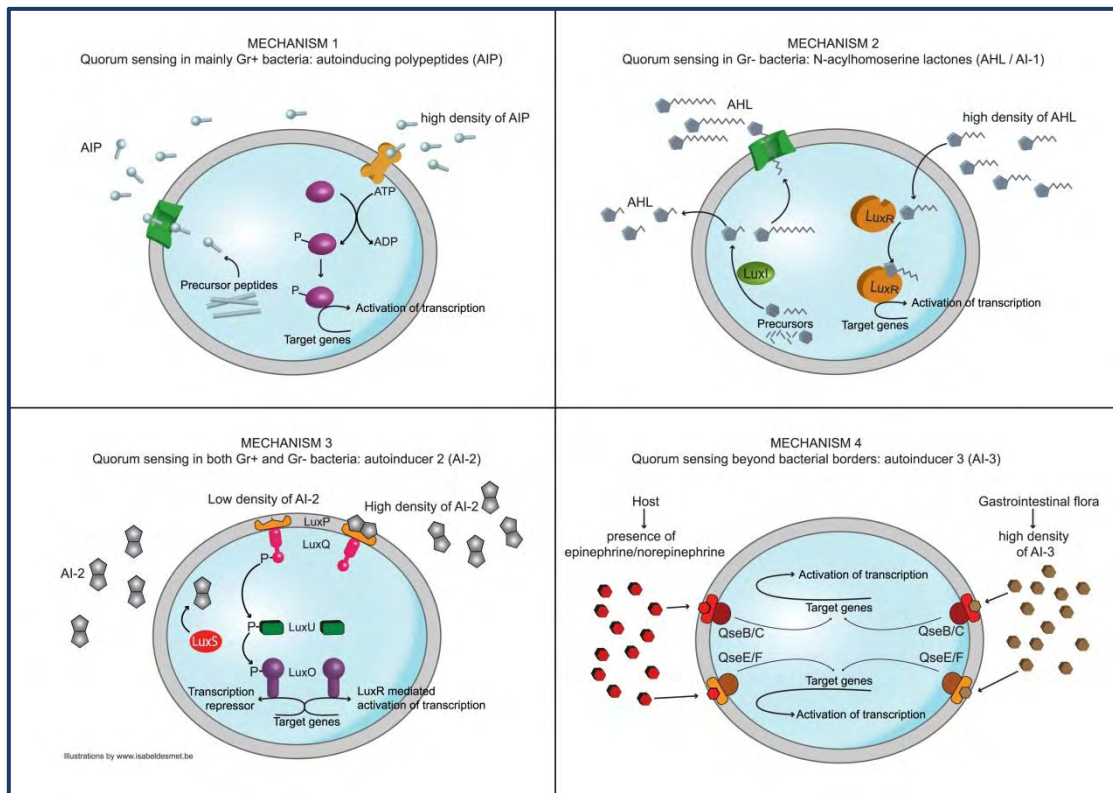
ανίχνευσης της απαρτίας, που ονομάζονται αυτοεπαγωγείς (AIs), εντοπίστηκαν σε πολλά είδη βακτηρίων και έχουν περιγραφεί πολλές διαφορετικές κατηγορίες. Ανεξάρτητα από τον τύπο του μορίου που εμπλέκεται, οι αυτοεπαγωγείς είναι μικρά μόρια που παράγονται με βασικό ρυθμό στα βακτηριακά κύτταρα. Ορισμένοι από αυτούς είναι ελεύθερα μόρια διάχυτα στις βακτηριακές μεμβράνες, οπότε η ενδοκυτταρική συγκέντρωσή τους προσεγγίζει εκείνη του περιβάλλοντός τους. Καθώς ο αριθμός των βακτηρίων αυξάνεται μέσα σε μία τοπική περιοχή (μικροαποικία), η αποτελεσματική συγκέντρωση των αυτοεπαγωγέων είναι αυξημένη. Μόλις η ενδοκυτταρική συγκέντρωσή τους φτάσει σε ένα κρίσιμο επίπεδο, προκαλούν έναν αριθμό αλλαγών στην έκφραση γονιδίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τις χαρακτηριστικές ιδιότητες κάθε βιοϋμένα (Nicola C. Reading and Vanessa Sperandio, 2005 & Amin Omar et al., 2017).

Οι πιο έντονα μελετημένοι αυτοεπαγωγείς είναι οι AHLs (N-acylhomoserine lactones) που παράγονται από Gram-αρνητικά βακτήρια. Επίσης, τα θετικά κατά Gram βακτήρια συνήθως παράγουν μικρά πεπτίδια καθώς και μια τάξη μορίων, που ονομάζεται AI-2, για τα οποία οι δομές είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστες (Amin Omar et al., 2017).

Τα βακτηριακά είδη στα οποία έχει γίνει η εντονότερη μελέτη για την αίσθηση μεγέθους πληθυσμού είναι τα: *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa* (Amin Omar et al., 2017). Για την *Ps. aeruginosa* παρατηρήθηκε ότι πολλοί από τους παράγοντες του λοιμογόνου χαρακτήρα του βακτηρίου βρίσκονται υπό τον έλεγχο του quorum sensing, συμπεριλαμβανομένων των εκκρινόμενων παραγόντων μολυσματικότητας (π.χ. πρωτεάσες), των παραγόντων που συνδέονται με το κύτταρο (π.χ. λιποπολυσακχαρίτες) και του σχηματισμού βιοϋμένων (Lyczak, J.B., 2000). Ο *St. aureus*, όπως και άλλα θετικά κατά Gram βακτήρια, χρησιμοποιεί ένα σύστημα ανίχνευσης της απαρτίας με πεπτίδια, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Σε αυτό το είδος, το quorum sensing προκαλείται από τα πεπτίδια (AIPs) που κωδικοποιούνται από τον γονιδιακό τόπο *agr*¹⁴. Ο ίδιος γονιδιακός τόπος ελέγχει έναν αριθμό

¹⁴ Agr = Accessory Gene Regulator

παραγόντων μολυσματικότητας, συμπεριλαμβανομένου του σχηματισμού βιοϋμένων (Amin Omar et al., 2017 & Jeremy M. Yarwood et al., 2004).



Εικόνα 2-2: Quorum sensing

2.3 Ο ρόλος των βιοϋμένων στην ανθεκτικότητα των βακτηρίων

Η ύπαρξη βιοϋμένων θεωρείται σε μεγάλο βαθμό προβληματική, τόσο στον βιομηχανικό, όσο και στον ιατρικό τομέα, διότι τα βιοφίλμ είναι εκ φύσεως εξαιρετικά ανθεκτικά στην εξάλειψη τους από αντιμικροβιακούς παράγοντες και στους μηχανισμούς κάθαρσης του ξενιστή, όπως αντισώματα και φαγοκύτταρα. Αυτό οφείλεται στη φύση της δομής των βιοϋμένων και στις ιδιότητες των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στα βιοφίλμ. Στην ουσία ο ξεχωριστός φαινότυπός τους τους καθιστά ανθεκτικούς σε αντιμικροβιακούς παράγοντες και η μήτρα τους τους καθιστά ανθεκτικούς στα αντιβακτηριακά μόρια και κύτταρα που κινητοποιούνται από τον ξενιστή. Το λειτουργικό περιβάλλον των μεμονωμένων

βακτηριακών κυττάρων που αναπτύσσονται εντός των βιοϋμένων διαφέρει ριζικά από αυτό των πλαγκτονικών κυττάρων στο ίδιο οικοσύστημα, και ακόμη πιο ριζικά από εκείνο των πλαγκτονικών κυττάρων σε καλλιέργεια που αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο εργαστηριακά. Τα βιοφίλμ σε γενικές γραμμές αναφέρονται ως λιγότερο ευαίσθητα σε αντιμικροβιακές θεραπείες από ότι τα πλαγκτονικά αντίστοιχά τους, με 100-1000 φορές, ή και περισσότερο, μειωμένη ευαισθησία (Mette Burmølle et al., 2006 & Amin Omar et al., 2017 & Rodney M. Donlan and J. William Costerton, 2002).

Οι βακτηριακοί βιοϋμένες σχετίζονται με την πλειοψηφία των χρόνιων μολύνσεων. Υπάρχουν *in vivo* και *in vitro* αποδείξεις ότι το εξωπολυμερές των βιοϋμένων προστατεύει τις χρόνιες πληγές από τις φλεγμονώδεις διεργασίες που είναι καθοριστικές για την επούλωση των πληγών. Ευρήματα έχουν επίσης δείξει ότι το εξωπολυμερές περιορίζει την ικανότητα των λευκοκυττάρων να διεισδύσουν στο βιοφίλμ, παρεμποδίζει την κίνηση τους μέσα στο βιοφίλμ, μειώνει την ικανότητά τους να παράγουν δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και εμποδίζει τη φαγοκυττάρωση των βακτηριδίων. Η έκθεση βακτηριακών βιοφίλμ σε μη επαρκείς συγκεντρώσεις αντιβιοτικών ή σε λάθος αντιβιοτικά μπορεί να προκαλέσει βλενώδεις φαινότυπους, οι οποίοι δημιουργούν παχύτερα βιοφίλμ με πρόσθετα συστατικά στη μήτρα τους (Amin Omar et al., 2017 & Andrew J. McBain et al., 2000). Είναι ευρέως γνωστό ότι οι μολύνσεις που σχετίζονται με βακτήρια που δημιουργούν βιοϋμένες είναι δύσκολο να εξαλειφθούν και έχουν αποτελέσει αντικείμενο έντονων επιστημονικών ερευνών τα τελευταία χρόνια. Πολλές μολύνσεις από βιοϋμένες αναπτύσσονται αργά και αρχικά προκαλούν λίγα συμπτώματα, ενώ αργότερα μπορεί να είναι πολύ επιβλαβείς. Παραδείγματα λοιμώξεων που σχετίζονται με τους βιοϋμένες περιλαμβάνουν τον αποικισμό εμφυτευμένων ιατρικών συσκευών όπως προσθετικές βαλβίδες καρδιάς και βηματοδότες, κεντρικοί φλεβικοί καθετήρες, καθετήρες ουρήθρας, φακοί επαφής, ενδομήτριες συσκευές και οδοντιατρικές μονάδες νερού. Άλλα παραδείγματα ανθρώπινων λοιμώξεων που έχουν άμεση σχέση με βιοϋμένες είναι η λοιμώδης ενδοκαρδίτιδα, η ωτίτιδα, η χρόνια μικροβιακή προστατίτιδα, η περιοδοντίτιδα και η τερηδόνα, διάφορες πνευμονικές λοιμώξεις σε ασθενείς με κυστική ίνωση και οι χρόνιες πληγές. Η πλειονότητα των ανθρώπινων

μολύνσεων (60% -80%) σχετίζονται με βιοϋμένες. Υπάρχουν επίσης διάφορες δερματικές ασθένειες που σχετίζονται με βιοϋμένες, όπως εγκαύματα, έλκη πίεσης, μολύνσεις από χειρουργική επέμβαση και έλκη διαβητικού ποδιού, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν ακόμη και το θάνατο. Εκτός του ιατρικού πεδίου, η ύπαρξη βιοϋμένων συνδέεται με τη μόλυνση και διάβρωση εργοστασιακών εγκαταστάσεων και σωληνώσεων και αποτελούν σημαντικό πρόβλημα σε πολλές βιομηχανίες. Πολύ σοβαρό κομμάτι αποτελούν στη βιομηχανία επεξεργασίας τροφίμων, διότι τα βιοφίλμ σχηματίζονται σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα και ουσιαστικά συμβάλλουν τόσο στη μόλυνση όσο και στην αλλοίωση του προϊόντος (Amin Omar et al., 2017 & Andrew J. McBain et al., 2000 & Rodney M. Donlan and J. William Costerton, 2002).

Υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί που θα μπορούσαν να εξηγήσουν την ανοχή των βιοϋμένων στις διάφορες θεραπείες. Ορισμένες θεωρίες για αυτή την ανθεκτικότητα είναι οι εξής:

- Η ετερογένεια στη φυσιολογία των διαφόρων μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στους βιοϋμένες.
- Παρουσία συγκεκριμένων κυττάρων που ονομάζονται persister cells και επιτρέπουν τον επαναπληθυσμό του βιοϋμένα μετά από θεραπείες. [46,47,48]
- Αλλαγή στον μεταβολικό ρυθμό (π.χ. χαμηλοί μεταβολικοί ρυθμοί) των βακτηρίων που σχηματίζουν βιοϋμένες και επηρεάζουν τον μηχανισμό δράσης των κοινώς χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών.
- Καθυστερημένη διείσδυση του αντιμικροβιακού παράγοντα στη μήτρα του βιοϋμένα.
- Παρεμπόδιση στη διάχυση των φαρμάκων από το εξωπολυμερές των βιοϋμένων.
- Κυριαρχία των ανθεκτικών σε φάρμακα γονιδίων, τα οποία μπορούν εύκολα να μεταφερθούν σε άλλους οργανισμούς μέσα σε έναν βιοϋμένα.

Φαίνεται να υπάρχει ένας συνδυασμός των παραπάνω μηχανισμών στον οποίο αποδίδεται η μεγάλη ανθεκτικότητα των βιοϋμένων (Amin Omar et al., 2017 & Rodney M. Donlan and J. William Costerton, 2002).

3 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

3.1 Γενικές πληροφορίες

Ο *Staphylococcus aureus* ή αλλιώς χρυσίζων σταφυλόκοκκος είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο, θετικό κατά gram βακτήριο, το οποίο έχει σχήμα κόκκου. Είναι ένα συνηθισμένο βακτήριο αλλά ταυτόχρονα και ανθρώπινο παθογόνο, το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Staphylococcaceae* και στο γένος *Staphylococcus*. Ο *S. aureus* είναι μη κινητό βακτήριο και δεν σχηματίζει σπόρια. Εμφανίζεται ως σύμπλεγμα που μοιάζει με τσαμπί από σταφύλια και όταν παρατηρείται μέσω μικροσκοπίου έχει μεγάλες, στρογγυλές, χρυσοκίτρινες αποικίες γι' αυτό και καλείται χρυσίζων σταφυλόκοκκος. Ο *S. aureus* αναπαράγεται με δυαδική σχάση και είναι θετικός στο τεστ καταλάσης (https://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus & Mahmud Masalha et al., 2001 & Steven Y. C. Tong et al., 2015).



Εικόνα 3-1: *Staphylococcus aureus*

Ο *Staphylococcus* εντοπίστηκε για πρώτη φορά το 1880 στο Aberdeen της Σκωτίας από τον χειρουργό Sir Alexander Ogston, στο πύον ενός χειρουργικού αποστήματος σε άρθρωση γόνατος. Το όνομα αυτό, μετατράπηκε αργότερα σε *Staphylococcus aureus* από τον Friedrich Julius Rosenbach, σύμφωνα με το επίσημο σύστημα ονοματολογίας εκείνης της εποχής (https://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus).

Περίπου το 20% του γενικού πληθυσμού είναι χρόνιοι φορείς του χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου, ενώ ακόμη 30-60% είναι περιστασιακοί, παροδικοί φορείς ή εμφανίζουν περιόδους φορέας (Παπαρίζος Β., 2013). *S. aureus* που μπορεί να βρεθεί ως μέλος της φυσιολογικής χλωρίδας του σώματος, στη μύτη, στην αναπνευστική οδό, στο δέρμα. Επίσης, αποτελεί κανονικό κάτοικο της χαμηλότερης αναπαραγωγικής οδού των γυναικών. Τέλος μπορεί να επιβιώσει σε οικόσιτα ζώα όπως τα σκυλιά, οι γάτες, τα άλογα (https://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus).

3.2 Παθογένεια

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο *Staphylococcus aureus* είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο που μπορεί να προκαλέσει διάφορες ασθένειες. Συγκεκριμένα, αποτελεί μία από τις πιο κοινές αιτίες βακτηριαμίας και μολυσματικής ενδοκαρδίτιδας. Επιπρόσθετα, μπορεί να προκαλέσει διάφορες λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών ιστών, ιδιαίτερα όταν έχουν παραβιαστεί οι φραγμοί του δέρματος ή των βλεννογόνων (https://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus & Steven Y. C. Tong et al., 2015).

Τα τελευταία χρόνια, παρατηρήθηκε ένας αυξημένος αριθμός μολύνσεων από *S. aureus* που συνδέονται με την υγειονομική περίθαλψη αλλά και διάφορες λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων που προκαλούνται από τα στελέχη με ορισμένους παράγοντες μολυσματικότητας και αντοχή στα αντιβιοτικά β-λακτάμης (Steven Y. C. Tong et al., 2015).

Οι βασικότερες ασθένειες που μπορεί να προκαλέσει είναι οι εξής:

- **Βακτηριαμία:** Η παρουσία βακτηρίων στην κυκλοφορία του αίματος. Τα βακτήρια εισέρχονται στην κυκλοφορία μέσα από πληγές, από βλεννογόνους υμένες ή όταν υπάρχουν παθολογικές αλλοιώσεις στο αγγειακό σύστημα κ.ά. Μπορεί να εμφανιστεί επίσης κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης λοιμωδών ασθενειών και ελαττώνεται καθώς ο οργανισμός υπερνικά την ασθένεια, ενεργοποιώντας τη φαγοκυτταρική λειτουργία των λευκών αιμοσφαιρίων και

στο τέλος, εξαφανίζεται. Στην αντίθετη περίπτωση επιδεινώνεται, εξελίσσεται σε σηψαιμία, που συνήθως καταλήγει σε θάνατο (Steven Y. C. Tong et al., 2015).

- **Λοιμώδης ενδοκαρδίτιδα:** Είναι μια φλεγμονή του ενδοκαρδίου και των καρδιακών βαλβίδων, που προκαλείται από λοιμώδεις παράγοντες. Οι καρδιακές βαλβίδες δεν έχουν δική τους αιμάτωση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι ανοσιακοί αμυντικοί μηχανισμοί να μην έχουν πρόσβαση σε αυτές μέσω της αιματικής ροής. Όταν ο *S. aureus* προσεγγίσει την επιφάνεια μιας βαλβίδας και σχηματίσει μια εκβλάστηση, η ανοσιακή απάντηση του ξενιστή είναι ελαττωμένη. Η έλλειψη αιματικής παροχής στις βαλβίδες έχει επιπτώσεις και στη θεραπεία, καθώς ούτε τα φάρμακα έχουν πρόσβαση στην προσβεβλημένη βαλβίδα (https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9B%CE%BF%CE%B9%CE%BC%CF%8E%CE%B4%CE%B7%CF%82_%CE%B5%CE%BD%CE%B4%CE%BF%CE%BA%CE%B1%CF%81%CE%B4%CE%AF%CF%84%CE%B9%CE%B4%CE%B1%#%CE%A0%CE%B1%CE%B8%CE%BF%CE%B3%CE%AD%CE%BD%CE%B5%CE%B9%CE%B1 & Steven Y. C. Tong et al., 2015).
- **Δερματικές λοιμώξεις και λοιμώξεις των μαλακών ιστών (SSTI)¹⁵:** κυμαίνονται από καλοήθειες (π.χ. έκζεμα προσώπου) έως λοιμώξεις απειλητικές για τη ζωή. Οι λοιμώξεις του δέρματος είναι η πιο κοινή μορφή μόλυνσης από *S. aureus*. Ορισμένες από αυτές είναι τα σπυράκια, το έκζεμα προσώπου, η κυτταρίτιδα, η θυλακίτιδα, το σταφυλοκοκκικό σύνδρομο αποφολίδωσης του δέρματος κ.α. Επίσης, ο *S. aureus* είναι το πιο κοινό παθογόνο που απομονώνεται από χειρουργικές λοιμώξεις. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα στελέχη που είναι ανθεκτικά στο αντιβιοτικό μεθικιλίνη (MRSA), τα οποία εμφανίστηκαν μετά εισαγωγή της μεθικιλίνης στον ιατρικό τομέα. Αρχικά, ήταν ασυνήθιστη η ύπαρξή τους εκτός του περιβάλλοντος υγείας μέχρι τη δεκαετία του 1990, όπου και εμφανίστηκαν πολλές περιπτώσεις ατόμων προσβεβλημένων από αυτά τα στελέχη ενώ δεν είχαν σχέση με τον τομέα της υγείας. Αυτό αποτελεί παγκόσμιο πρόβλημα

¹⁵ SSTI = Skin And Soft Tissue Infections

στην κλινική ιατρική (https://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus & Steven Y. C. Tong et al., 2015).

- **Οστεοαρθρικές λοιμώξεις:** Ο *S. aureus* είναι το πιο κοινό παθογόνο και στις τρεις κύριες κατηγορίες της οστεοαρθρικής λοίμωξης, δηλαδή της οστεομυελίτιδας, της φυσικής αρθρίτιδας και της μόλυνσης προσθετικής άρθρωσης (Steven Y. C. Tong et al., 2015).
- **Μολύνσεις που σχετίζονται με προσθετικές συσκευές:** Ο *S. aureus* είναι ιδιαίτερα γνωστό βακτήριο το οποίο μολύνει ξένα σώματα, όπως προσθετικές καρδιακές βαλβίδες και προσθετικές αρθρώσεις, στο εσωτερικό του ανθρώπινου ξενιστή προκαλώντας λοιμώξεις. Αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω του σχηματισμού βιοϋμένων, οι οποίοι δεν είναι εύκολα αντιμετωπίσιμοι φαρμακευτικές αγωγές (Steven Y. C. Tong et al., 2015).
- **Πνευμονία:** Ο *S. aureus* παίζει σημαντικό ρόλο σε αναπνευστικές λοιμώξεις ασθενών που νοσηλεύονται και έχει εμπλακεί σε κάθε μία από τις κύριες υποκατηγορίες πνευμονίας (νοσοκομειακή πνευμονία, πνευμονία που συνδέεται με τη χρήση αναπνευστήρα, και πνευμονία που σχετίζεται με την υγειονομική περίθαλψη). Είναι επίσης κοινό παθογόνο σε ασθενείς με κυστική ίνωση (Steven Y. C. Tong et al., 2015).
- **Διάφορες άλλες λοιμώξεις ή ασθένειες που οφείλονται στον *S. aureus* όπως** επιδερμικά αποστήματα, μηνιγγίτιδα (σπάνια), σύνδρομο τοξικού σοκ (TSS) το οποίο προκαλείται από τοξίνες που παράγονται από τον *S. aureus* και συνδέεται με τη χρήση ταμπόν, λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος (σπάνια) και σηπτική θρομβοφλεβίτιδα (σπάνια) (Steven Y. C. Tong et al., 2015).
- **Τροφική δηλητηρίαση:** Ο *S. aureus* μπορεί να παράξει τοξίνες που προκαλούν τροφική δηλητηρίαση στο ανθρώπινο σώμα, η διάρκεια της οποίας είναι από 30 λεπτά μέχρι τρεις ημέρες (https://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus).

Οι λοιμώξεις του *S. aureus* μπορούν να εξαπλωθούν μέσω επαφής με πύον από μολυσμένο τραύμα, επαφής δέρματος με δέρμα από μολυσμένο άτομο και επαφής

με αντικείμενα που χρησιμοποιούνται από μολυσμένο άτομο όπως πετσέτες, ρούχα ή αθλητικό εξοπλισμό. Προληπτικά μέτρα είναι, το πλύσιμο των χεριών συχνά με σαπούνι και το καθημερινό μπάνιο ή ντους
(https://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus).

Οι διαβητικοί, οι χρήστες ενέσιμων ναρκωτικών και τα άτομα με καρδιακές παθήσεις θα πρέπει να λαμβάνουν πρόσθετες προφυλάξεις για να αποφύγουν την επαφή τους με τον *Staphylococcus aureus*, καθώς διατρέχουν τον υψηλότερο κίνδυνο.
(https://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus).

Ο *S. aureus* μπορεί να παραμείνει αδρανής στο σώμα για χρόνια χωρίς ανίχνευση. Μόλις αρχίσουν να εμφανίζονται τα συμπτώματα, ο οικοδεσπότης είναι μεταδοτικός για άλλες δύο εβδομάδες και η συνολική ασθένεια διαρκεί μερικές εβδομάδες. Εάν όμως δεν θεραπευθεί, η ασθένεια μπορεί να είναι θανατηφόρα.
(https://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus).

4 PSEUDOMONAS AERUGINOSA

4.1 Γενικές πληροφορίες

Η *Pseudomonas aeruginosa* (αεριογόνος ψευδομονάδα ή πυοκυανική) είναι ένα Gram-αρνητικό και κατά κανόνα κινητό αερόβιο βακτήριο. Έχει ραβδοειδές σχήμα και δεν παράγει σπόρους (μη σπορογόνο). 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. Τα κύτταρά του διατάσσονται μεμονωμένα, σε ζεύγη και σε μικρές αλυσίδες. Επίσης είναι αμφίτριχο, διότι έχει μια μόνο βλεφαρίδα σε κάθε πόλο. Ανήκει στην οικογένεια Pseudomonadaceae και στο γένος *Pseudomonas*

(https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A8%CE%B5%CF%85%CE%B4%CE%BF%CE%BC%E%BF%CE%BD%CE%AC%CE%B4%CE%B1_%CE%B7_%CE%B1%CE%B5%CF%81%CE%B9%CE%BF%CE%B3%CF%8C%CE%BD%CE%BF%CF%82).

Ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης είναι οι 37 οC, μπορεί όμως να αναπτυχθεί και σε 4 – 43 οC. Το γεγονός ότι αναπτύσσεται στους 42 οC την διαφοροποιεί από τις υπόλοιπες ψευδομονάδες. Σημαντικό χαρακτηριστικό των αποικιών της *P. aeruginosa* είναι η ιδιαίτερη ευχάριστη οσμή της. Σε ορισμένες καλλιέργειες παρατηρούνται βλενώδεις αποικίες, λόγω του ελύτρου της. Ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των στελεχών της παράγουν την χρωστική πράσινη πυοκυανίνη. Σημαντικό είναι ότι από όλα τα είδη της ψευδομονάδας μόνο η *P. aeruginosa* έχει αυτήν την ιδιότητα. Η πυοκυανίνη χρωματίζει τα εκκρίματα των λοιμώξεων που οφείλονται στην συγκεκριμένη ψευδομονάδα, για αυτό και η Ψευδομονάδα η αεριογόνος ονομάζεται και πυοκυανική. Στελέχη που παράγουν πυοκυανίνη χαρακτηρίζονται εύκολα ως *P. aeruginosa* και δεν χρειάζονται άλλες δοκιμασίες για την τυποποίηση του μικροβίου. Οι ψευδομονάδες παράγουν σπανιότερα και άλλες χρωστικές (https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A8%CE%B5%CF%85%CE%B4%CE%BF%CE%BC%CE%BF%CE%BD%CE%AC%CE%B4%CE%B1_%CE%B7_%CE%B1%CE%B5%CF%81%CE%B9%CE%BF%CE%B3%CF%8C%CE%BD%CE%BF%CF%82).

https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A8%CE%B5%CF%85%CE%B4%CE%BF%CE%BC%CE%BF%CE%BD%CE%AC%CE%B4%CE%B1_%CE%B7_%CE%B1%CE%B5%CF%81%CE%B9%CE%BF%CE%B3%CF%8C%CE%BD%CE%BF%CF%82).

Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι η πιο συχνή αιτία λοιμώξεων από ψευδομονάδα στον άνθρωπο. Το 10% των ανθρώπων την φέρει ως μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου. Μπορεί να επιβιώσει κάτω από δυσμενείς συνθήκες για τους περισσότερους οργανισμούς και αντιστέκεται στην φαγοκυττάρωση και είναι ανθεκτικό στα περισσότερα αντιβιοτικά. Τέλος, απαντάται σε διάφορες τοποθεσίες του φυσικού περιβάλλοντος, στο έδαφος και στο νερό (https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A8%CE%B5%CF%85%CE%B4%CE%BF%CE%BC%CE%BF%CE%BD%CE%AC%CE%B4%CE%B1_%CE%B7_%CE%B1%CE%B5%CF%81%CE%B9%CE%BF%CE%B3%CF%8C%CE%BD%CE%BF%CF%82).



Εικόνα 4-1: *Pseudomonas aeruginosa*

4.2 Παθογένεια

Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο, που σημαίνει ότι εκμεταλλεύεται κάποιο διάλειμμα στις άμυνες του ξενιστή για να ξεκινήσει μια μόλυνση. Το βακτήριο μπορεί να μολύνει όλους τους ιστούς αν οι άμυνες του ιστού παραβιαστούν με κάποιο τρόπο. Προκαλεί λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος, δερματίτιδα, λοιμώξεις των μαλακών ιστών, βακτηριαιμία, μολύνσεις οστών και αρθρώσεων, γαστρεντερικές

λοιμώξεις και μια ποικιλία συστηματικών λοιμώξεων, ιδιαίτερα σε ασθενείς με σοβαρά εγκαύματα και καρκίνο και ασθενείς με AIDS που είναι σε ανοσοκαταστολή. Η λοίμωξη από *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένα σοβαρό πρόβλημα σε ασθενείς που νοσηλεύονται με καρκίνο, κυστική ίνωση, και εγκαύματα. Το ποσοστό θνησιμότητας σε αυτούς τους ασθενείς είναι κοντά στο 50%.

Οι βασικότερες ασθένειες που μπορεί να προκαλέσει είναι οι εξής:

- **Ενδοκαρδίτιδα:** μολύνει τις καρδιακές βαλβίδες των χρηστών ναρκωτικών IV (ενδοφλεβίως) και τις προσθετικές βαλβίδες της καρδιάς. Ο οργανισμός καθιερώνεται στο ενδοκάρδιο με άμεση εισβολή από το ρεύμα του αίματος.
- **Λοιμώξεις του αναπνευστικού:** συμβαίνουν σχεδόν αποκλειστικά σε άτομα με πρόβλημα στην κατώτερη αναπνευστική οδό ή κατεσταλμένο συστηματικό μηχανισμό άμυνας. Πρωτογενής πνευμονία εμφανίζεται σε ασθενείς με χρόνια πνευμονοπάθεια και συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια. Βακτηριακή πνευμονία εμφανίζεται συνήθως σε ουδετεροπενικούς ασθενείς με καρκίνο που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία. Τέλος, ο αποικισμός της κατώτερης αναπνευστικής οδού με βλενώδη στελέχη της *Pseudomonas aeruginosa* σε ασθενείς με κυστική ίνωση είναι συχνή φαινόμενο και δύσκολο, αν όχι αδύνατο, να εξαλειφθεί.
- **Βακτηραιμία και σηψαιμία.** Η *Pseudomonas aeruginosa* προκαλεί βακτηραιμία κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Συνήθως οι μολύνσεις γίνονται σε νοσοκομεία και γηροκομεία. Στην *Pseudomonas* οφείλεται περίπου το 25% τοις εκατό του συνόλου των απεκτηθέντων Gram-αρνητικών βακτηριαμιών (Grogan JB, 1996).
- **Λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος:** Η *Pseudomonas aeruginosa* προκαλεί μηνιγγίτιδα και αποστήματα στον εγκέφαλο. Ο οργανισμός εισβάλλει στο ΚΝΣ¹⁶ από μία παρακείμενη δομή όπως το εσωτερικό αυτί ή τους παραρρινικούς κόλπους, ή εμβολιάζεται απ' ευθείας μέσω τραύματος της κεφαλής, χειρουργείου ή επεμβατικών διαγνωστικών διαδικασιών, ή

¹⁶ Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

εξαπλώνεται από ένα μακρινό σημείο της λοίμωξης, όπως το ουροποιητικό σύστημα.

- **Μολύνσεις αυτιών:** Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι το κυρίαρχο παθογόνο βακτήριο σε ορισμένες περιπτώσεις εξωτερικής ωτίτιδας. Το βακτήριο σπάνια βρίσκεται στο υγιές αυτί, αλλά συχνά κατοικεί στον εξωτερικό ακουστικό πόρο.
- **Μολύνσεις των ματιών:** Η *Pseudomonas aeruginosa* μπορεί να προκαλέσει καταστροφικές μολύνσεις στο ανθρώπινο μάτι. Είναι μια από τις πιο κοινές αιτίες βακτηριακής κερατίτιδας, και έχει απομονωθεί ως αιτιολογικός παράγοντας της νεογνικής οφθαλμίας. Εάν οι άμυνες του περιβάλλοντος είναι σε κίνδυνο με οποιονδήποτε τρόπο, το βακτήριο μπορεί να πολλαπλασιαστεί ταχέως μέσω της παραγωγής ενζύμων όπως η ελαστάση, αλκαλική πρωτεάση και εξωτοξίνη A, και να προκαλέσει μία ταχέως καταστροφική λοίμωξη που μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια ολόκληρου του ματιού.
- **Λοιμώξεις οστών και αρθρώσεων:** Οι λοιμώξεις των οστών και των αρθρώσεων προκύπτουν από άμεσο ενοφθαλμισμό των βακτηρίων ή την αιματογενή διασπορά των βακτηρίων από άλλες πρωτογενείς θέσεις μόλυνσης. Η *Pseudomonas aeruginosa* προκαλεί χρόνια οστεομυελίτιδα και είναι το πλέον κοινό παθογόνο που εμπλέκεται στην οστεοχονδρίτιδα μετά από πληγές λόγω παρακέντησης του ποδιού.
- **Λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος:** Οι λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος (ουρολοιμώξεις), που προκαλούνται από την *Pseudomonas aeruginosa* είναι συνήθως ενδονοσοκομειακές και σχετίζονται με καθετηριασμό, όργανα ή χειρουργική επέμβαση του ουροποιητικού. Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι η τρίτη κύρια αιτία των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων του ουροποιητικού, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 12% όλων των μολύνσεων αυτού του τύπου. (Khan et al., 2000).
- **Λοιμώξεις του γαστρεντερικού συστήματος:** Η *Pseudomonas aeruginosa* μπορεί να παράγει ασθένεια σε οποιοδήποτε μέρος του γαστρεντερικού σωλήνα από το στοματοφάρυγγα έως το ορθό. Οι λοιμώξεις που αφορούν την γαστρεντερική οδό συμβαίνουν κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Το

γαστρεντερικό σύστημα είναι επίσης σημαντική πύλη εισόδου της *Pseudomonas aeruginosa* στην σηψαιμία και βακτηραιμία.

- **Λοιμώξεις δέρματος και μαλακών ιστών**, συμπεριλαμβανομένων των λοιμώξεων του τραύματος, πυώδεις δερματίτιδες και δερματίτιδα: Οι κοινοί παράγοντες που προδιαθέτουν τη λοίμωξη είναι η λύση της συνέχειας του δέρματος που μπορεί να προκύψει από εγκαύματα, τραύμα ή δερματίτιδα. Επίσης ενοχοποιούνται συνθήκες υψηλής υγρασίας, όπως αυτές που βρέθηκαν στο αυτί των κολυμβητών και στα δάκτυλα των ποδιών αθλητών, πεζοπόρων και μάχιμων στρατεύματων, στην περιοχή του περινέου και κάτω από τις πάνες βρεφών και στο δέρμα των χρηστών τζακούζι και υδρομασάζ. Τα άτομα με AIDS μπορούν να μολυνθούν εύκολα. Τέλος, έχει επίσης ενοχοποιηθεί για θυλακίτιδα.

5 ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης, είναι η διερεύνηση της ικανότητας αναστολής *in vitro*, βιοϋμένων που σχηματίζουν δύο πολύ σημαντικά για τον ανθρώπινο οργανισμό παθογόνα βακτήρια, ο *Staphylococcus aureus* και η *Pseudomonas aeruginosa*, παρουσία μελιών που παράγονται στην ευρύτερη περιοχή του Ολύμπου. Έτσι, η συγκεκριμένη μελέτη μπορεί να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για την αποτελεσματικότητά αυτών των μελιών απέναντι στη δημιουργία βιοϋμένων από τα συγκεκριμένα βακτήρια, με απώτερο σκοπό, τη χρήση των μελιών του Ολύμπου στη θεραπεία των χρόνιων πληγών.

6.1 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας είναι τα εξής:

- Θρεπτικό υλικό Mueller Hinton II Agar
- Θρεπτικό υλικό Nutrient Broth
- Θρεπτικό υλικό Tryptic Soy Broth
- Θρεπτικό υλικό LB Broth
- Θρεπτικό υλικό Brain Heart Infusion
- Θρεπτικό υλικό Glucose
- Υγρό έκπλυσης PBS (Phosphate buffered saline)
- Μεθανόλη
- Οξικό οξύ
- Χρωστική ουσία: Crystal violet
- Αιθανόλη
- Απιονισμένο νερό
- Πιπέτα DRAGONMED Top Pette 0,5-10μλ
- Πιπέτα DRAGONMED Top Pette 2-20μλ
- Πιπέτα DRAGONMED Top Pette 20-200μλ
- Πιπέτα DRAGONMED Top Pette 100-1000μλ
- Τρυβλία Petri (100mm)
- Αποστειρωμένες μικροπλάκες (microplates) πολυστερίνης 96 θέσεων (96 wells)
- Αποστειρωμένα πλαστικά φιαλίδια τύπου falcon των 50ml
- Eppendorfs

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- *Pseudomonas aeruginosa* 1773 (Ανθεκτική στις καρβαπενέμες)
- *Staphylococcus aureus* MRSA (Ανθεκτικό στη μεθικιλίνη)

Τα δείγματα μελιού που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Μέλια Ολύμπου με κωδικούς: 1, 2, 3, 13, 17, 18, 19, 20
- Μέλι Manuka της εταιρείας Manuka Health New Zealand με UMF ("Unique Manuka Factor"), 25+ και MGO (μεθυλγλυοξάλη) 550.
- Συνθετικό μέλι

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

6.2 Μέθοδοι

6.2.1 Παρασκευή συνθετικού μελιού

Το συνθετικό μέλι παρασκευάστηκε εργαστηριακά. Για την παρασκευή του συγκεκριμένου διαλύματος χρησιμοποιήθηκαν 3gr σουκρόζης, 15gr μαλτόζης, 80,1gr φρουκτόζης και 67gr γλυκόζης τα οποία διαλύθηκαν σε 34ml απιονισμένο νερό (Sherlock et al., 2010). Στη συνέχεια, το διάλυμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 56 οC μέχρι να διαλυθεί. Αυτό το διάλυμα αντιπροσωπεύει τα τέσσερα κύρια σάκχαρα που βρίσκονται στο μέλι.

6.2.2 Δημιουργία stock γλυκερόλης

Η αποθήκευση βακτηρίων σε stock γλυκερόλης 25% πραγματοποιείται ώστε να διατηρούνται τα βακτήρια ζωντανά σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Η διαδικασία γίνεται ως εξής: Αρχικά τοποθετείται 1,5ml υγρής βακτηριακής καλλιέργειας σε erpendorf και φυγοκεντρείται σε 12000rpm για 3 λεπτά. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθεται 1ml φρέσκου LB. Γίνεται ανάδευση σε vortex και στη συνέχεια προσθήκη 300-350μl γλυκερόλης και ξανά ανάμειξη σε vortex. Τέλος, γίνεται επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Η

διατήρηση των δειγμάτων γίνεται στους -80o C όπου και παραμένουν σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

6.2.3 Καλλιέργειες των βακτηρίων σε τρυβλία με Mueller Hinton II Agar

Έγινε η παρασκευή του Mueller Hinton II Agar σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στους 120oC για 20 λεπτά. Το διάλυμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου μετά την αποστείρωση, έτσι ώστε να φτάσει τους 47oC περίπου και στη συνέχεια, μοιράστηκε σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri, υπό ασηπτικές συνθήκες, πριν στερεοποιηθεί.

Η δημιουργία στερεής καλλιέργειας για κάθε βακτήριο έγινε με τον εξής τρόπο:

Από το stock γλυκερόλης, λαμβάνεται με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου, μικρή ποσότητα βακτηρίων και γίνεται straining σε τρυβλία Petri με θρεπτικό μέσο Mueller Hinton II Agar σε αποστειρωμένο περιβάλλον. Στη συνέχεια, τα τρυβλία τοποθετούνται για επώαση σε κλίβανο στους 37oC για 24 ώρες.

Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται σε κάθε ανεξάρτητο πείραμα.

6.2.4 Υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων με Nutrient Broth

Έγινε η παρασκευή του Nutrient Broth σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στους 120oC για 20 λεπτά. Το διάλυμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου μετά την αποστείρωση, έτσι ώστε να φτάσει τους 47oC περίπου και μοιράστηκε σε αποστειρωμένα πλαστικά φιαλίδια τύπου falcon των 50ml. Σε κάθε πλαστικό φιαλίδιο μπήκαν 5ml υποστρώματος.

Από τα τρυβλία που επώαστηκαν (Mueller Hinton II Agar), γίνεται λήψη μίας αποικίας (μία από τον *S. aureus* και μια από την *Ps. aeruginosa*), με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου. Στη συνέχεια, γίνεται εμφύσηση του κρίκου ώστε να επιτευχθεί ενοφθαλμισμός με το υγρό υπόστρωμα. Τέλος, τα δείγματα επώαστηκαν υπό ανάδευση στους 37 oC για 24h στις 210 στροφές, στον επωαστήρα mrc orbital shaker incubator.

Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνονταν σε κάθε ανεξάρτητο πείραμα.

6.2.5 Παρασκευή διαλύματος crystal violet 0,4% v/v.

Αρχικά, ζυγίστηκε 1gr σκόνης crystal violet, το οποίο προστέθηκε σε διάλυμα 2ml αιθανόλης και 98ml απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια, 8ml από το υπάρχον διάλυμα, αραιώθηκαν με 12ml απιονισμένου νερού με αποτέλεσμα να επιτευχθεί τελική αραιώση 0,4% v/v.

6.2.6 Πειραματική διαδικασία

6.2.6.1 Πρώτο στάδιο

Αρχικά, έγινε αραιώση 50% v/v στα δείγματα μελιού με διάλυμα PBS σε erpendorfs. Έπειτα, έγινε αραιώση της καλλιέργειας στο 1/10. Δηλαδή, αραιώθηκαν 100μl καλλιέργειας (*S. aureus* ή *Ps. aeruginosa*) με 900μl LB + 2% glucose. Στη συνέχεια, προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα δείγματος (μελιού), υποστρώματος (LB + 2% glucose) και καλλιέργειας στη μικροπλάκα, ώστε κάθε κελί να περιέχει τελικό όγκο 200μl και την επιθυμητή συγκέντρωση μελιού.

Για παράδειγμα: Για αραιώση 1% χρησιμοποιήθηκαν: 10μl καλλιέργειας και 4μl διάλυμα μελιού και 186μl LB + glucose.

Έπειτα, η μικροπλάκα επώαστηκε στους 37 οC για 48h.

Οι συγκεντρώσεις μελιού που διερευνήθηκαν ήταν οι εξής: για τον *S. aureus* 1% v/v, 2% v/v, 3% v/v και 4% v/v και για την *Ps. aeruginosa* 2% v/v, 4% v/v, 6% v/v και 8% v/v.

Εκτός από τα δείγματα μελιού, σε κάθε ανεξάρτητο πείραμα, έγινε διερεύνηση της δημιουργίας βιοϋμένα και για το συνθετικό μέλι (για τις ίδιες συγκεντρώσεις), αλλά και για δείγμα χωρίς μέλι (με καλλιέργεια και υπόστρωμα). Το δείγμα χωρίς μέλι χρησιμοποιήθηκε ως θετικό control.



Εικόνα 6-1: Μικροπλάκα στο πρώτο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας

6.2.6.2 Δεύτερο στάδιο

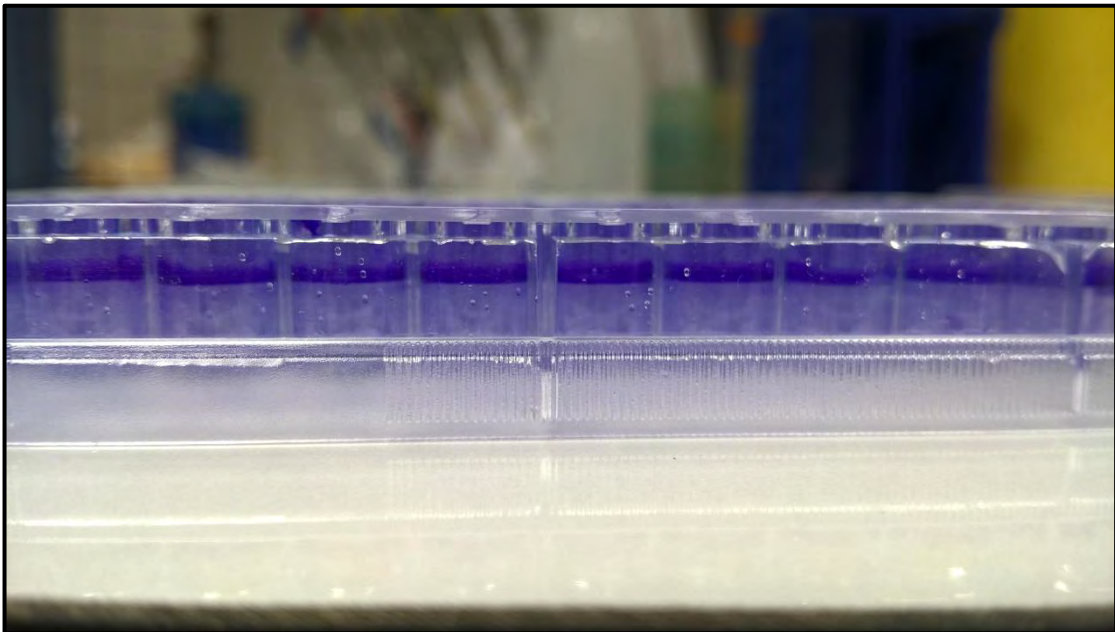
Μετά την επώαση της μικροπλάκας, έχει γίνει η ανάπτυξη των βιοϋμένων μέσα στα κελιά. Για να μπορέσει να γίνει η διερεύνηση της δημιουργίας των βιοϋμένων πρέπει να ακολουθηθούν τα εξής βήματα:

1. Απόρριψη του περιεχομένου των κελιών της μικροπλάκας.
2. Έκπλυση τρεις φορές με 200μl διαλύματος PBS.
3. Μονιμοποίηση με 200μl μεθανόλη για 15 λεπτά. Η μονιμοποίηση γίνεται με σκοπό να παραμείνουν οι βιοϋμένες που έχουν δημιουργηθεί από τα βακτήρια.
4. Απόρριψη της μεθανόλης και στέγνωμα της μικροπλάκας στους 37 οC για 20 λεπτά.
5. Χρώση με χρωστική crystal violet 0,4% για 15 λεπτά.
6. Απόρριψη της χρωστικής, έκπλυση με νερό και στέγνωμα. Σε αυτό το σημείο οι βιοϋμένες γίνονται ορατοί λόγω της χρώσης. Ο *S. aureus* σχηματίζει

βιοϋμένα στον πάτο των κελιών ενώ η *Ps. aeruginosa* σχηματίζει ένα δαχτυλίδι στα τοιχώματα των κελιών.

7. 200μl οξικού οξέως 30% για 15 λεπτά. Σε αυτό το σημείο διαλύεται ο βιοϋμένας που έχει σχηματιστεί με τη χρωστική και δημιουργείται ένα διάλυμα.
8. Καλή ανάδευση του διαλύματος που περιέχουν τα κελιά (οξικό οξύ με τη χρωστική που έχει μείνει) με αυτόματη πιπέτα.
9. Μεταφορά του περιεχομένου της μικροπλάκας σε νέα μικροπλάκα.
10. Μέτρηση της απορρόφησης σε microplate reader (ELx808 Absorbance Microplate Reader, BioTek), συνδεδεμένο με έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η μέτρηση έγινε στα 630 nm. Η ανάλυση των οπτικών απορροφήσεων των καλλιιεργειών έγινε με το λογισμικό Gen5™ Data Analysis Software (BioTek).

(Christensen GD et al., 1985 & Stepanovic et al., 2000)



Εικόνα 6-2: Εμφάνιση βιοϋμένων από *Ps. aeruginosa* μετά από χρώση και έκπτυση

6.2.7 Δοκιμή για το κατάλληλο υπόστρωμα για τη δημιουργία βιοϋμένων

Πριν ληφθεί η απόφαση για το ποιο είναι το κατάλληλο υπόστρωμα για τη δημιουργία των βιοϋμένων, έγιναν ορισμένα πειράματα με διάφορα υποστρώματα.

Τα υποστρώματα που μελετήθηκαν είναι:

- TSB
- TSB + 1% glucose
- LB
- LB + 2% glucose
- NB
- NB + 2% glucose
- BHI + 1% glucose

Κατόπιν μετρήσεων της ανάπτυξης βιοϋμένων με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω, έγινε ξεκάθαρο ότι το υπόστρωμα LB + 2% glucose έδωσε την καλύτερη ανάπτυξη, σε σχέση με τα υπόλοιπα υποστρώματα. Έτσι, τα βασικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν με το υπόστρωμα LB + 2% glucose.

7 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αξίζει να αναφερθεί ότι, στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, έγιναν ορισμένες επαναλήψεις με σκοπό τη λήψη των ορθότερων αποτελεσμάτων. Για το λόγο αυτό, κάθε συγκέντρωση μελιού, μελετήθηκε εις τριπλούν. Επίσης, κάθε ανεξάρτητο πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον 2 φορές.

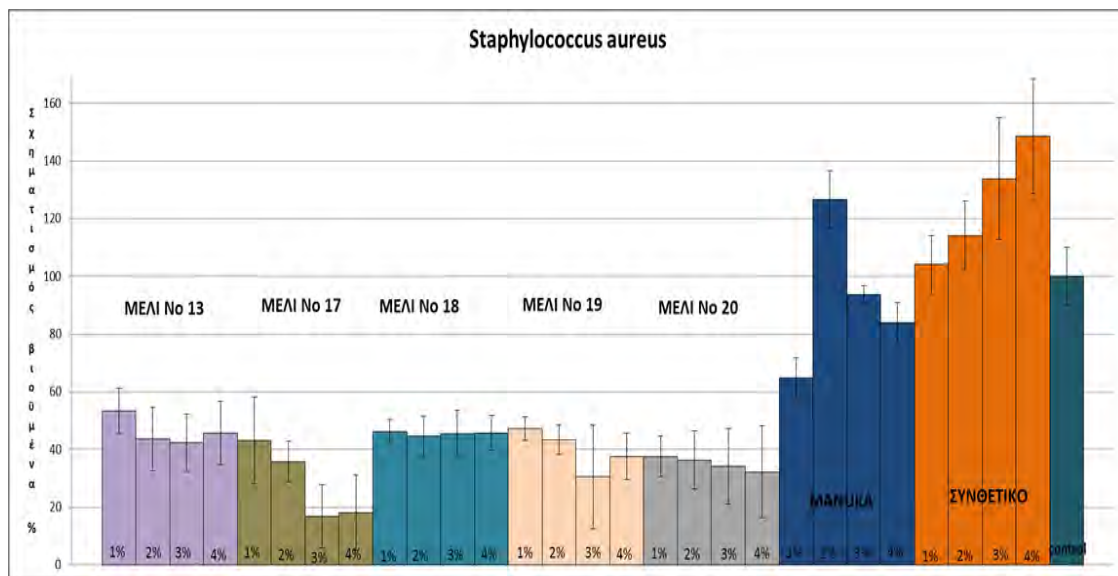
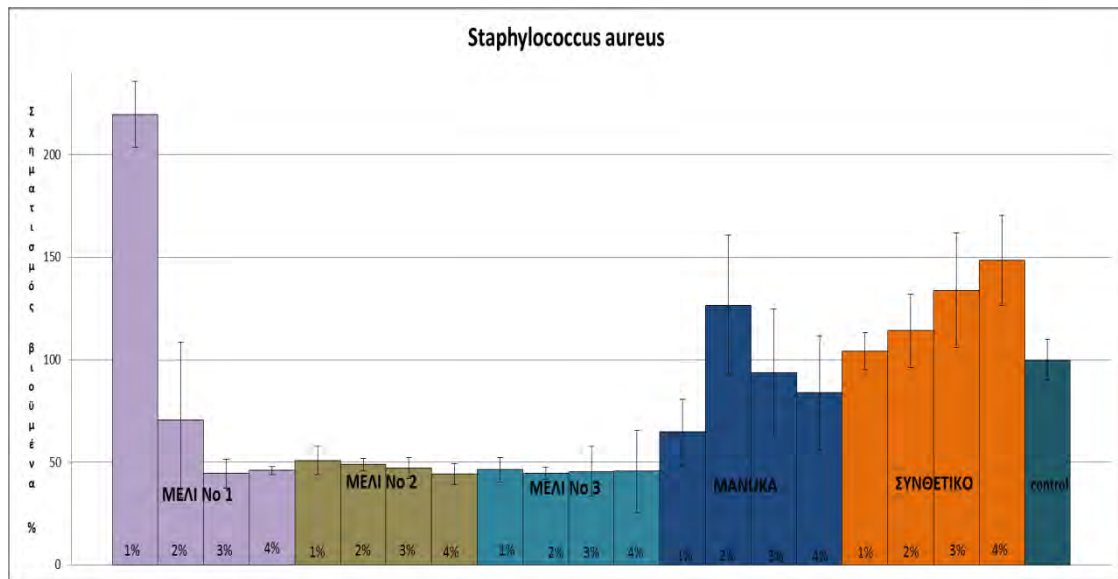
7.1 Αποτελέσματα για τον *Staphylococcus aureus*

Στα αποτελέσματα για τον *Staphylococcus aureus*, παρατηρήθηκε ότι, το συνθετικό μέλι δείχνει να βοηθά την ανάπτυξη των βιοϋμένων. Αυτό συμβαίνει διότι, τα τοιχώματα των βιοϋμένων αποτελούνται από πολυσακχαρίτες, έτσι, όταν τα βακτήρια μπορούν να βρουν πληθώρα αυτών στο περιβάλλον τους, μπορούν να δημιουργήσουν πιο εύκολα τους βιοϋμένες. Αυτό μπορεί να φανεί και από την αύξηση της δημιουργίας βιοϋμένων καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση των σακχάρων του συνθετικού μελιού, από 1% σε 4%.

Επίσης, παρατηρήθηκε μια πολύ σημαντική μείωση του σχηματισμού βιοϋμένα, περίπου στο 40 - 60% σχεδόν σε όλα τα δείγματα μελιών του Ολύμπου που μελετήθηκαν.

Στο μέλι No 1 σε συγκέντρωση 1%, παρατηρήθηκε μια πολύ μεγάλη ανάπτυξη βιοϋμένα. Αυτό συνέβη διότι οι βιοϋμένες, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αποτελούνται από πολυσακχαρίτες, έτσι, τόσο συγκέντρωση σακχάρων, όσο και η ποιοτική τους σύσταση σε ένα μέλι μπορεί να λειτουργήσουν επικουρικά. Επίσης, τα βιοδραστικά μόρια που υπάρχουν στο συγκεκριμένο δείγμα μελιού, δεν φαίνεται να παρουσιάζουν μεγάλη δραστικότητα σε αυτή τη συγκέντρωση.

Τέλος, το μέλι manuka παρουσιάζει μείωση της δημιουργίας βιοϋμένων, αλλά όχι σε τόσο μεγάλο βαθμό όσο τα μέλια της περιοχής του Ολύμπου που μελετήθηκαν.



7.2 Αποτελέσματα για την *Pseudomonas aeruginosa*

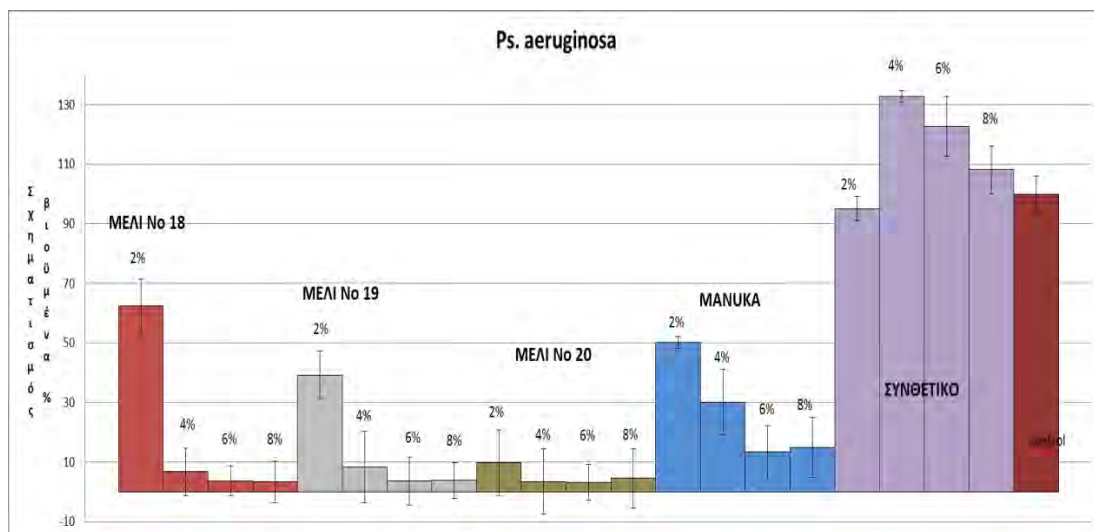
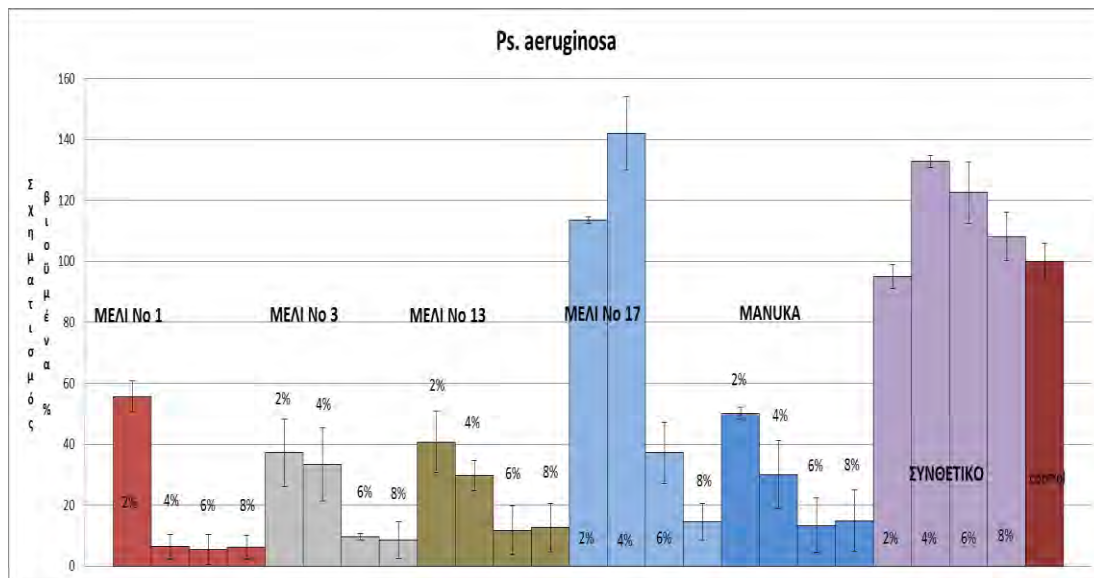
Στα αποτελέσματα για την *Pseudomonas aeruginosa*, για το συνθετικό μέλι, παρατηρείται επίσης μια αύξηση της δημιουργίας βιοϋμένων. Φαίνεται βέβαια, ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης των σακχάρων (από το 4% στο 8%), υπήρξε μικρότερη αύξηση της δημιουργίας βιοϋμένων. Αυτό οφείλεται στην ωσμωτική πίεση, η οποία είναι αρκετά αυξημένη στο συνθετικό μέλι 8% με αποτέλεσμα να δρα ανασταλτικά στη δημιουργία των βιοϋμένων.

Τα μέλια της περιοχής του Ολύμπου, φαίνεται να επιδρούν ανασταλτικά στη δημιουργία βιοϋμένων από το βακτήριο. Εντονότερη δράση παρουσιάζουν οι συγκεντρώσεις 6% και 8%, οι οποίες στα περισσότερα δείγματα δείχνουν να

μειώνουν τη δημιουργία βιοϋμένων κάτω από 20%. Την ίδια περίπου μείωση παρουσιάζει και το μέλι manuka στο συγκεκριμένο βακτήριο.

Το μέλι No 17 δείχνει να ευνοεί τη δημιουργία βιοϋμένων στις συγκεντρώσεις 2% και 4%. Αυτό συμβαίνει διότι, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η δημιουργία βιοϋμένων επηρεάζεται τόσο από τη συγκέντρωση, όσο και από την ποιοτική σύσταση των σακχάρων του μελιού. Επίσης, καθοριστικό ρόλο στην αναστολή των βιοϋμένων παίζει η λειτουργικότητα των βιοδραστικών μορίων.

Τέλος, το μέλι No 20 δείχνει μείωση της δημιουργίας βιοϋμένα κάτω από 10%, από την πρώτη κιόλας αραίωση (2%).



8 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανθεκτικότητα των μικροβίων στα αντιβιοτικά θεωρείται ένα από τα πολύ σοβαρά προβλήματα της δημόσιας υγείας. Τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια αυξάνονται την τελευταία δεκαετία, με αποτέλεσμα διάφορες βακτηριακές λοιμώξεις να γίνονται ανθεκτικές στις θεραπείες των πιο συχνών αντιβιοτικών. Η αύξηση στην ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά είναι αποτέλεσμα της κατάχρησής τους. Η συνεχής χρήση των αντιβιοτικών θέτει σε μεγάλο κίνδυνο τη χρησιμότητα των φαρμάκων που είναι πραγματικά ουσιώδη και χρήσιμα. Η μείωση της αλόγιστης χρήσης των αντιβιοτικών είναι ο καλύτερος τρόπος για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας.

Ένας τρόπος για να περιοριστεί το φαινόμενο αυτό, είναι η χρήση εναλλακτικών μεθόδων για την καταπολέμηση των λοιμώξεων και την ταυτόχρονη στήριξη του ανοσοποιητικού μας συστήματος. Πολλές έρευνες των τελευταίων ετών, επικεντρώνονται στη χρήση εναλλακτικών μεθόδων για τη θεραπεία διάφορων λοιμώξεων και κυρίως στη χρήση του μελιού, καθώς βοηθά στην επούλωση πληγών, εγκαυμάτων και έχει γίνει ιδιαίτερα γνωστό για την αντιμικροβιακή του δράση (Alandejani et al., 2009, Wang et al., 2012). Αναλυτικότερα, διάφορες έρευνες αποδεικνύουν ότι η χρήση μελιού ενάντια σε κλινικά απομονωμένα στελέχη του *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa*, μπορεί να θανατώσει κύτταρα που είναι σε ελεύθερη διαβίωση, σε όλα τα στελέχη που δοκιμάστηκαν (Alandejani et al., 2009). Αυτό που καθιστά το μέλι σημαντικό στη χρήση του για ιατρικούς σκοπούς είναι η ικανότητα του να σκοτώνει τα βακτήρια ακόμη και στην πιο ανθεκτική κατάστασή τους, δηλαδή αφού έχουν δημιουργήσει βιοϋμένες, με αποτέλεσμα να αποδεικνύεται εξαιρετικά αποτελεσματικό στην αντιμετώπιση λοιμώξεων (Wang et al. 2012). Το μέλι που έχει μελετηθεί περισσότερο, είναι το μέλι manuka. Είναι ευρέως γνωστό για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες και τα θετικά αποτελέσματα που δίνει στην παρεμπόδιση της δημιουργίας βιοϋμένων από διάφορα βακτήρια, αλλά κυρίως από τα πιο ευρέως μελετημένα: τον *S. aureus* και

την *Ps. aeruginosa* (Martin Sojka et al., 2016, Rose Cooper et al., 2011, Jing Lu et al., 2014).

Στην παρούσα μελέτη, ελέγχθηκε η αναστολή της δημιουργίας βιομένα από τα βακτηριακά στελέχη *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa* παρουσία μελιών του Ολύμπου σε σύγκριση με το μέλι manuka και το συνθετικό μέλι. Από την ανάλυση των παραπάνω αποτελεσμάτων παρατηρήθηκαν τρία σημαντικά συμπεράσματα, α) σχεδόν όλα τα μέλια Ολύμπου, ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις έδειξαν μείωση της δημιουργίας βιοϋμένα και στα δύο εξεταζόμενα βακτήρια, β) στα δείγματα μελιών του Ολύμπου, η μείωση της δημιουργίας βιοϋμένα από τον *Staphylococcus aureus* ήταν μεγαλύτερη από το μέλι manuka γ) τα μέλια Ολύμπου εμφανίζουν την ίδια περίπου μείωση της δημιουργίας βιοϋμένα από την *Pseudomonas aeruginosa* με το μέλι manuka.

Μια μελλοντική μελέτη θα μπορούσε να ερευνά την αναστολή του βιοϋμένα μετά την δημιουργία του από τα δύο αυτά στελέχη, παρουσία μελιών του Ολύμπου.

Ελληνική

- Γούναρη Σ., 2013. Γνωρίζω τη *Marchalina hellenica* – το γνωστό εργάτη του πεύκου. Available through: <http://www.ellinikomeli.gr/melissokomos/arxarioi-melissokomoi/850-marchalina-hellenica-ergatis-peuko>
- Δερματόπουλος Β., 1977 «Σύγχρονη Πρακτική Μελισσοκομία» Έκδοση Γ' Εκδότης Αγροτικός Οίκος Σπ. Σπ. Σπύρου
- Θρασυβούλου Α., 2005. Η βιολογική αξία του μελιού. Εργαστήριο Μελισσοκομίας-Σηροτροφίας, Σχολή Γεωπονίας, Α.Π.Θ. Available through: <https://www.google.gr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&cad=ria&uact=8&ved=0ahUKEwiJsuL1tvLVAhULtBQKHTPcB5AQFgg4MAM&url=http%3A%2F%2Fclass.uth.gr%2Fclass%2Fmodules%2Fdocument%2Findex.php%3Fcourse%3DSGEA194%26download%3D%2F5541e483wigu%2F5541e5d9R3Vp.pdf&usg=AFQjCNF3gIJmaKSOoOhgtZfKqa3px1Axag>
- Θρασυβούλου Α., Μανίκης Ι., Τανανάκη Χ., Τσέλλιος Δ., Καραμπουρνιώτη Σ., Δήμου Μ., 2002. Η ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΜΕΛΙΟΥ. Α. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΥ ΣΤΗΡΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ. Στο: 1ο Επιστημονικό Συνέδριο Μελισσοκομίας – Σηροτροφίας. Αθήνα, 29 Νοεμβρίου – 1 Δεκεμβρίου 2002. Σελ. 1-24. Available through: <http://beelab.agro.auth.gr/Data%20Files/Arthra/Proioda/Tautotita%20ellinikou%20meliou%20%202013.pdf>
- Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, Άρθρο 67, 2016 «Μέλι»
- Λίβερη Αγγελική. Πρακτικά ΣΤ' τριήμερο εργασίας ΠΤΙ ΕΤΒΑ, 2000
- Μπίκος Θανάσης, 1991. «Όλα για το μέλι». Έκδοση Α'
- Οδηγία 2001/110EC της Ευρωπαϊκής Ένωσης
- Παπαρίζος Β. Η κλινική σημασία της εκρίζωσης του σταφυλοκόκκου από θέσεις αποικισμού. Ελλ. Επιθ. Δερμ. Αφρ. 24:2 121-132, 2013.

- Σάνδαλου Γ., Μενκίσογλου-Σπυρούδη Ο., Διαμαντίδης Γρ., Θρασυβούλου Α., 2002. Αντιοξειδωτική και αντιβακτηριακή δράση διαφόρων ελληνικών μελιών. Στο: 1ο Επιστημονικό Συνέδριο Μελισσοκομίας – Σηροτροφίας. Αθήνα, 29 Νοεμβρίου – 1 Δεκεμβρίου 2002. Σελ. 25-38.
- Το μέλι από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα. Available through: melissokomianet.gr
- Χαριζάνης Πασχάλης, 1993 «Μέλισσα και Μελισσοκομική Τεχνική)

Ξένη

- Adams, C.J., Boulton, C.H., Deadman, B.J., Farr, J.M., Grainger, M.N., Manley-Harris, M. and Snow, M.J., 2008. Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr Res*; 343:651–659.
- 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.* 141,14-118.
- Allie Clinton and Tammy Carter (2015). Chronic Wound Biofilms: Pathogenesis and Potential Therapies. *Lab Med Ffalalll* 2015;46:277-284.
- Amin Omar , J. Barry Wright , Gregory Schultz , Robert Burrell and Patricia Nadworny (2017). Microbial Biofilms and Chronic Wounds.
- Andrew J. McBain , David Allison & Peter Gilbert (2000) Emerging Strategies for the Chemical Treatment of Microbial Biofilms, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 17:1, 267-280.
- Anthimidou, E. and Mossialos, D., 2013. Antibacterial Activity of Greek and Cypriot Honeys Against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in Comparison to Manuka Honey. *JOURNAL OF MEDICINAL FOOD*. *Journal of Medicinal Food*. 16(1): 42-47
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic

tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology* 22:996–1006.

- Clement Henri , 2007 «Σύγχρονη Μελισσοκομία», Εκδόσεις Ψυχάλου
- Eva Crane, 1999. *The world History of Beekeeping and honey hunting*
- Frankel S., Robinson GE, Berenbaum MR. (1998) Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *J. Apic. Res.* 37(1):27-31
- Halliwell B, “Free Radicals and other reactive species in Disease”, National University of Singapore, 2001
- HARMAN D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956, 11:298–300
- Herold, 1970 *Heilwerte aus dem Bienenvolk*, Θεραπευτικές αξίες από το μελίσι Munchen
- J. William Costerton, K.-J. Cheng, Gill G. Geesey, Timothy I. Ladd, J. Curtis Nickel, Mrinal Dasgupta, Thomas J. Marrie (1987). *Bacterial Biofilms in Nature and Disease*. *Ann. Rev. Microbiol.* 1987. 41:435~4.
- Jeremy M. Yarwood, Douglas J. Bartels, Esther M. Volper and E. Peter Greenberg. Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Journal of Bacteriology*, Mar. 2004, p. 1838–1850.
- Jing Lu, Lynne Turnbull, Catherine M. Burke, Michael Liu, Dee A. Carter, Ralf C. Schlothauer, Cynthia B. Whitchurch and Elizabeth J. Harry (2014). Manuka-type honeys can eradicate biofilms produced by *Staphylococcus aureus* strains with different biofilm-forming abilities. *PeerJ* 2:e326; DOI 10.7717/peerj.326.
- 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.
- Jonathan McD C Stephens (2006). The factors responsible for the varying levels of UMF® in mānuka (*Leptospermum scoparium*) honey.
- Krell R., 1996 “VALUE-ADDED PRODUCTS FROM BEEKEEPING” FAO AGRICULTURAL SERVICES BULLETIN No. 124.
- Kwakman, P and Zaat Sebastian A. J. (2012). Antibacterial Components of Honey. *Life*, 64(1): 48–55.

- 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.
- Lyczak, J.B.; Cannon, C.L.; Pier, G.B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: Lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.* 2000, 2, 1051–1060.
- Mahmud Masalha, Ilya Borovok, Rachel Schreiber, Yair Aharonowitz, and Gerald Cohen. Analysis of Transcription of the *Staphylococcus aureus* Aerobic Class Ib and Anaerobic Class III Ribonucleotide Reductase Genes in Response to Oxygen. *J Bacteriol.* 2001 Dec; 183(24): 7260–7272.
- Martin Sojka, Ivana Valachova, Marcela Bucekova and Juraj Majtan. 2016. Antibiofilm efficacy of honey and bee-derived defensin-1 on multispecies wound biofilm. *Journal of Medical Microbiology* , 65, 337–344.
- Mette Burmølle, Jeremy S. Webb, Dhana Rao, Lars H. Hansen, Søren J. Sørensen and Staffan Kjelleberg. Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms. *Applied And Environmental Microbiology*, June 2006, p. 3916–3923.
- Ministry for Primary Industries, New Zealand, (2014) “Interim Labelling Guide for Mānuka Honey”
- Molan PC. 1992 The antibacterial activity of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World* 1992; 73:5-28
- Nicola C. Reading & Vanessa Sperandio (2005). Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 254 (2006) 1–11.
- Pierre Jean-Prost, (1980). «Μελισσοκμία» Εκδόσεις Ψιχάλου.
- Rodney M. Donlan and J. William Costerton. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, Apr. 2002, p. 167–193.
- 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, BMC Complementary and Alternative Medicine 2010, 10:47

- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of Microbiological Methods 40:175–179.
- Stephens JM, Schlothauer RC, Morris BD, Yang D, Fearnley L, Greenwood DR, Loomes KM. 2009. Phenolic compounds and methylglyoxal in some New Zealand Manuka and Kanuka honeys. Food Chemistry 120:78–86 DOI 10.1016/j.foodchem.2009.09.074.
- Steven Y. C. Tong, Joshua S. Davis, Emily Eichenberger, Thomas L. Holland, Vance G. Fowler, Jr. Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. Clin Microbiol Rev doi:10.1128/CMR.00134-14.
- Wadhan H. (1998) Causes of the antimicrobial activity of honey. 26(1): 26-31.
- Wang, R., Starkey, M., Hazan, R and Rahme, L. (2012). Honey 's ability to counter bacterial infection arises from both bacterial compounds an QS inhibition. Frontiers in Microbiology 3 (144), 1-8.
- White J.W. Jr, 1993 Honey, in the hive and the honey bee, Dadant and Sons Publication Hamilton-Illinois p. p. 869 – 895.
- 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 glucoseoxidase system. Biochim Biophys Acta, 73:57-70.
- Winston L Mark (1987), The Biology of the honey bee, Harvard University Press Cambridge Massachusetts London England p.p.281
- Yiannakopoulou E. Oxidative stress – antioxidant mechanisms: Clinical implications. Archives of Hellenic Medicine 2009, 26(1):23–35
- Zanber E., Maurizio A., 1984 Der Honig ulmer Verlag Stuttgart.
- HALLIWELL B. Oxidants and human disease: Some new concepts. FASEB J 1987, 1:358

Internet

- <http://melissokomianet.gr/meli-elatou/>
- <http://melissokomianet.gr/meli-kastanias/>
- http://www.honey-center.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=64&Itemid=59&lang=
- <http://melissokomianet.gr/polykompos-polygonum/>
- <http://melissokomianet.gr/koumaria-albutus-unedo/>
- https://en.wikipedia.org/wiki/Mānuka_honey
- <https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%8C%CE%BB%CF%85%CE%BC%CF%80%CE%BF%CF%82#%CE%A7%CE%BB%CF%89%CF%81%CE%AF%CE%B4%CE%B1>
- https://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus
- https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9B%CE%BF%CE%B9%CE%BC%CF%8E%CE%B4%CE%B7%CF%82_%CE%B5%CE%BD%CE%B4%CE%BF%CE%BA%CE%B1%CF%81%CE%B4%CE%AF%CF%84%CE%B9%CE%B4%CE%B1#%CE%A0%CE%B1%CE%B8%CE%BF%CE%B3%CE%AD%CE%BD%CE%B5%CE%B9%CE%B1