

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

*«ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΤΥΠΩΝ ΜΕΛΙΟΥ : ΠΟΣΟ  
ΑΣΦΑΛΗ ΕΙΝΑΙ»*

*ΠΑΠΑΕΥΑΓΓΕΛΟΥ ΦΩΤΕΙΝΗ*

Μέλη Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής :

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

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

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

**ΛΑΡΙΣΑ, 2011**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα επίκουρο καθηγητή κύριο Μόσιαλο Δημήτριο, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, την βοήθεια και την καθοδήγησή του, στην εκτέλεση του πειράματος και στη σύνταξη της συγγραφής του.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, κύριο Μαρκουλάτο Παναγιώτη, καθηγητή του Π. Θ. και στο κύριο Καρούζα Δημήτριο, επίκουρο καθηγητή του Π. Θ., για τις χρήσιμες υποδείξεις τους στην μεταπτυχιακή εργασία.

Πολλές ευχαριστίες προς το προσωπικό του εργαστηρίου ιολογίας και μικροβιολογίας, για την βοήθειά τους στην υλοποίηση του πειράματος.

Ιδιαίτερα, ευχαριστώ ολόψυχα τους γονείς μου και το Δημήτρη, για την αμέριστη ηθική και οικονομική τους στήριξη σε όλη την διάρκεια της προπτυχιακής και μεταπτυχιακής μου διαδρομής σαν φοιτήτρια και για την συμβολή τους στην επιτυχία των προσπαθειών μου.

Τέλος θα ήταν λάθος μου να ξεχάσω να ευχαριστήσω τον άνθρωπο που με ώθησε να ακολουθήσω αυτό το μεταπτυχιακό πρόγραμμα, τον κύριο Π. Χ. Λόλα, καθηγητή ζιζανιολογίας, της σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του τμήματος Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

*Στους γονείς μου,*

*Γιώργο και Βασιλική*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σύμφωνα με την Νομοθεσία (Οδηγία 2001/110 ΕΚ του συμβουλίου της Ε.Ε. στις 20 Δεκεμβρίου 2001) Μέλι είναι η φυσική γλυκιά ουσία που παράγουν οι Μέλισσες του είδους *Apis Mellifera* από το νέκταρ των φυτών ή εκκρίσεις από ζωντανά μέρη των φυτών ή εκκρίματα εντόμων που οι μέλισσες συλλέγουν , μεταποιούν εμπλουτίζουν με δικές τους ουσίες που συντελούν στην μετατροπή του, αποθέτουν, αφυδατώνουν, αποθηκεύουν και το φυλάσσουν στις κηρήθρες της κυψέλης προκειμένου να ωριμάσει.

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

Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η μικροβιακή ποιότητα των ελληνικών τύπων μελιού και κατά πόσο αυτά είναι ασφαλή για τον καταναλωτή.

Χρησιμοποιήθηκαν 31 δείγματα μελιού από διάφορες περιοχές Ελλάδας και Κύπρου. Τα δείγματα ήταν από διαφορετικά είδη φυτών και η παραγωγή τους έγινε το 2009 – 2010.

Ποσοτικοποιήθηκε το συνολικό βακτηριακό φορτίο (αερόφιλα, μεσόφιλα βακτήρια) καθώς και το φορτίο μυκήτων και παράλληλα ελέγχθηκε η παρουσία εντεροβακτηρίων. Επιπλέον απομονώθηκαν Gram θετικά βακτήρια από ειδικό θρεπτικό υπόστρωμα. Ακολούθησε απομόνωση χρωμοσωμικού DNA και με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), ενισχύθηκε το 16S rRNA γονίδιο. Τα προϊόντα της PCR αλληλουχγήθηκαν και αναλύθηκαν προκειμένου να γίνει η ταυτοποίηση των Gram θετικών βακτηρίων .

Ο βακτηριακός φόρτος των δειγμάτων κυμαίνεται από 7 cfu/gr έως 156 cfu/gr και το φορτίο των μυκήτων από 6 cfu/gr έως 27 cfu/gr. Εξαίρεση αποτελεί το μέλι πολυκόμπου, στο οποίο ανιχνεύθηκαν μύκητες της τάξεως 773 cfu/gr. Κάποια μέλια δεν εμφάνισαν καμία αποικία βακτηρίων ή μυκήτων. Το μέλι από καστασιά, από

πολύκομπο και έλατο βανίλια μαινάλου δεν εμφάνισαν καμία αποικία βακτηρίων. Ενώ το μέλι από ρείκι κωνοφόρο, από κουμαριά, από μάραθο, από καστανιά και από 2 ανθόμελα, δεν παρουσίασαν καμία αποικία μυκήτων. Σε κανένα από τα μέλια δεν ανιχνεύθηκαν εντεροβακτήρια. Με την μέθοδο της PCR ταυτοποιήθηκε η παρουσία του *Staphylococcus spp.* και του *Bacillus spp.*

## Abstract

According to the legislation (instruction 2001/110 EK the council of EE on 20 December 2001) honey is the natural sweet substance that produce the bees of the kind *Apis Mellifera* from the nectar of the plants or secretions of the insects that bees collect, alter, enrich with their substances that contribute to its conversion, deposit, dehydrate, store up and keep it in the honeycomb so as to mature.

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

In the present project rated the microbial quality of the Greek kind honey and how safe they are for their consumption of the human.

They have used 31 samples of honey from different areas of Greece and Cyprus. The samples were from different kind of plants and their production became in 2009-2010.

Quantified the total bacterial load (aerophilic, mesophilic bacterial) as and the load of the fungus and simultaneously checked up the presence of enterobacter. Besides isolated Gram positive bacteria of special nutritious substratum. Then became isolation chromosomal DNA and with the method of chain reaction polymerasis (PCR) reinforced the 16s rRNA. The products of PCR cohered and analyzed so as to become the identification of Gram positive bacteria.

The bacterial load of samples ranging from 7 cfu / gr up to 156 cfu / gr and the load of fungi from 6 cfu / gr up to 27 cfu / gr. The exception is knotweed honey in which fungi were detected in approximately 773 cfu / gr. Some honeys showed no colony of bacteria or fungi. The honey from chestnut fir, knotweed and by vanilla Mainalon showed no bacterial colony. While the honey from conifer Heath, from strawberry from fennel, chestnut and 2 flower honeys, showed no fungal colony. In none of the honeys were not detected enterobacteria. With the PCR method identified the presence of *Staphylococcus spp.* and *Bacillus spp.*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
Abstract.....	6
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1. Η ιστορία του ελληνικού μελιού.....	9
1.2. Θρεπτική αξία του μελιού και των προϊόντων του.....	9
1.3. Παραγωγή μελιού.....	11
1.3.1. Η γλώσσα των μελισσών.....	11
1.3.2. Σχέσεις μελισσών από διαφορετικά μελίσσια.....	11
1.3.3. Διάρκεια ζωής.....	12
1.3.4. Αναπαραγωγή.....	12
1.3.5. Αναζήτηση τροφής.....	13
1.3.6. Πώς οι μέλισσες φτιάχνουν το μέλι.....	13
1.4. Είδη μελιού.....	14
1.5. Προϊόντα μέλισσας.....	15
1.6. Στατιστικά δεδομένα για την παραγωγή μελιού σε Ελλάδα και Ε.Ε.....	18
1.7. Τύποι Ελληνικού μελιού.....	20
1.8. Αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση του μελιού.....	26
1.8.1. Βακτηριοκτόνος δράση του ελληνικού μελιού.....	27
1.8.2. Βιολογικό μέλι MANUKA.....	27
1.8.3. Αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση του μελιού.....	28
1.9. Μικροβιακή ποιότητα διαφόρων τύπων μελιού σε προηγούμενες μελέτες.....	29
1.10. Μπορεί το μέλι να δημιουργήσει προβλήματα στον ανθρώπινο οργανισμό; .....	31
1.11. Σκοπός της εργασίας.....	33
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	34

2.1. Δείγματα μελιών.....	34
2.2. Μέτρηση αερόφιλων μεσόφιλων βακτηρίων.....	34
2.3. Μέτρηση μυκήτων.....	36
2.4. Ανίχνευση εντεροβακτηρίων .....	37
2.5. Απομόνωση <i>B.cereus</i> και άλλων Gram-θετικών βακτηρίων.....	38
2.6. Διαδικασία καλλιέργειας των Gram-θετικών βακτηρίων και απομόνωση χρωμοσωμικού DNA .....	40
2.6.1. Stock γλυκερόλης.....	40
2.6.2. Πρωτόκολλο απομόνωσης χρωμοσωμικού DNA κατά Spilker.....	41
2.6.3. Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανά δείγμα .....	41
2.6.4. Συμβολισμός δειγμάτων.....	42
2.7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	42
2.8. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	46
2.9. Καθαρισμός προϊόντων PCR.....	47
2.10. Αλληλούχιση του 16S rRNA γονιδίου και ανάλυση των αλληλουχιών.....	47
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	49
3.1. Καταμέτρηση βακτηριακών αποικιών.....	49
3.2. Καταμέτρηση φορτίου μυκήτων.....	52
3.3. Ανίχνευση εντεροβακτηρίων.....	54
3.4. Απομόνωση Gram θετικών και αποελέσματα ταυτοποίησής τους.....	55
3.5.Μοριακή ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών.....	56
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	64
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	66
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....	71



## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.1. Η ιστορία του ελληνικού μελιού**

Η ιστορία του μελιού ξεκινά από τους αρχαίους χρόνους, όπου κατείχε ξεχωριστή θέση. Αντιμετωπιζόταν σαν φυσικό και υγιεινό προϊόν, απαραίτητο στοιχείο της διατροφής και όχι συμπλήρωμα. Από αποσπασματικές πληροφορίες για τη σύνθεση των γευμάτων των αρχαίων Ελλήνων βλέπουμε ότι το μέλι περιλαμβάνεται στο καθημερινό διαιτολόγιο τους είτε μόνο του, είτε σαν ύλη παρασκευής σε σάλτσες και άλλα (Larson, 2001).

Το αρχαιότερο πρόσωπο το οποίο εμφανίζεται στο χώρο της μελισσοκομίας είναι ο Αρίσταιος, γιος του Απόλλωνα και της νύμφης Κυρήνης, που ανατράφηκε, σύμφωνα με τον μύθο, με νέκταρ και αμβροσία για να γίνει αθάνατος (Bryant, 1766).

Στους ιστορικούς χρόνους συναντούμε συγγράμματα του Ιπποκράτη, του Αριστοτέλη και του Δημόκριτου που αναφέρονται στις ευεργετικές ιδιότητες του μελιού στην υγεία και τη μακροζωία, ενώ ο Πυθαγόρας και οι οπαδοί του είχαν το μέλι ως την κύρια τροφή τους. Πίστευαν πως έχει αντισηπτικές και φαρμακευτικές ιδιότητες και για αυτό το λόγο αυτόν το χρησιμοποιούσαν για να ταριχεύουν τους νεκρούς τους. Αναφέρεται δε πως η σωρός του Μεγάλου Αλέξανδρου ταριχεύτηκε με αυτό τον τρόπο (Larson J., 2001).

### **1.2. Θρεπτική αξία του μελιού και των προϊόντων του**

Το μέλι περιέχει :

#### ***Υδατάνθρακες***

Το βασικό συστατικό του μελιού είναι οι υδατάνθρακες σε ποσοστό που κυμαίνεται από 70-80%. Οι δύο βασικοί υδατάνθρακες είναι η φρουκτόζη και η γλυκόζη, σε ίση περίπου αναλογία. Στο μέλι υπάρχουν και άλλοι υδατάνθρακες σε μικρότερες ποσότητες (Σταθόπουλος, 1993).

#### ***Νερό***

Το νερό κυμαίνεται κατά μέσο όρο στο 16-17%. Η περιεκτικότητα του μελιού σε νερό εξαρτάται από τις κλιματολογικές συνθήκες στη χώρα παραγωγής του. Στην Κύπρο λόγω του θερμού κλίματος, τα μέλια έχουν πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό, γι αυτό και είναι παχύρευστα (Σταθόπουλος, 1993).

### ***Μέταλλα και ιχνοστοιχεία***

Στο μέλι υπάρχουν κατά μέσο όρο 0,17% μέταλλα και ιχνοστοιχεία. Τα βασικότερα είναι το κάλιο, νάτριο, ασβέστιο, φώσφορος και μαγνήσιο (Σταθόπουλος, 1993).

### ***Βιταμίνες***

Το μέλι περιέχει ελάχιστες ποσότητες βιταμινών κυρίως Α1, Β1, Β6, Β12, C, D και Ε (Σταθόπουλος, 1993).

### ***Πρωτείνες και αμινοξέα***

Το μέλι περιέχει πολύ μικρές ποσότητες πρωτεϊνών και ελεύθερων αμινοξέων (Σταθόπουλος, 1993).

### ***Ένζυμα***

Τα ένζυμα βρίσκονται στο μέλι σε μικρές ποσότητες. Παράγονται σχεδόν στο σύνολό τους από τους αδένες των μελισσών, και είναι αυτά που μετατρέπουν το νέκταρ και το μελίτωμα των φυτών σε μέλι (Σταθόπουλος, 1993).

Το μέλι είναι το προϊόν που παράγουν οι μέλισσες από το νέκταρ ή τα διάφορα μελιτώματα φυτών και αποτελεί μια πολύτιμη φυσική θρεπτική τροφή, αναπόσπαστο στοιχείο της μεσογειακής διαίτας. Το μέλι δεν είναι μια απλή φυσική γλυκαντική ουσία. Αποτελείται κυρίως από απλά ζάχαρα αλλά και από πλήθος άλλων στοιχείων. Ανιχνεύτηκαν και πιστοποιήθηκαν 182 διαφορετικές ουσίες (Winston, 1987).

Περιέχει κυρίως τους υδατάνθρακες γλυκόζη και φρουκτόζη, οι οποίοι είναι απλά ζάχαρα και αφομοιώνονται αμέσως από τον οργανισμό μας. Γι'αυτό το μέλι δεν επιβαρύνει το συκώτι και δεν επηρεάζει άλλα όργανα. Το μέλι είναι φυσικό γλυκαντικό με μεγάλη γλυκαντική δύναμη λόγω της φρουκτόζης και μετατρέπεται αμέσως σε ενέργεια λόγω της γλυκόζης (σε 15 λεπτά περνά στο αίμα). Δυναμώνει και τονώνει τον οργανισμό σε περίπτωση κόπωσης σωματικής ή πνευματικής, ανάπτυξης και ανάρρωσης, γιατί εμπλουτίζει άμεσα το αίμα με γλυκόζη και έτσι αποτελεί ένα φυσικό τονωτικό του οργανισμού. Είναι μια πλούσια και άμεσης ενέργειας τροφή για παιδιά, εγκύους, αθλητές, αρρώστους που βρίσκονται σε ανάρρωση καθώς και για άτομα με υψηλή σωματική ή πνευματική εργασία (National Honey Board, 2010).

Το μέλι αποδείχθηκε πολύ ωφέλιμο προϊόν για τη διαίτα του παιδικού οργανισμού. Σε έρευνες διαπιστώθηκε ότι η διατροφή με μέλι αύξησε την αιμοσφαιρίνη του αίματος των παιδιών και αύξησε το βάρος τους χωρίς να παρατηρηθεί παράλληλα αύξηση του ζαχάρου στο αίμα ή της οξύτητας στο ουρικό οξύ. Διαπιστώθηκε ακόμη ότι φάρμακα σε συνδυασμό με μέλι, προκάλεσαν καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα. Τα υπάρχοντα στο μέλι κάλιο,

φώσφορος, φολικό οξύ και παντοθενικό οξύ βοηθούν στην ανάπτυξη του οργανισμού. Η πληθώρα των ιχνοστοιχείων του μελιού πιθανώς συμπληρώνει ελλείψεις της διαίτας σε άτομα που δεν διατρέφονται καλά, καθώς επίσης και σε ηλικιωμένα άτομα. Εκατό γραμμάρια μέλι παρέχουν στον άνθρωπο 315 θερμίδες. Τέλος πολλοί αποδίδουν τη μακροζωία τους στην συστηματική διατροφή τους με μέλι (Μπίκος, 1991).

### **1.3. Παραγωγή μελιού**

Η κοινωνία των μελισσών αποτελείται από τη βασίλισσα, τις εργάτριες και τους κηφήνες. Ο ρόλος της βασίλισσας είναι να γεννά αυγά και παρά το όνομά της ούτε διοικεί ούτε επιβάλλεται. Οι εργάτριες την ταΐζουν κατευθείαν στο στόμα και κάνουν όλες τις δουλειές μέσα και έξω από την κυψέλη (Root, 1983).

Οι κηφήνες παράγουν θερμότητα και ζεσταίνουν το γόνο, αερίζουν την κυψέλη το καλοκαίρι κουνώντας τα φτερά τους. Διαμοιράζουν το νέκταρ και γονιμοποιούν τη βασίλισσα. Δεν είναι λοιπόν οι “τεμπέληδες εραστές” όπως συνήθως πιστεύουμε, αλλά ο ρόλος τους είναι σημαντικός (Τσέλλιος και Θρασυβούλου, 1989).

#### **1.3.1. Η γλώσσα των μελισσών**

Οι μέλισσες συνεννοούνται μεταξύ τους με χορό, συχνά με σπαρταριστό ρυθμό, ηχητικές εκπομπές και οσμές (Θρασυβούλου, 1996).

#### **1.3.2. Σχέσεις μελισσών από διαφορετικά μελίσσια**

Οι μέλισσες δεν δέχονται ξένη μέλισσα ή βασίλισσα μέσα στην κυψέλη τους. Οι φύλακες που προστατεύουν την είσοδο την αντιλαμβάνονται αμέσως, την πλησιάζουν, την ψάχνουν με τις κεραίες τους και την πετούν έξω από την κυψέλη ή την σκοτώνουν με το κεντρί τους, αν επιμένει να μπει. Εξαίρεση κάνουν για τους κηφήνες, που είναι καλοδεχούμενοι σε όποια κυψέλη κι αν μπου, καθώς και για τις μέλισσες, που με γεμάτο τον πρόβολο με νέκταρ και τα πόδια από γύρη, μπαίνουν κάποτε κατά λάθος σε ξένη κυψέλη και γίνονται δεκτές φιλικά (Υφαντίδη, 1983).

### **1.3.3. Διάρκεια ζωής**

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

### **1.3.4. Αναπαραγωγή**

Όταν εκκολαφθεί από το βασιλικό κελί ή βασιλοκύτταρο η βασίλισσα τις πρώτες 2-3 μέρες περιφέρεται μέσα στην κυψέλη σαν ξένη, αδιάφορη για τις μέλισσες που την τριγυρίζουν, όπως και εκείνες είναι αδιάφορες για τη νέα βασίλισσα, την οποία ούτε περιποιούνται ούτε την τρέφουν. Την τρίτη μέχρι την πέμπτη ημέρα από την εκκόλαψή της, εφόσον ο καιρός είναι καλός, ηλιόλουστη ημέρα χωρίς άνεμο, βγαίνει στη σανίδα πτήσεως της κυψέλης και κάνει μερικές δοκιμαστικές πτήσεις διαγράφοντας κύκλους μπροστά στην κυψέλη, χωρίς να απομακρυνθεί περισσότερο από δύο τρία μέτρα, με το κεφάλι πάντα γυρισμένο προς την κυψέλη, σηματοδύοντας τη θέση της κυψέλης της σε σχέση με τα αντικείμενα που την περιτριγυρίζουν. Όταν έπειτα από αλλεπάλληλες τέτοιες πτήσεις χαράζει στο μνημονικό της την τοποθεσία της κυψέλης της, τότε ξεκινά με ορμή για το γαμήλιο ταξίδι και αμέσως τρέχουν κατόπι της οι κηφήνες της κυψέλης και των άλλων κυψελών, όσοι πετούν στην περιοχή εκείνη, προσελκόμενοι από την ουσία που εκκρίνουν οι σιαγονικοί αδένες της βασίλισσας. Το ζευγάρι με τον κηφήνα γίνεται πετώντας ψηλά στον αέρα. Η βασίλισσα ζευγαρώνει με τον πρώτο κηφήνα που την πλησιάζει από τους πολλούς που την κυνηγούν και αυτός φυσικά θα είναι ο πιο ταχύς και ο πιο δυνατός για να μπορέσει να την φτάσει στο φρενιασμένο πέταγμά της. Πάντως το τίμημα της επιτυχίας του κηφήνα να γονιμοποιήσει τη βασίλισσα είναι ο θάνατος, γιατί στο ζευγάρι αποσπώνται τα γεννητικά του όργανα και πέφτει νεκρός από τον ακρωτηριασμό. Μετά το γαμήλιο πέταγμα η βασίλισσα επιστρέφοντας στην κυψέλη της καθαρίζεται από τις μέλισσες, ακολουθεί ανάπαυση 48 ωρών και αμέσως κατόπιν αρχίζει να γεννά. όταν γεννήσει 80 με 100 αυγά σταματά λίγα λεπτά για να ξεκουραστεί και να πάρει τροφή. Τότε αμέσως οι μέλισσες που την περιτριγυρίζουν την χαϊδεύουν με τις κεραίες τους και την τροφοδοτούν μέσα στο στόμα με βασιλικό πολτό (Χαριζάνη, 1992).

### **1.3.5. Αναζήτηση τροφής**

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

### **1.3.6. Πώς οι μέλισσες φτιάχνουν το μέλι**

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

Οι συλλέκτριες προσθέτουν στο νέκταρ και στο μελίτωμα σάλιο και το μεταφέρουν στις κυψέλες. Εκεί το μοιράζουν στις εργάτριες και στους κηφήνες. Μέχρι να τοποθετηθεί στα κελιά περνά πολλές φορές από τη μια μέλισσα στην άλλη και κάθε φορά προστίθεται σάλιο, το οποίο μεταβάλλει τα σάκχαρα. Το υγρό πιπιλίζεται από τις μέλισσες πολλές φορές, 15 - 20 λεπτά. Η διαδικασία αυτή συμπυκνώνει το υγρό. Κατά τη διάρκεια πολλών ημερών εξατμίζεται το νερό και η πυκνότητα του υγρού αυξάνει σε σάκχαρα ώσπου να φτάσει στο 70 με 80%. Στη συνέχεια οι μέλισσες καλύπτουν το συμπυκνωμένο μέλι με ένα κάλυμμα από κερί. Η σύνθεση του μελιού εξαρτάται από πολλούς παράγοντες :

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

## **1.4. Είδη μελιού**

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

### **❖ Μέλια Ανθέων**

Πορτοκαλιάς, θυμαριού, ευκαλύπτου, δενδρολίβανου, λεβάντας, λυγαριάς, ακακίας είναι μερικά από τα μέλια που προέρχονται από το νέκταρ που παράγουν τα αντίστοιχα φυτά (Θρασυβούλου και Μανίκης, 1990).

### **❖ Μέλια Μελιτώματος**

Το μέλι του πεύκου και του ελάτου είναι μερικά από τα μέλια που προέρχονται από τα μελιτώματα των αντίστοιχων φυτών. Στην Κύπρο δεν παράγονται μέλια μελιτώματος (Θρασυβούλου και Μανίκης, 1990).

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

## 1.5. Προϊόντα μέλισσας

Εκτός από το μέλι σε ένα μελίσσι μπορεί να παραχθεί :

- **ΓΥΡΗ**



Είναι το προϊόν που συγκεντρώνουν οι μέλισσες από διάφορα λουλούδια. Είναι η πλουσιότερη φυσική τροφή σε πρωτεΐνες, βιταμίνες, απαραίτητα αμινοξέα, ορμόνες, ένζυμα και άλλα χρήσιμα συστατικά για τη διατροφή μας. Χρησιμοποιείται στη φαρμακοβιομηχανία, στη βιομηχανία καλλυντικών, στη διατροφή ανθρώπου και οικιακών ζώων, στην κατασκευή υποκατάστατων γύρης για τη διατροφή των μελισσών, σε διάφορες έρευνες για τις αλλεργίες, σε προγράμματα βελτίωσης φυτών και στην επικονίαση φρούτων και λαχανικών (Παππάς, 1988).

- **ΒΑΣΙΛΙΚΟΣ ΠΟΛΤΟΣ**



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

- **ΠΡΟΠΟΛΗ**



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

- **ΚΕΡΙ**



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

- **ΔΗΛΗΤΗΡΙΟ**



Είναι ένα πολύπλοκο μίγμα χημικών ουσιών που έχει φαρμακευτική δράση και επηρεάζει τη φυσιολογία ενός οργανισμού. Περιέχει αρκετές ουσίες που είναι ενδιαφέρουσες από βιοχημική και



φαρμακολογική πλευρά όπως είναι η μελιτίνη, απαμίνη, ισταμίνη, ντοπαμίνη, φωσφολιπάση Α. Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ρευματοειδούς αρθρίτιδας και για το γαστρικό έλκος. Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται στη θεραπεία για τη σκλήρυνση κατά πλάκας. Σύμφωνα με έρευνα αποδείχτηκε ότι σκοτώνει τα καρκινογόνα κύτταρα, ενώ δεν επηρεάζει τα υγιή (Τσέλλιος και Θρασυβούλου, 1989).

## • ΕΠΙΚΟΝΙΑΣΗ



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

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

Παρά τη μοναδική και αναντικατάστατη συμμετοχή της μέλισσας στην οικονομική, οικολογική, ακόμη και αισθητική διαμόρφωση της υπόστασης του πλανήτη στο σύνολό του, αλλά και του ανθρώπου ειδικότερα, και ακόμη παρά την ύπαρξη αυστηρής νομοθεσίας για το θέμα, θα πρέπει να επισημανθεί το ακανθώδες πρόβλημα που προκύπτει από τη χρήση ψεκασμών με μελισσοτοξικές φυτοπροστατευτικές ουσίες σε ορισμένες καλλιέργειες. Και ενώ η μέλισσα αποτελεί αποδεδειγμένα τον ισορροπιστή της φύσης υπόκειται συχνά τις δυσμενείς συνέπειες των ψεκασμών (Λαυρεντιάδης, 1983).

## 1.6. Στατιστικά δεδομένα για την παραγωγή μελιού σε Ελλάδα και Ε.Ε.

Δεύτερη σε κυψέλες και τέταρτη στην παραγωγή μελιού σε σχέση με τις ευρωπαϊκές χώρες είναι η Ελλάδα. Οι μεγαλύτερες ποσότητες προέρχονται από το πεύκο (55-60% της ετήσιας συνολικής παραγωγής), το έλατο (5-10%) και το θυμάρι (15%). Το 2008, που η παραγωγή μελιού ανήλθε σε 15.682 τόνους, κυρίως από Πελοπόννησο, Μακεδονία και Στερεά Ελλάδα, είχαμε μείωση κατά 11% σε σχέση με το 2007 και η παραγωγή της Μακεδονίας μειώθηκε κατά 31% λιγότερο μέλι (Εθνική Στατιστική υπηρεσία)

Πίνακας 1. Παραγωγή μελιού στην Ε.Ε. και στην Ελλάδα.

[www.statistics.gr](http://www.statistics.gr)

Παραγωγή μελιού στην Ε.Ε.				Παραγωγή μελιού στην Ελλάδα*			
Χώρα-μέλος	2006	2007	Διαφορά	Γεωγ. Περιφέρεια	2007	2008	Διαφορά
Ισπανία	30.661	31.250	1,92%	Μακεδονία	4.559	3.133	-31,30%
Γερμανία	18.000	16.000	-11,11%	Πελοπόννησος	3.783	3.506	-7,32%
Γαλλία	15.000	16.000	6,66%	Στ. Ελλάδα & Εύβοια	2.684	2.839	5,80%
ΕΛΛΑΔΑ	16.218	17.690	9,07%	Κρήτη	1.873	1.973	5,30%
Ρουμανία	18.195	16.767	-7,84%	Νήσοι Αιγαίου	1.644	1.358	-17,40%
Ουγγαρία	17.319	15.933	-8,00%	Θεσσαλία	1.457	1.217	-16,50%
Πολωνία	13.546	14.954	10,39%	Θράκη	742	714	-4,00%
Ιταλία	10.000	12.000	20,00%	Ηπείρος	668	628	-6,00%
Βουλγαρία	10.199	6.139	-39,80%	Ιόνιοι Νήσοι	280	314	12,34%
Τσεχία	9.081	8.467	-6,76%	Σύνολο	17.690	15.682	-11,35%
Ην. Βασίλειο	7.000	7.200	2,85%				
Αυστρία	6.000	6.500	8,33%				
Πορτογαλία	6.000	6.100	1,66%				
Σλοβακία	4.360	4.628	6,14%				
Σουηδία	3.500	3.400	-2,85%				
Φινλανδία	3.041	1.400	-53,96%				
Βέλγιο	2.150	2.150	0,00%				
Σλοβενία	2.250	1.480	-34,22%				
Δανία	1.500	1.400	-6,66%				
Λιθουανία	1.388	1.599	15,20%				
Λετονία	1.383	900	-34,92%				
Εσθονία	1.033	756	-26,81%				
Κύπρος	610	620	1,63%				
Ιρλανδία	200	200	0,00%				
Λουξεμβούργο	129	162	25,58%				
Μάλτα	0	0	0,00%				
Ολλανδία	0	0	0,00%				
Σύνολο Ε.Ε.	198.763	193.695	-2,54%				

Παγκόσμια παραγωγή μελιού			
	2006	2007	Διαφορά
Αφρική	167.275	167.868	0,35%
Βόρεια και Κεντρική Αμερική	193.221	172.596	-10,67%
Νότια Αμερική	145.095	144.696	-0,27%
Ασία	559.039	547.845	-2,00%
Ευρώπη	352.668	338.989	-3,87%
Ωκεανία	28.745	28.497	-0,86%
Σύνολο	1.446.043	1.400.491	-3,15%

Οι εξαγωγές μας έφτασαν τους 601 τόνους, αντιπροσωπεύοντας αξία περίπου 3 εκατ. ευρώ με μέση τιμή πώλησης 4,99 ευρώ το κιλό. Ο κύριος όγκος των εξαγωγών μας κατευθύνεται κυρίως σε τέσσερις χώρες και συγκεκριμένα στο Ηνωμένο Βασίλειο, την Κύπρο, τη Γερμανία και τις ΗΠΑ, που το 2008 κάλυψαν περίπου το 76 % των εξαγωγών.

Οι εισαγόμενες ποσότητες μελιού το 2008 ανήλθαν σε περίπου 2.736 τόνους αντιπροσωπεύοντας αξία 7,2 εκατ. ευρώ, με μέση τιμή πώλησης 2,64 ευρώ/κilo. Τα έτη 2006 και 2007 οι μεγαλύτερες ποσότητες προέρχονται κυρίως από τη Γερμανία, την Ισπανία, την Ουγγαρία και το Βέλγιο, καλύπτοντας αντίστοιχα το 87% και το 74% περίπου των εισαγωγών. Η Ε.Ε. είναι δεύτερη στην παραγωγή μελιού παγκοσμίως, με ποσότητες οι οποίες ανήλθαν για το 2007 σε 193.695 τόνους. Η Ισπανία κατέχει σταθερά την πρώτη θέση και η Ελλάδα βρίσκεται στην τέταρτη θέση, με 17.690 τόνους.

Ο τομέας της μελισσοκομίας, για να παρουσιάσει περαιτέρω ανάπτυξη, (μελέτη του Μελισσοκομικού Κέντρου της ΠΑΣΕΓΕΣ), θα πρέπει να μειωθεί το κόστος παραγωγής, να αυξηθεί η κατανάλωση του μελιού μέσα από την προβολή ενός προτύπου υγιεινής διατροφής, να αυξηθούν οι εξαγωγές και να κατακτηθούν νέες αγορές, να βελτιωθούν η τυποποίηση, η συσκευασία και η διαφήμιση του προϊόντος, να στραφούμε στη συστηματική παραγωγή και άλλων προϊόντων κυψέλης, όπως βασιλικός πολτός, γύρη, πρόπολη, κεριά, δηλητήριο, να προωθηθεί η πιστοποίηση βιολογικών μελισσοκομικών προϊόντων, να κατοχυρωθούν τα μέλια ΠΟΠ και ΠΓΕ - σήμερα έχει κατοχυρωθεί μόνο το «Μέλι Ελάτης Μαινάλου Βανίλια» ως ΠΟΠ, να εμπλουτιστεί η μελισσοκομική χλωρίδα μέσω της δημιουργίας μελισσοκομικών πάρκων.

## 1.7. Τύποι ελληνικού μελιού

Το μέλι δεν είναι απλώς μια γλυκαντική ύλη όπως η ζάχαρη, πρόκειται για κάτι πολύ περισσότερο. Είναι ένα μοναδικό στο είδος του προϊόν, πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά, άρωμα και γεύση. Οι διαφορές μεταξύ των ανθόμελων και αυτών που προέρχονται από κωνοφόρα δέντρα είναι σημαντικές. Τα ανθόμελα, για παράδειγμα, περιέχουν υπολείμματα γύρης. Τα μέλια από κωνοφόρα δέντρα είναι πλούσια σε μεταλλικά άλατα. Τα μέλια που προέρχονται από νέκταρ είναι ανοιχτόχρωμα, ελαφρύτερα και κρυσταλλώνουν, ενώ τα μέλια από μελίτωμα είναι σκουρόχρωμα και κρυσταλλοποιούνται λιγότερο. Υπάρχουν, επίσης, αρκετές διαφορές μεταξύ όλων των μελιών όσον αφορά τη χημική τους σύσταση. Έτσι, τα ανθόμελα έχουν μεγαλύτερο ποσοστό γλυκόζης και φρουκτόζης (μεγαλύτερο από 65%), ενώ τα μέλια από κωνοφόρα δέντρα έχουν μικρότερο ποσοστό (από 38-65%) (Υφαντίδη, 1983).

### Πευκόμελο (*Pinus sylvestris*)

Το 65% περίπου της συνολικής παραγωγής μελιού στην Ελλάδα προέρχεται από τα πεύκα. Το πεύκο, μάλιστα, θεωρείται το σημαντικότερο μελισσοκομικό φυτό της χώρας μας. Οι κυριότερες περιοχές παραγωγής πευκόμελου είναι η βόρεια Εύβοια, η Χαλκιδική, η Θάσος, η Σκόπελος, η Ζάκυνθος και η Ρόδος.

**Γεύση:** Λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης σακχάρων, δεν είναι πάρα πολύ γλυκό.

**Άρωμα:** Ιδιαίτερο. Κάποιοι το παρομοιάζουν με το άρωμα ιωδίου.

**Χρώμα:** Το πευκόμελο είναι πιο σκούρο από το θυμαρίσιο. Εκείνο μάλιστα που παράγεται την άνοιξη είναι πιο ανοιχτόχρωμο και πιο διαυγές από εκείνο που παράγεται το φθινόπωρο.

**Κρυστάλλωση:** Το πευκόμελο ζαχαρώνει σχετικά αργά, αφού η φυσική περιεκτικότητά του σε γλυκόζη είναι χαμηλή. Συγκεκριμένα, τα αμιγή πευκόμελα παραμένουν ρευστά, δηλαδή χωρίς να κρυσταλλώσουν, για περισσότερο από ενάμιση χρόνο.

**Θρεπτική αξία:** Το πευκόμελο θεωρείται μέλι υψηλής θρεπτικής αξίας και αυτό οφείλεται κυρίως στο μεγάλο αριθμό διαφορετικών ουσιών που υπάρχουν στη σύστασή του. Από τις ουσίες αυτές επικρατούν τα μέταλλα και τα ιχνοστοιχεία (το ασβέστιο, το μαγνήσιο, ο ψευδάργυρος, ο σίδηρος, ο χαλκός κλπ.), τα οποία

βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα ελληνικά πευκόμελα (Θρασυβούλου και Μανίκης, 1990).

### **Μέλι Ελάτης (*Abies alba*)**

Μία από τις καλύτερες και ακριβότερες κατηγορίες μελιού. Ξεχωρίζει για τη χαρακτηριστική του εμφάνιση. Είναι ιδιαίτερα πυκνόρρευστο. Υπολογίζεται ότι το 5-10% περίπου του μελιού που παράγεται στην Ελλάδα είναι από έλατα. Προέρχεται κυρίως από τις ορεινές περιοχές της Ευρυτανίας, της Πίνδου, του Ολύμπου, από τα βουνά Μαίναλο, Πάρνωνα και Χελμό στην Πελοπόννησο και από την Πάρνηθα στην Αττική.

**Γεύση:** Το συγκεκριμένο είδος μελιού διακρίνεται για την ιδιαίτερα καλή του γεύση.

**Άρωμα :** Δεν παρουσιάζει έντονο άρωμα.

**Χρώμα:** Ποικίλλει ανάλογα με την περιοχή προέλευσής του. Έτσι, το μέλι ελάτης από τη Βυτίνα Αρκαδίας ξεχωρίζει λόγω των κρεμ ανταυγείων που δημιουργούνται στο εσωτερικό του και λέγεται «Βανίλια ελάτης». Γενικά, το μέλι ελάτης έχει έντονα μελί χρώμα, σε άλλες περιοχές πιο σκούρο και σε άλλες πιο ανοιχτό.

**Κρυστάλλωση:** Λόγω του χαμηλού ποσοστού γλυκόζης, δεν κρυσταλλώνει.

**Θρεπτική αξία:** Είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία (κάλιο, μαγνήσιο, φώσφορο, σίδηρο κλπ.). Περιέχει βιταμίνες σε πολύ μικρές ποσότητες, αλλά ακόμα και αυτή η μικρή ποσότητα βοηθάει στην καλύτερη αφομοίωση των σακχάρων από τον ανθρώπινο οργανισμό (Μπίκος, 1991).

### **Μέλι Καστανιάς (*Castanea sativa*)**

Παράγεται από το νέκταρ και τις μελιτώδεις εκκρίσεις της καστανιάς, που θεωρείται καλό μελισσοκομικό φυτό και αρκετά διαδεδομένο στα ορεινά της Ελλάδας. Στη Μακεδονία, μέλι καστανιάς συλλέγεται κυρίως στη χερσόνησο του Άγιου Όρους.

**Γεύση:** Δυνατή, ελαφρώς πικρή και διαρκείας. Η γεύση του καστανόμελου είναι τόσο έντονη, που μια μικρή αναλογία μπορεί να υπερκαλύψει τη γεύση άλλων μελιών.

**Άρωμα :** Έντονα αρωματικό

**Χρώμα:** Ποικίλλει ανάλογα με την προέλευσή του από ανοιχτό καφέ μέχρι σκούρο καφέ και μαύρο εάν πρόκειται για μελίτωμα.

**Κρυστάλλωση:** κρυσταλλώνει αργά μετά από ένα με δυο χρόνια.

**Θρεπτική αξία:** Πλούσιο σε ιχνοστοιχεία (Θρασυβούλου και Μανίκης, 1990)

### Μέλι εσπεριδοειδών

Τα εσπεριδοειδή (πορτοκαλιά, λεμονιά) αποτελούν μια σημαντική πηγή νέκταρος για την παραγωγή μελιού. Το μέλι εσπεριδοειδών (κυρίως το μέλι πορτοκαλιάς) είναι ιδιαίτερα αρωματικό. Παράγεται κυρίως στα νησιά (Κρήτη, Πόρο), στην Πελοπόννησο και στην Ήπειρο.

**Γεύση :** Εξαιρετικά ιδιαίτερη γεύση

**Άρωμα :** ιδιαίτερο, έντονο άρωμα

**Χρώμα :** Ανοιχτό κίτρινο

**Κρυστάλλωση :** Κρυσταλλώνει πολύ γρήγορα, για αυτό καλό είναι να καταναλώνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα

**Θρεπτική αξία :** Για να διατηρηθεί η θρεπτική αξία αυτού του τύπου μελιού, θα πρέπει να καταναλώνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα και να προφυλάσσεται από υψηλές θερμοκρασίες

### Θυμαρίσιο (*Thymus serpyllus*)

Θεωρείται άριστης ποιότητας μέλι. Ανήκει στα ανθόμελα, αλλά στην πραγματικότητα αποτελεί ξεχωριστή κατηγορία λόγω των έντονων αρωματικών και γευστικών χαρακτηριστικών του. Η όψη του είναι ιδιαίτερα ελκυστική, γι' αυτό και το προτιμούν συνήθως οι καταναλωτές. Η μεγάλη του όμως ζήτηση οφείλεται και στο γεγονός ότι, αν αναμειχθεί με άλλους τύπους μελιών (ακόμα και σε μικρές ποσότητες), επηρεάζει καθοριστικά το άρωμά τους. Η παραγωγή του ανέρχεται περίπου στο 10% της συνολικής παραγωγής μελιού της Ελλάδας. Οι καλύτερες περιοχές παραγωγής θυμαρίσιου μελιού θεωρούνται τα ελληνικά νησιά και ιδιαίτερα η Κρήτη και τα Κύθηρα.

**Γεύση:** Το θυμαρίσιο μέλι έχει ευχάριστη γεύση, αλλά ορισμένες φορές, λόγω υψηλής συγκέντρωσης σε φρουκτόζη, αφήνει μια αίσθηση καψίματος στο στόμα.

**Άρωμα :** Έντονα αρωματικό

**Χρώμα:** Συνήθως ανοιχτό κεχριμπαρένιο. (Το θυμαρίσιο μέλι της Αττικής και των Κυκλάδων είναι πιο ανοιχτό από το θυμαρίσιο μέλι της Κρήτης, που είναι σκούρο πορτοκαλί.

**Κρυστάλλωση:** Το συγκεκριμένο είδος μελιού ζαχαρώνει σε διάστημα 6-18 μηνών.

**Θρεπτική αξία:** Το θυμαρίσιο μέλι θεωρείται ότι έχει τονωτικές και αντισηπτικές ιδιότητες(Θρασυβούλου και Μανίκης).

### Ερεικόμελο

Υπάρχουν δύο τύποι ερεικόμελου, με διαφορετικές ιδιότητες το καθένα. Έτσι, έχουμε το μέλι της φθινοπωρινής ερείκης και το ανοιξιιάτικο μέλι ερείκης. Η ανοιξιιάτικη και η φθινοπωρινή ερείκη (ή σουσούρα) είναι από τα πιο σημαντικά μελισσοκομικά φυτά της Ελλάδας. Παράγεται σχεδόν σε όλη τη χώρα.

### Φθινοπωρινό ερεικόμελο (*Erica multipolyflora*)

**Γεύση:** Είναι πιο γευστικό από αυτό της ανοιξιιάτικης ερείκης και διακρίνεται για τη δυνατή γεύση του

**Άρωμα :** χαρακτηριστικό λεπτό, άρωμα

**Χρώμα :** Κοκκινωπό

**Κρυστάλλωση:** Λόγω της υψηλής φυσικής περιεκτικότητάς του σε γλυκόζη, κρυσταλλώνει πολύ γρήγορα (περίπου μέσα σε 1-3 μήνες) και γι' αυτό δεν προσφέρεται για ανάμειξη με άλλα μέλια και για δημιουργία εμπορικών τύπων (χαρμάνια). Το μέλι αυτό ξινίζει επίσης πιο εύκολα από τα άλλα είδη μελιού, γιατί έχει υψηλή υγρασία και μεγάλη περιεκτικότητα σε σακχαρομύκητες.

**Θρεπτική αξία:** Το ερεικόμελο (κυρίως το φθινοπωρινό) θεωρείται ένα πολύ θρεπτικό είδος μελιού και ιδιαίτερα τονωτικό για τον ανθρώπινο οργανισμό, γι' αυτό και πωλείται κυρίως σε καταστήματα υγιεινής διατροφής.

### Ανοιξιάντικο ερεικόμελο (*Erica arborea L*)

Το μέλι αυτό, συγκριτικά με το φθινοπωρινό, είναι πιο ανοιχτόχρωμο και έχει διαφορετική γεύση. Χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης (Seeley, 1985).

### Μέλι από άνθη Κουμαριάς (*Arbutus unedo*)

**Γεύση:** Το μέλι από κουμαριά έχει ιδιόμορφη πικρόγλυκη γεύση και κρυσταλλώνει γρήγορα.

**Θρεπτική αξία :** Περιέχει την ουσία Arbutin η οποία καθαρίζει το αίμα και ρυθμίζει το επίπεδο της χοληστερίνης σε αυτό. Περιέχει φυσικές αντιβιοτικές ουσίες σε μεγαλύτερο ποσοστό από τα υπόλοιπα μέλια με αποτέλεσμα να αποτελεί ασπίδα προστασίας για τον οργανισμό από διάφορες ασθένειες. Περιέχει τον πολυσακχαρίτη, τυρανόζη ο οποίος όπως αποδείχθηκε πειραματικά αυξάνει τη ζωή των κυττάρων. Περιέχει το ένζυμο διασπάση ή αμυλάση, το οποίο διασπά το άμυλο. Παγκοσμίως ονομάζεται ως μέλι της εκατονταετίας γιατί παράγεται σπάνια "σχεδόν κάθε 100 χρόνια στη νήσο Κορσική της Γαλλίας και εξάγεται αποκλειστικά στις πλούσιες αραβικές χώρες. Στην Ελλάδα παράγεται σχεδόν κάθε χρόνο στην Πελοπόννησο, στη Χαλκιδική, αλλά και σε άλλα μέρη και είναι ιδιαίτερα τονωτική τροφή (Θρασυβουλου και Μανίκης, 1990).

### Μέλι κρόκου (*Crocus sativus*)

Το μέλι αυτό προέρχεται από το θεωρούμενο φαρμακευτικό φυτό κρόκος. Αν οι καιρικές συνθήκες είναι καλές, υπάρχει άφθονη νεκταροέκκριση. Παρ' όλα αυτά η συγκομιδή του θεωρείται πολύ δύσκολη και απαιτούνται μεγάλη εμπειρία από τον μελισσοκόμο, πολύ δυνατά μελίσσια και ειδικοί μελισσοκομικοί χειρισμοί.

**Χρώμα:** ανοιχτόχρωμο

**Άρωμα:** του θυμίζει το άρωμα που έχουν τα άνθη του κρόκου.

**Κρυστάλλωση :** Το μέλι κρόκου αρχίζει να κρυσταλλοποιείται περίπου 8-10 μήνες μετά τη συλλογή του.



**Θρεπτική αξία :** μέλι σπάνιο, περιζήτητο και ακριβό

Καθώς οι ευρωπαϊοί καταναλωτές είναι γνώστες των ευεργετικών ιδιοτήτων του κρόκου Κοζάνης, υπάρχει μεγάλη ζήτηση στο εξωτερικό και για το μέλι από κρόκο, ενώ σε συνδυασμό με την πολύ μικρή παραγωγή έχει σαν αποτέλεσμα αυτό να διατίθεται μόνο από επιλεγμένα καταστήματα.

Το μέλι του κρόκου Κοζάνης δυστυχώς δεν φτάνει σχεδόν ποτέ στον Έλληνα καταναλωτή λόγω του υψηλού του κόστους και της πολύ μικρής παραγωγής, αλλά και γιατί εξάγεται σχεδόν όλο.

Το μέλι κρόκου Κοζάνης είναι το πιο ακριβό μέλι που διατίθεται στην ελληνική αγορά (Wilkins and Yinrong, 1993).

### **Οι υπόλοιπες ποικιλίες**

Επίσης στην αγορά μπορεί να βρούμε και τα παρακάτω πιο σπάνια μέλια: Τριφύλλι (ανθόμελο από τις μεγάλες πεδιάδες εντατικών καλλιεργειών του Θεσσαλικού Κάμπου και τη Μακεδονία), Ηλιοτρόπιο (με διακριτικό άρωμα ηλιόσπορου και ανθέων, εξαιρετικά παχύρρευστο, με γεύση κάπως ανισόρροπη, που αφήνει την αίσθηση πορτοκαλιού), Ευκάλυπτος (με ζωνρό άρωμα και γεύση ευκάλυπτου), Δεντρολίβανο (με φινετσάτο άρωμα και γεύση, αρκετά ρευστό), Ακακία (αραιό, με εξαιρετικά λεπτό άρωμα και γεύση ακακίας), Ελαιοκράμβη (συμπαγές, με υφή σαν γλυκό βανίλια και γεύση που, παρά την πυκνότητά της, διαλύεται γρήγορα στο στόμα, αφήνοντας μια περίεργη δροσιά και μια ελαιώδη γεύση, πολύ γλυκιά) (Τσέλλιος και Θρασυβούλου, 1989)).

## **1.8. Αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση του μελιού**

Οι επιδράσεις του μελιού στην υγεία κινούσαν ανέκαθεν το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Η μεγάλη του οσμωτικότητα και οξύτητα θεωρούνται εν μέρει υπεύθυνες για την αντιμικροβιακή του δράση. Οι ισχυροί αντιμικροβιακοί του παράγοντες περιλαμβάνουν τη λυσοζύμη καθώς και τις αντιοξειδωτικές ουσίες των φλαβονοειδών και των φαινολικών οξέων. Για τη μεγιστοποίηση της αντιμικροβιακής του δράσης συστήνεται η αποθήκευση σε μέρος σκιερό, δροσερό αλλά και η κατανάλωσή του όσο είναι ακόμη φρέσκο (Wadhan, 1998).

Οι ενζυματικές αντιδράσεις είναι η βάση της ζωής. Τα κυριότερα ένζυμα προστίθενται στο νέκταρ από τις μέλισσες και συντελούν καθοριστικά στη μετατροπή τους σε μέλι. Ακόμα κι όταν το μέλι είναι ώριμο τα ένζυμα συνεχίζουν να δρουν μέσα του. Γι' αυτό σωστά ονομάζουν το μέλι ζωντανό τρόφιμο. Η ιμπερτάση, που εκκρίνεται από τους αδένες οι οποίοι περιβάλλουν τον πρόλοβο της μέλισσας, διασπά τη ζαχαρόζη σε απλά ζάχαρα (φρουκτόζη, γλυκόζη). Η διαστάση, ένα άλλο ένζυμο που παράγεται από τους αδένες της μέλισσας, είναι το ένζυμο που υδρολύει το άμυλο και τις δεξτρίνες (Wadhan, 1998).

Επιπλέον, στο μέλι περιέχεται, οξειδάση της γλυκόζης, ένζυμο που ανακαλύφθηκε σχετικά πρόσφατα και είναι εξαιρετικά σημαντικό, καθώς θεωρείται υπεύθυνο για μια απ' τις σπουδαιότερες ιδιότητες του μελιού. Η οξειδάση της γλυκόζης προπαρασκευάζει το γλουκονικό οξύ, το κυριότερο οξύ του μελιού και κατά τη διαδικασία αυτή παράγεται μεταξύ άλλων και υπεροξειδίο του υδρογόνου. Το τελευταίο αυτό έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί σημαντικό παράγοντα της αντιβακτηριακής δράσης του μελιού. Αναφέρονται τέλος και άλλα ένζυμα στο μέλι, όπως η ινουλάση, η φωσφατάση, η καταλάση και η υποροξυδάση (Joirisch, 1970).

Μεγαλύτερο ενδιαφέρον όμως παρουσιάζουν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του μελιού. Οι δράσεις αυτές αφορούν τον περιορισμό των αντιδράσεων οξειδωσης μέσα στα τρόφιμα και τον ανθρώπινο οργανισμό.

Φάνηκε πως οι ουσίες του μελιού προστατεύουν τα κύτταρα και ιδιαίτερα τις μεμβράνες τους από τις διαδικασίες της οξειδωσης. Περιορίζουν επίσης την ενδοκυτταρική παραγωγή των επιζήμιων ελευθέρων ριζών (Wadhan, 1998).

Οι φυτοχημικές ουσίες που περιέχονται στο μέλι ενισχύουν την άμυνα του οργανισμού έναντι του οξειδωτικού στρες αποδεικνύοντας έτσι πως η κατανάλωση

του μελιού αντί παραδοσιακών γλυκαντικών παρέχει το πρόσθετο αυτό όφελος(Wadhan, 1998).

Οι διάφορες ερευνητικές προσπάθειες έχουν καταδείξει πως το μέλι διαθέτει επιπρόσθετα αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές και αντιμεταλλαξιογόνες ιδιότητες (Wadhan, 1998).

### **1.8.1. Βακτηριοκτόνος δράση του ελληνικού μελιού**

Το μέλι έχει ισχυρά βακτηριοκτόνο δράση εξαιτίας των αιθέριων ελαίων και των ενζύμων που περιέχει. Οι βακτηριοκτόνες δράσεις του μελιού είναι ισχυρότερες στα gram+ βακτήρια, όπως τα *Clostridium*. Επιπλέον, τα ίχνη πρόπολης που περιέχει δημιουργούν ένα ιδιαίτερα εχθρικό περιβάλλον για να μπορέσουν τα μικρόβια να επιβιώσουν. Από την άλλη μεριά, το μέλι έχει πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα που δημιουργούν ένα υψηλό οσμωτικό δυναμικό. Τα βακτήρια κυριολεκτικά αφυδατώνονται και πεθαίνουν μέσα στο μέλι. Ειδικότερα, όσον αφορά τα βακτήρια της οικογένειας *Clostridium*, δεν μπορούν να επιβιώσουν σε περιβάλλον με πολλά σάκχαρα, ποσό μάλλον στο μέλι που περιέχει τόσους άλλους βακτηριοστατικούς και βακτηριοκτόνους παράγοντες. Επιπρόσθετα, είναι γνωστό ότι το μέλι περιέχει πρεβιοτικές ουσίες που βοηθάνε στην ανάπτυξη της φιλικής χλωρίδας του ανθρώπου και στην αποτροπή της ανάπτυξης της «κακής» χλωρίδας μέσα στο έντερο, όπως το *C.botulinum* (Joirisch,1970).

### **1.8.2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΜΕΛΙ ΜΑΝΟΥΚΑ**

Παράγεται από το νέκταρ των λουλουδιών του δέντρου μανούκα (λεπτόσπερμο), της Νέας Ζηλανδίας και παράγεται μόνο εκεί.

Το μέλι μανούκα έγινε παγκόσμια γνωστό για δυο λόγους : για τις αντιβακτηριδιακές του ιδιότητες και για την διακριτική και αρωματική του γεύση.

Ένα μοναδικό, φυσικό αντιβιοτικό τόσο αποτελεσματικό που ανάγκασε τα μεγαλύτερα ιατρικά κέντρα του κόσμου να το προτείνουν σαν επικουρική θεραπεία σε πολλές περιπτώσεις λοιμώξεων.

Βοηθά πολύ τα άτομα με προβλήματα πέψης αλλά κυρίως λόγω της παθοκτόνου δράσης του σε περιπτώσεις αναπνευστικών λοιμώξεων, πονόλαιμου, αμυγδαλίτιδας, φαρυγγίτιδας, γρίπης και ιώσεων.

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και εξωτερικά, σαν θεραπευτικό, επουλωτικό και αντιμολυσματικό σε περιπτώσεις δερματικών μολύνσεων και ερεθισμών (Allen et al., 1991).



Εικόνα 1. Μέλι Μανούκα και συσκευασία.

[www.bees.gr](http://www.bees.gr)



Εικόνα 2. Ανθοταξία δέντρου.

[www.herbscancure.com](http://www.herbscancure.com)

### **1.8.3. Αντιβακτηριδιακή και αντιμυκητιακή δράση**

Το μέλι περιλαμβάνει σταφυλοσάκχαρο, φρουκτόζη, καλαμοσάκχαρο, καθώς και μικρότερες ποσότητες μαλτόζης και άλλων σακχάρων. Ήδη από τη φάση της συλλογής του, η μέλισσα προσθέτει στο νέκταρ ένζυμα που αλλάζουν τη σύσταση των διαφόρων σακχάρων. Μεταξύ άλλων, ένα μέρος του σταφυλοσάκχαρου διασπάται σε σακχαρικό οξύ και υπεροξειδίο του υδρογόνου, ουσίες που δρουν ενάντια στα βακτηρίδια και τους μύκητες.

Επιπλέον, οι μέλισσες μειώνουν την περιεκτικότητα σε νερό, που καταλήγει να αποτελεί το 20% του μελιού, από 60% στο νέκταρ. Αυτή η μικρή περιεκτικότητα σε νερό είναι μια ακόμη σημαντική παράμετρος στην ανθεκτικότητα του μελιού, αφού έτσι εμποδίζεται η ανάπτυξη βακτηριδίων και μυκήτων. Το μέλι στερεί, την υγρασία των βακτηριδίων και τα εξοντώνει (Seeley, 1985).

## 1.9. Μικροβιακή ποιότητα διαφόρων τύπων μελιού

Σύμφωνα με την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιωάννα Β. Χήνου, από το Φαρμακευτικό Τμήμα του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Τομέας Φαρμακογνωσίας - Χημείας Φυσικών Προϊόντων, 2005) μελετήθηκε η χημική σύσταση ποικιλιών ελληνικών μελιών καθώς και η αντιμικροβιακή τους δράση (Chinou et al., 1998).

Στα πλαίσια συστηματικής μελέτης της χημικής σύστασης ελληνικών μελιών, ανακοινώθηκαν μετά από την επιστημονική δουλειά που αφορά σε χημικές αναλύσεις και βιολογικές δράσεις, επικεντρωμένες σε εκείνες των αντιμικροβιακών, 49 μελιών (μονο- και πολυκαλλιεργειών) από 30 διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας. Ανέλυσε τα αποτελέσματα που προκύπτουν από έρευνες ως προς τη μοναδική και πολύ ιδιαίτερη χημική σύσταση ορισμένων από τα ελληνικά μέλια, καθώς και για τις σημαντικές αντιμικροβιακές δράσεις που εμφανίζουν συγκεκριμένες ποικιλίες μελιών από τη χώρα μας, έναντι πρότυπων βακτηριακών στελεχών, βακτηρίων της στοματικής κοιλότητας, καθώς και ανθρωπαθογόνων μυκήτων (Chinou et al., 1998).

Όλα τα δείγματα μελιών, καθώς και οι απομονωμένες ουσίες τους, ελέγχθηκαν για τις βιολογικές τους δράσεις και εμφάνισαν υψηλή αντιμικροβιακή δράση έναντι πρότυπων Gram θετικών βακτηριακών στελεχών *S. aureus*, *S. Epidermidis* και των Gram αρνητικών *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. cloaceae*, των βακτηρίων της στοματικής κοιλότητας *S. viridians* και *S. mutans* και των περισσοτέρων από 17 κλινικά ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών, καθώς και των ανθρωπαθογόνων μυκήτων *C. albicans*, *C. tropicalis* και *C. glabrata*. Όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν έδειξαν μεγάλη αντιμικροβιακή δράση (Chinou et al., 1998).

Ακόμη μια μελέτη, που πραγματοποιήθηκε στην Αργεντινή, είχε ως σκοπό να προσδιορίσει τη μικροβιακή ποιότητα διαφόρων τύπων μελιού (Iurlina M., Fritz R., 2005). Αφορά 70 είδη μελιού συμπεριλαμβανομένων και των εμπορικών δειγμάτων, που αρχικά εξετάστηκαν για το σύνολο της αντιβακτηριακής τους δράσης. Από κάθε δείγμα, προσδιορίστηκε ο αριθμός των αερόβιων μικροοργανισμών, τα βακτήρια, τα συνολικά κολοβακτηρίδια, οι μύκητες και οι ζυμομύκητες καθώς και η παρουσία της *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Clostridium botulinum*. Ο αριθμός των αερόβιων μικροοργανισμών τα βακτήρια και οι ζύμες ήταν λιγότερα από 10<sup>3</sup> cfu/g και για τα 70 δείγματα. Τα βακτήρια *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* και *Clostridium* δεν ανιχνεύθηκαν.

Το μέλι έχει ιδιότητες που αναστέλλουν ή σκοτώνουν τους περισσότερους μικροοργανισμούς. Πιθανές πηγές μόλυνσής του είναι κυρίως η γύρη, το πεπτικό σύστημα των «εργατριών» μελισσών, η σκόνη, ο αέρας και φυσικά τα ίδια τα άνθη (

Tysset and Durand, 1968). Στο έδαφος βρίσκονται συνήθως τα : *Actinobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* κ.α. (Root., 1983).

Επιστημονικό πείραμα που πραγματοποιήθηκε από τους Tysset και Durand το 1968, βακτήρια και μύκητες βρέθηκαν στο πεπτικό σύστημα μελισσών. Σύμφωνα με την μελέτη αυτή το 30% αποτελούσε gram θετικά βακτήρια και το 70% gram αρνητικά βακτήρια.

Ακόμη μια έρευνα που αφορούσε 50 δείγματα ιταλικών μελιών μελετήθηκαν για τη παρουσία τοξινών (δημιουργείται από μύκητες που πολλαπλασιάζονται). Πρόκειται για αφλατοξίνες, δηλαδή *Aspergillus flavous* και *parasiticus*. Τα επίπεδα παρουσίας ήταν πολύ χαμηλά, της τάξεως 43cfu/g με εύρος 0-2500cfu/g (Piana et al., 1991). Επίσης η παρατήρησή του ήταν ότι η μούχλα επιβιώνει αλλά δεν αυξάνεται.

Επιπλέον μελέτη σε 50 ιταλικά δείγματα μελιού, εμφάνισαν σαν κυρίαρχο μύκητα τον *Succhuromyces spp.* (Tysset and Russeau, 1981). Η παρουσία του ήταν λιγότερο από 10cfu/g στο 64% των δειγμάτων. Επιπλέον έγινε έλεγχος για *E.coli* και τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά, καθώς σχεδόν το 85% των δειγμάτων δεν εμφάνισε καμία αποικία.

Ανάλογα αποτελέσματα είχε ακόμη μια εργασία, που αφορούσε 270 ιαπωνικά δείγματα μελιού (Nakano and Sakaguchi, 1991). Απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν αερόβια μικρόβια της τάξεως 83cfu/g.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε επιστημονική έρευνα σε 175 γαλλικά μέλια, για έλεγχο της μικροβιακής τους ποιότητας (Tysset and Russeau, 1981). Οι παρατηρήσεις ήταν και πάλι ικανοποιητικές για την υγεία των καταναλωτών. Βρέθηκαν αποικίες βακτηρίων, οι οποίες απομονώθηκαν και υπολογίστηκαν σε 227cfu/g.

## **1.10. Μπορεί το μέλι να δημιουργήσει προβλήματα στον ανθρώπινο οργανισμό;**

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

### **Αλλαντίαση - Βοτουλισμός**

Η αλλαντίαση είναι παραλυτική ασθένεια που προκαλείται από τη νευροτοξίνη που παράγει το μικρόβιο κλωστηρίδιο *Clostridium botulinum*.

Σπόρια του μικροβίου μπορούν να βρεθούν στο χώμα, στο νερό, στα φύκη της θάλασσας, στην οικιακή σκόνη ή στην επιφάνεια τροφίμων. Ανάλογα με τον τρόπο ή την αιτία εισόδου των σπορίων του μικροβίου στον οργανισμό του ανθρώπου διακρίνονται 4 τύποι εκδήλωσης της ασθένειας

Ø κατάποση σπορίων του μικροβίου που έχουν αναπτυχθεί σε πλημμελώς αποστειρωμένες, ή κακώς συντηρημένες κονσέρβες,

Ø είσοδος σπορίων στον οργανισμό μέσω ενός τραύματος, χειρουργικού ή άλλου

Ø βρεφικός βοτουλισμός

Ø βοτουλισμός σε ενήλικες ή μεγαλύτερα παιδιά (Nakano and Sakaguchi, 1991).

Αν και οι περισσότερες περιπτώσεις μόλυνσης του ανθρώπου από τη νευροτοξίνη της αλλαντίασης οφείλονται σε τροφική δηλητηρίαση (963 περιπτώσεις/έτος), το μέλι έχει συσχετισθεί με το βρεφικό βοτουλισμό (Frank, 2004).

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

«βρεφικού αιφνίδιου θανάτου». Από αυτές, οι περιπτώσεις που έχουν ταυτιστεί με την κατανάλωση μελιού αποτελούν το 20% (Beetlestone, 1994).

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

Βρέθηκε ότι το 10-15% των δειγμάτων μελιού που εξετάστηκαν στις Η.Π.Α. περιείχαν σπόρια του κλωστηριδίου *Cl. Botulinum* (Midula *et al*, 1979) . Όσον αφορά στα ελληνικά μέλια δεν γνωρίζουμε εάν περιέχουν σπόρια αλλαντίασης, σε ποια συχνότητα και ποιού τύπου (υπάρχουν 6 διαφορετικοί τύποι αλλαντίασης). Εκείνο όμως που είναι γνωστό είναι ότι δεν έχει αναφερθεί καμία περίπτωση βρεφικού βοτουλισμού για την οποία υπεύθυνη να είναι η κατανάλωση μελιού (Beetlestone,1994).

Παρ' όλα αυτά και μέχρι να διερευνηθεί το θέμα αυτό, είναι προτιμότερο να μην δίνεται μέλι σε βρέφη ηλικίας μικρότερης του ενός έτους. Είναι όμως εντελώς αβλαβές για παιδιά μεγαλύτερης ηλικίας που μπορούν να απολαμβάνουν την γλυκιά του γεύση και την υψηλή του θεραπευτική αξία.

### **Δηλητηριώδη μέλια για τον άνθρωπο.**

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

Κάτω από ιδιαίτερες συνθήκες συνήθως εξαιτίας μιας φυσιολογικής διαταραχής, τοξικές ουσίες συγκεντρώνονται στο νέκταρ ή τη γύρη κάποιων φυτών και έτσι συλλέγονται από τις μέλισσες. Στις περισσότερες περιπτώσεις αυτό οδηγεί στη δηλητηρίαση των μελισσών με συνηθέστερο επακόλουθο το θάνατό τους. Σε ελάχιστες περιπτώσεις το τοξικό αυτό νέκταρ ή γύρη δεν σκοτώνει τις μέλισσες και έτσι συγκεντρώνεται στο μέλι το οποίο παράγουν. Μία τέτοια περίπτωση



αναφέρεται σε είδη της οικογένειας *Rhododendron*, στην οποία ανήκουν οι αζαλέες και τα Ροδόδεντρα. Η τοξική ουσία στην περίπτωση αυτή είναι η ανδρομεδοτοξίνη, η οποία προκαλεί στον άνθρωπο αίσθημα δυσφορίας, ναυτίας, χαρακτηριστικά γενικά δηλητηρίσσης (Olszowy, 1977).

### **1.11. Σκοπός της εργασίας**

Το μέλι αποτελεί μια από τις τροφές που συγκεντρώνει ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον, κυρίως λόγω των θρεπτικών συστατικών του. Είναι μια φυσική γλυκαντική τροφή που παρουσιάζει έντονη αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή και κυτταροπροστατευτική δράση (Chinou et al., 1998).

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν στα 31 δείγματα ελληνικών και κυπριακών μελιών να ελεγχθεί το βακτηριακό φορτίο αυτών, καθώς και το φορτίο μυκήτων, που να αποτελούν απειλή για την ανθρώπινη υγεία. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την παρουσία εντεροβακτηρίων καθώς και Gram-θετικών βακτηρίων (*Bacillus cereus*) Ταυτοποίηση κάποιων Gram-θετικών βακτηρίων που απομονώθηκαν βασίστηκε το 16S rRNA γονίδιο.

Άρα έχοντας μια πλήρη εικόνα για την μικροβιακή ποιότητα των μελιών, θα μπορούμε να πούμε με ακρίβεια κατά πόσο οι διάφοροι τύποι των ελληνικών μελιών είναι ασφαλείς για τον άνθρωπο.

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1. Δείγματα μελιών**

Η μελέτη αφορά 31 δείγματα ελληνικών μελιών, εκ των οποίων τα 3 από αυτά είναι από περιοχές της Κύπρου και πιο συγκεκριμένα από τη Λευκωσία και τη Λεμεσό. Πρόκειται για μέλια που η παραγωγή τους έγινε κατά τα έτη 2009 και 2010 (παραγωγή ενός δείγματος το 2008). Η προμήθειά τους έγινε από τους ίδιους τους παραγωγούς σε γυάλινα ή πλαστικά βάζα.

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

Για λόγους ευκολίας τα μέλια αριθμήθηκαν από το 1 μέχρι το 31 με τυχαία σειρά.

### **2.2. Μέτρηση αερόφιλων μεσόφιλων βακτηρίων**

- **Plate count agar (PCA)**

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

Για την παρασκευή 1000 ml PCA (της εταιρίας LAB M), 23,5g θρεπτικού μέσου ζυγίστηκαν και προστέθηκαν σε 1litre απιονισμένο νερό. Έπειτα αφού ανακινήθηκε για λίγα λεπτά ώστε να αραιωθεί καλά, αποστειρώθηκε στους 120°C για 23 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης παρέμεινε σε δροσερό περιβάλλον, ώστε να φτάσει τους 45°C περίπου και έπειτα πριν στερεοποιηθεί, μοιράστηκε σε αποστειρωμένα τριβλία Petri.

- **Phosphate buffer saline (PBS)**

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

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

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

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

- **Για κάθε ένα από τα μέλια, ακολούθησα την παρακάτω διαδικασία**

- ✓ Σ' ένα αποστειρωμένο πλαστικό φιαλίδιο τύπου falcon τοποθετήθηκαν 5ml από το δείγμα μελιού και 5ml PBS (buffer).
- ✓ Το μίγμα ομογενοποιήθηκε με τη χρήση vortex.
- ✓ Με την χρήση πιπέτας τοποθετήθηκαν 150μl από το falcon σε ένα τριβλίο Petri με PCA.
- ✓ Με την βοήθεια μιας αποστειρωμένης πιπέτας Paster, έγινε επίστρωση στο τριβλίο με το ειδικό θρεπτικό υπόστρωμα για βακτήρια (PCA).

✓ Τα τριβλία επώαστηκαν, στους 30°C για 24 ώρες.

✚ Για κάθε μέλι έγιναν 2 επαναλήψεις, δηλαδή 2 τριβλία.

### **2.3. Μέτρηση μυκήτων**

- **Oxytetracycline Glucose Yeast Extract (O.G.Y.E)**

Ένα εκλεκτικό θρεπτικό υλικό για την καταμέτρηση των ζυμών και μυκήτων στα τρόφιμα. Σε αντίθεση με πολλά θρεπτικά μέσα για ζύμες το O.G.Y.E έχει ουδέτερο pH και έχει δώσει καλύτερα ποσοστά ανάκτησης από αυτά με χαμηλό pH (labm.com).

Για την παρασκευή 1000 ml θρεπτικού υποστρώματος, 37g θρεπτικού μέσου ζυγίστηκαν και προστέθηκαν σε 1litre απιονισμένο νερό. Κατόπιν αφού έγινε καλή ανακίνηση για κάποια λεπτά, πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στους 120°C για 23 λεπτά. Μετά την αποστείρωση παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να φτάσει περίπου 45°C.

Τέλος πρόσθεσα στο θρεπτικό υλικό 5 ml από το αντιβιοτικό Oxytetracycline, που λειτουργεί παρεμβαίνοντας στην ικανότητα των βακτηρίων να παράγουν πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για αυτά. Χωρίς αυτές τις πρωτεΐνες τα βακτήρια δεν μπορούν να αναπτυχθούν, να πολλαπλασιαστούν και να αυξηθούν σε αριθμό. Η οξυτετρακυκλίνη σταματά ως εκ τούτου την εξάπλωση της λοίμωξης και τα υπόλοιπα βακτηρίδια σκοτώνονται από το ανοσοποιητικό σύστημα και τελικά πεθαίνουν.

Τελικά το θρεπτικό υλικό μοιράστηκε σε αποστειρωμένα τριβλία Petri.

- **Για κάθε ένα από τα μέλια, ακολούθησα την παρακάτω διαδικασία**

✓ Σ' ένα αποστειρωμένο πλαστικό φιαλίδιο τύπου falcon τοποθετήθηκαν 5ml από το δείγμα μελιού και 5ml PBS (buffer).

✓ Το μίγμα ομογενοποιήθηκε με τη χρήση vortex.

- ✓ Με την χρήση πιπέτας 150μl από το falcon τοποθετήθηκαν σε ένα τριβλίο Petri με OGYE.
- ✓ Με την βοήθεια μιας πιπέτας Paster, έγινε επιστροφή στο τριβλίο με το ειδικό θρεπτικό υπόστρωμα για μύκητες (OGYE).
- ✓ Τα τριβλία επώαστηκαν, στους 30°C για 24 ώρες.

✚ Για κάθε ένα από τα μέλια έγιναν 2 επαναλήψεις, δηλαδή 2 τριβλία.

## **2.4. Ανίχνευση εντεροβακτηρίων**

- **Harlequin E.coli/Colifurm Medium**

Είναι ένα θρεπτικό που αναπτύχθηκε για την απλή απαρίθμηση των αποικιών *E.coli* και άλλων εντεροβακτηρίων, χωρίς την ανάγκη για πρωεπόωση.

Το θρεπτικό μέσο έχει τροποποιηθεί με την προσθήκη ενός χρωμογόνου υποστρώματος για την ανίχνευση της ί-γλυκουρονιδάσης, ένζυμο, το οποίο είναι εξαιρετικά ειδικό για *E.coli* και ανιχνεύεται από ένα αντιδραστήριο. Το πλεονέκτημα του χρωμογόνου υποστρώματος είναι ότι δεν απαιτεί υπεριώδες φως για να εμφανιστεί (findarticles.com).

Για την Παρασκευή 1000 ml Harlequin E.coli/Colifurm Medium, ζυγίστηκαν 36,6g θρεπτικού μέσου και προστέθηκαν σε 1 litre απιονισμένο νερό. Κατόπιν αφού έγινε καλή ανακίνηση για κάποια λεπτά, πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στους 120°C για 23 λεπτά. Μετά την αποστείρωση παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να φτάσει περίπου 45°C. Τέλος μοιράστηκε σε αποστειρωμένα τριβλία Petri.

- **Για κάθε ένα από τα μέλια, ακολούθησα την παρακάτω διαδικασία**

- ✓ Σ' ένα αποστειρωμένο πλαστικό φιαλίδιο τύπου falcon τοποθετήθηκαν 5ml από το δείγμα μελιού και 5ml PBS (buffer).
- ✓ Το μίγμα ομογενοποιήθηκε με τη χρήση vortex.
- ✓ Με την χρήση πιπέτας 150μl από το falcon τοποθετήθηκαν σε ένα τριβλίο Petri με Harlequin E.coli/Colifurm.

- ✓ Με την βοήθεια μιας πιπέτας Paster, έγινε επίστρωση στο τριβλίο με το ειδικό θρεπτικό υπόστρωμα για E.coli (Harlequin E.coli/Colifurm Medium).
- ✓ Τα τριβλία επώαστηκαν, στους 37°C για 24 ώρες.

## **2.5.Απομόνωση *B.cereus* και άλλων Gram-θετικών βακτηρίων**

- **Bacillus cereus Medium**

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

Η ζύμωση της μαννιτόλης σε αυτό το θρεπτικό μέσο παράγει ένα ρόζ-υπόλευκο χρώμα που αποτελούν τις οι αποικίες. Η παρουσία λεκιθινάσσης υποδεικνύεται από ένα λευκό ίζημα γύρω από τις αποικίες που έχουν αναπτυχθεί στο τριβλίο. Τέλος προστίθεται πολυμυξίνη (Polymyxin B) για να καταστείλει τυχόν κολοβακτηρίδια αλλά και μερικά *Proteus spp* και gram θετικά που μπορούν να αυξηθούν μέσω αυτής (labm.com).

Για την παρασκευή 1000 ml θρεπτικού μέσου, ζυγίστηκαν 46 g *B.cereus* Medium και προστέθηκαν σε 900 ml απιονισμένο νερό. Έπειτα αφού έγινε καλή ανακίνηση για κάποια λεπτά, πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στους 120°C για 23 λεπτά. Μετά την αποστείρωση παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να φτάσει περίπου 47°C. Στη συνέχεια και πάντα υπό ασηπτικές συνθήκες, προστέθηκαν 100 ml από το X037 egg yolk emulsion (κρόκος αυγού) και 2 vials από το αντιβιοτικό X074 Polymyxin (Πολυμιξίνη). Έγινε καλή ανακίνηση του θρεπτικού και μοιράστηκε σε αποστειρωμένα τριβλία Petri.

- **Για κάθε ένα από τα μέλια, ακολούθησα την παρακάτω διαδικασία**

- ✓ Σ' ένα αποστειρωμένο πλαστικό φιαλίδιο τύπου falcon τοποθετήθηκαν 5ml από το δείγμα μελιού και 5ml PBS (buffer).
- ✓ Το μίγμα ομογενοποιήθηκε με τη χρήση vortex.
- ✓ Φυγοκεντρήθηκε στις 4000rpm για 45 min
- ✓ Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, κρατώντας το ίζημα και 2 ML περίπου ώστε να γίνει η επίστρωση
- ✓ Ομογενοποιήθηκε το μίγμα με τη χρήση vortex
- ✓ Τοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο, στους 80°C για 10 min
- ✓ Με την χρήση πιπέτας 150μl από το falcon τοποθετήθηκαν σε ένα τριβλίο Petri με B.cereus Medium.
- ✓ Με την βοήθεια μιας πιπέτας Paster, έγινε επίστρωση στο τριβλίο με το ειδικό θρεπτικό υπόστρωμα για B.cereus (B.cereus Medium).
- ✓ Τοποθετήθηκε το τριβλίο στον επωαστήρα, στους 30°C για 24-48 ώρες

✚ Για κάθε ένα από τα μέλια έγιναν 2 επαναλήψεις, δηλαδή 2 τριβλία.

- **Nutrient Broth Agar**

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

Για την παρασκευή 1000 ml θρεπτικού μέσου, ζυγίστηκαν 13 g Nutrient Broth Agar και προστέθηκαν σε 1 litre απιονισμένο νερό. Έπειτα αφού έγινε καλή ανακίνηση για κάποια λεπτά, διαχωρίστηκε σε μικρότερα γυάλινα μπουκαλάκια (vials) και πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στους 120°C για 23 λεπτά. Τα vials τοποθετήθηκαν στους 4°C στο ψυγείο.

## **2.6. Διαδικασία καλλιέργειας Gram-θετικών βακτηρίων και απομόνωση χρωμοσωμικού DNA**

Από τα τριβλία με τις αποικίες Gram θετικών βακτηρίων που αναπτύχθηκαν, έγινε επιλογή κάποιων από αυτών με σκοπό να καλλιεργηθούν και κατόπιν να γίνει απομόνωση βακτηριακού DNA.

Για κάθε μια από τις αποικίες έγινε καλλιέργεια ως εξής :

Υπό ασηπτικές συνθήκες, με αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες ξύθηκε η αποικία από το τριβλίο και έπειτα τοποθετήθηκε στο vial με το θρεπτικό μέσο Nutrient Broth Agar. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στους 30°C για 24 ώρες με ανακίνηση.

### **2.6.1. STOCK ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ**

Προκειμένου να μην είναι αναγκαία η συνεχής ανακαλλιέργεια των στελεχών και για να διατηρηθούν όσο το δυνατόν περισσότερα βακτήρια ζωντανά έγινε stock γλυκερόλης των καλλιεργειών αυτών.

- ◆ Υγρό θρεπτικό μέσο nutrient Broth Agar τοποθετήθηκε σε vials (γυάλινα μπουκαλάκια με πάμα-χωρητικότητα 20 ml). Μοιράστηκε η ποσότητα των 5ml στο κάθε vials όπου αποστειρώθηκε και εκεί τελικά μεταφέρθηκαν με αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες οι πρόσφατα αναπτυγμένες αποικίες των βακτηρίων.
- ◆ Οι υγρές καλλιέργειες επώαστηκαν στους 30°C για 24h.
- ◆ Έπειτα σε αποστειρωμένα erpendorf μεταφέρθηκε η ποσότητα των 1,5 ml από το κάθε γυάλινο μπουκαλάκι και έγινε φυγοκέντρωση στις 12.000 rpm για 3min.
- ◆ Στη συνέχεια απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε 1 ml από φρέσκο Nutrient Broth Agar και έγινε vortex.
- ◆ Έγινε μεταφορά σε cryovials και έπειτα προσθήκη γλυκερόλης, 300-350 ml (τελική συγκέντρωση γλυκερόλης 15-20%), πραγματοποιήθηκε πολύ καλό vortex.
- ◆ Τα cryovials παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 1h και στη συνέχεια διατηρήθηκαν στους -80°C, όπου και παρέμειναν σε όλη την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.



### **2.6.2 Πρωτόκολλο Απομόνωσης Χρωμοσωμικού DNA κατά Spilker**

Πραγματοποιήθηκε η απομόνωση επαρκούς ποσότητας βακτηριακού DNA, η οποία βασίστηκε στο πρωτόκολλο που προτείνουν οι Spilker et al (2004). Η πειραματική διαδικασία απαιτούσε προηγουμένως την καλλιέργεια των στελεχών σε vials που περιείχαν υγρό θρεπτικό μέσο (Nutrient broth agar),πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

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

### **2.6.3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης DNA ανά δείγμα**

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

Η φασμαφωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε, μετά από αραίωση 4μl PCR προϊόντος σε 196μl ddH<sub>2</sub>O (αραίωση 1/50), στα 260nm. Οι τιμές της απορρόφησης στα 260nm ανάγονται σε συγκέντρωση DNA, η οποία στην προκειμένη περίπτωση έπρεπε να είναι τουλάχιστον 100 ng/μl για τις ανάγκες της αλληλούχισης

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων προέκυψαν σύμφωνα με το παρακάτω τύπο :

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

Όπου : Συγκέντρωση DNA = οπτική απορρόφηση<sub>260 nm</sub> × συντελεστής αραίωσης(50)× 50.

#### **2.6.4. Συμβολισμός δειγμάτων**

Για κάθε ένα από τα 31 μέλια, ο συμβολισμός των δειγμάτων έγινε ως εξής : 1H1, 1H2 κ.τ.λ. Όπου ο πρώτος αριθμός συμβολίζει τον τύπο μελιού σύμφωνα με τον πίνακα 1 (Παράρτημα Ι), το Η προέρχεται από την αγγλική λέξη *Honey* (=μέλι) και ο επόμενος αριθμός συμβολίζει τον αριθμό της αποικίας που απομονώθηκε από την καλλιέργεια.

#### **2.7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μία μέθοδος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών όπως το βακτήριο *E. coli* ή οι ζύμες (Bartlett and Stirling, 2003).

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

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

καθορίζουν τα άκρα του θραύσματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί (Bustin, 2000).

Με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση του γενετικού τόπου 16S rRNA. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία ο συγκεκριμένος γενετικός τόπος επιλέχθηκε, γιατί είναι ο πιο συντηρημένος μεταξύ των βακτηριακών στελεχών, άρα και ο πιο εξειδικευμένος για τη ταυτοποίηση βακτηρίων (Spilker et al, 2004 ). Τα δείγματα ενισχύθηκαν με τη χρήση δυο εκκινητών, ενός αριστερού “forward primer” τον 27Fa και ενός δεξιού “reverse primer” τον 1492R Το προϊόν της ενίσχυσης είναι περίπου 1500 bp.

**Πίνακας 2.** Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR.

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

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl, όπου περιέχονταν 2 μl DNA στόχου, 200 μM dNTPs, 0,5 μM από τον κάθε εκκινητή, 1U Taq DNA πολυμεράσης (HyTest, UK), 2 μM MgCl<sub>2</sub> και 1 μl 10 × PCR buffer όπως προβλέπεται από τον κατασκευαστή.

**Πίνακας 3.** Αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων.

Αντιδραστήρια	Αρχικός όγκος	Τελικός όγκος
buffer	10x	1x
DNTP's	25mM	250μM
27Fa	26,9μM	0,5μM
1492R	32,6μM	0,5μM
MgCl <sub>2</sub>	50mM	2mM
Tag	5u/MI	1unit

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

**Πίνακας 4.** Σύσταση του master mix ανά αντίδραση.

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητα</b>
<b>buffer</b>	2,5μl
<b>DNTP's</b>	0,25μl
<b>27Fa</b>	0,46μl
<b>1492R</b>	0,38μl
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1μl
<b>Tag</b>	0,2μl
<b>DNA</b>	2μl
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	19,21μl

Προκειμένου να καθοριστούν η βέλτιστη συγκέντρωση του DNA και ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης, πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι με χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων του DNA-στόχου εφαρμόζοντας διαδοχικά αυξανόμενο αριθμό κύκλων PCR. Η κάθε αντίδραση τελικά επαναλήφθηκε για 30 κύκλους και χρησιμοποιήθηκε κυρίως η συγκέντρωση των 2μl.

Η διαφορά που προκαλούσε η μεταβολή της ποσότητας του DNA στόχου στον τελικό όγκο του master mix, καλυπτόταν με την προσθήκη ή αφαίρεση συγκεκριμένης ποσότητας απιονισμένου H<sub>2</sub>O. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμοκυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler.

Επίσης ετοιμάστηκαν και δυο επιπλέον δείγματα, που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικό(P) και αρνητικό (N) control αντίστοιχα. Το θετικό control μου ήταν η χρωμοσωμικό DNA της *Pseudomonas entomophila* και το αρνητικό control το dH<sub>2</sub>O (ίδια ποσότητα με τα δείγματα του DNA-στόχο του δείγματος). Η εμφάνιση ή όχι του P θα προσδιορίσει κατά πόσο τεχνικά λειτουργεί η PCR. Ενώ η εμφάνιση του N θα σημαίνει κάποια επιμόλυνση. Άρα το ιδανικό αποτέλεσμα θα είναι εμφάνιση του P και όχι του N.

Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια:

- Αποδιάταξη του DNA (denaturation)
- Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing)
- Επιμήκυνση των εκκινητών (extension) (Rychlik et al., 1990).

Ένας πλήρης τέτοιος κύκλος περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες και γίνεται στις μέρες μας αυτόματα από ειδικά μηχανήματα τους θερμοκυκλοποιητές (thermal cyclers). Σε μια τυπική αντίδραση, το δίκλωνο DNA αποδιάσσεται με θέρμανση στους 94° C. Στη συνέχεια οι εκκινητήρες σε περίσσια προσαρμόζονται με υβριδισμό στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA εκμαγείου με ψύξη του δείγματος στους 50 – 60° C. Ακολουθεί επώαση στους 72° C για την επιμήκυνση των εκκινητήρων από μία θερμοάντοχη πολυμεράση, παρουσία των τεσσάρων νουκλεοτιδίων (Richlik et al., 1990)

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

Ο γενετικός τόπος 16S rRNA ενισχύθηκε, στις παρακάτω συνθήκες :

- Αρχική αποδιάταξη του DNA: 94<sup>0</sup> C για 5 min
- Αποδιάταξη του DNA: 94<sup>0</sup> C για 1 min
- Προσαρμογή εκκινητών στο DNA : 57<sup>0</sup> C για 30 sec
- Επιμήκυνση εκκινητών: 72<sup>0</sup> C για 90 sec
- Τελική επιμήκυνση: 72<sup>0</sup> C για 10 min

Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε στους 30 κύκλους.

## **2.8. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης**

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

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

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους. Στο συγκεκριμένο πείραμα το επιθυμητό μέγεθος του γενετικού τόπου ήταν στις 1500 bp.

Η προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης έγινε ακολουθώντας την εξής διαδικασία:

- Ζυγίστηκαν 0,8g αγαρόζης και προστεθήκαν σε φλάσκα με 100ml διαλύματος Tris-Boric-ETDA(TBE) 1× (τελική συγκέντρωση 0,8% w/v). Το αρχικό διάλυμα TBE 10× είχε προηγουμένως αραιωθεί (10ml TBE+90ml H<sub>2</sub>O).
- Το διάλυμα αναδεύτηκε και θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων για 2 λεπτά μέχρι να διαλυθεί πλήρως η ποσότητα αγαρόζης.
- Προστέθηκαν 10μl βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium Bromide Solution, 10 mg/ml) και αναδεύτηκε. Αυτό έγινε για να είναι εμφανείς οι ζώνες του DNA κατά την παρατήρηση της πηκτής στη λάμπα υπεριώδους φωτός.
- Το διάλυμα προστέθηκε στο ειδικό καλούπι όπου και παρέμεινε μέχρι να πολυμεριστεί.
- Η πηκτική αγαρόζης τοποθετήθηκε τελικά στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη «Loading buffer». Πήραμε 6 μl από κάθε PCR προϊόν και προστέθηκαν 2μl «Loading buffer» και αναδεύτηκαν με την βοήθεια της πιπέτας. Η ίδια διαδικασία έγινε και για το P(positive), καθώς και για το N(negative). Μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκε

και ένας μάρτυρας, ο «ladder», ποσότητας 1,3μl, ο οποίος και τοποθετήθηκε στο πρώτο πηγαδάκι της συσκευής.

Αναμειγνύουμε το δείγμα του DNA με 6X «loading buffer». Αυτό επιτρέπει να βλέπουμε που πάει το DNA που φορτώνουμε και στη συνέχεια πόσο πολύ έχει τρέξει η ηλεκτροφόρηση. Επίσης επειδή είναι ιξώδες (γλυκερόλη ή άλλα ιξώδη διαλύματα οδηγεί το DNA στον πάτο του πηγαδιού). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 112 volts και ακολούθησε παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους φωτός.

## **2.9. Καθαρισμός προϊόντων PCR**

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

## **2.10. Αλληλούχιση του 16S rRNA γονιδίου και ανάλυση των αλληλουχιών**

Τα προϊόντα PCR, στάλθηκαν για αλληλούχιση με σκοπό τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του γενετικού τύπου του 16S rRNA για κάθε βακτηριακό στέλεχος.

Μετά την αλληλούχιση ακολούθησε η σύγκριση των αλληλουχιών με βάση δεδομένων, χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο *BLAST* και το πρόγραμμα RDP (Ribosomal Database Project), με τελικό στόχο την ταξινόμηση, εάν αυτή ήταν δυνατή, των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών σε κάποιο γένος ή είδος.

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

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

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

◆ Εισάγαμε την εξής διεύθυνση στο διαδίκτυο:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

◆ Επιλέξαμε BLAST with bacterial genomes

◆ Εισαγάγαμε την επιθυμητή αλληλουχία

◆ Επιλέξαμε Bacteria → BLAST ALL

◆ Επιλέξαμε *View report* και μετά από λίγα λεπτά αναζήτησης εμφανίστηκαν τα αποτελέσματα *sequences producing significant alignments*, ενώ ταυτόχρονα εμφανίζονται και οι τιμές *Max.score* και *E value*.



### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Καταμέτρηση βακτηριακών αποικιών

Ο έλεγχος του βακτηριακού φορτίου, έγινε με απλή καταμέτρηση των αποικιών που αναπτύχθηκαν στα τριβλία Petri, σε θρεπτικό υπόστρωμα Plate Count Agar (PCA). Έτσι για κάθε ένα από τα μέλια, πραγματοποιήθηκαν δυο επαναλήψεις. Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 5) βλέπουμε για κάθε ένα μέλι, τον αριθμό αποικιών στην πρώτη και στην δεύτερη επανάληψη. Στην τελευταία στήλη φαίνεται ο μέσος όρος βακτηρίων (cfu/gr) και η τυπική απόκλιση (S.D.) του καθενός. Ο μέσος όρος βακτηρίων (cfu/gr) και η τυπική απόκλιση προέκυψε ως εξής :

- 5ml μελιού ζυγίζονται αρχικά+5ml buffer
- 10ml = 10000μλ, από τα οποία επιστρώνονται τα 150μλ
- $10000/150 = 66,66\sim 67\mu\lambda$  (Συντελεστής πολλαπλασιασμού για την εύρεση του συνολικού αριθμού βακτηρίων στο δείγμα (5 ml))

Για κάθε επανάληψη πολλαπλασιάζω τον αριθμό αποικιών με την ποσότητα που έγινε η επίστρωση και έπειτα διαιρώ με το αρχικό βάρος του falcon. Π.χ. για το πρώτο μέλι εργάστηκα ως εξής :

1<sup>η</sup> επανάληψη → 2 αποικίες

2<sup>η</sup> επανάληψη → 1 αποικία

$$\text{Όποτε } 2 \times 67 = 134 \text{cfu}/10,11\text{g} = 14 \text{cfu/g}$$

$$1 \times 67 = 67 \text{cfu}/10,11\text{g} = 7 \text{cfu/g}$$

Όπου 10,11g το αρχικό βάρος του falcon

Στη συνέχεια βρίσκω το μέσο όρο αυτών των δυο :  $14 + 7 / 2 = 10 \text{cfu/g}$

Η τυπική απόκλιση υπολογίζεται από το τύπο :

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

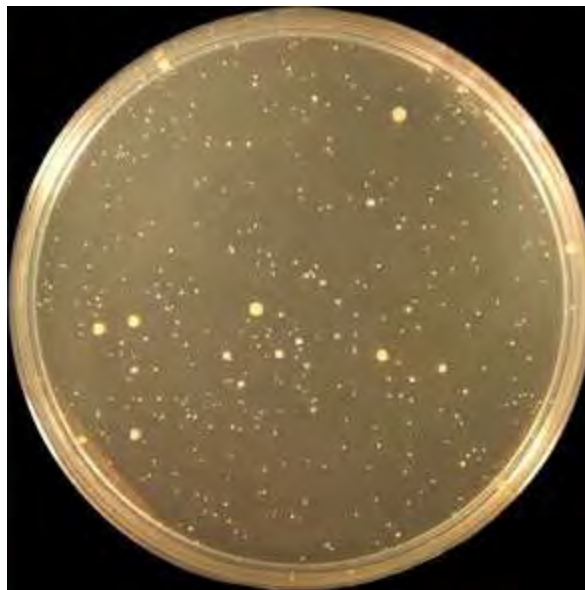
Άρα η τυπική απόκλιση θα είναι S.D. =  $11 \pm 5 \text{cfu/g}$ .

Η ίδια διαδικασία έγινε για όλα τα δείγματα μελιού.

**Πίνακας 5.** Βακτηριακό φορτίο ανά είδος μελιού(cfu/gr).

A/A	ΕΙΔΟΣ	ΗΜΕΡ/ΝΙΑ	ΠΑΡΑΓΩΓΟΣ	Cfu/gr ΚΑΙ Η ΤΥΠΙΚ Η ΑΠΟΚ ΛΙΣΗ
1	ΡΕΙΚΙ ΚΩΝΟΦΟΡΟ	20 ΜΑΙΟΥ 2009	ΔΡΥΜΟΣ ΣΚΥΡΙΤΙΔΟΣ ΒΛΑΧΟΚΕΡΑΣΙΑ ΑΡΚΑΔΙΑΣ	10±5
2	ΕΛΑΤΟ ΜΑΙΝΑΛΟΥ	15/6/2010	ΛΕΙΒΙΔΙ ΑΡΚΑΔΙΑΣ	-
3	ΕΛΑΤΟ ΒΑΝΙΛΙΑ ΜΑΙΝΑΛΟΥ	15/6/2009	ΛΕΙΒΙΔΙ ΑΡΚΑΔΙΑΣ	-
4	ΕΛΑΤΟ ΒΑΝΙΛΙΑ ΜΑΙΝΑΛΟΥ	15/6/2008	ΛΕΙΒΙΔΙ ΑΡΚΑΔΙΑΣ	12±5
5	ΚΟΥΜΑΡΙΑ ΚΑΙ ΡΕΙΚΙ	30/11/2010	ΚΑΛΤΕΤΖΕΣ ΑΡΚΑΔΙΑΣ	12±5
6	ΚΑΣΤΑΝΙΑ	ΙΟΥΛΙΟΣ 2009	ΑΝΩ ΔΟΛΝΑ ΑΡΚΑΔΙΑΣ	-
7	ΠΕΥΚΟ	2010	ΘΑΣΟΣ	16±5
8	ΜΕΝΤΑ,ΡΙΓΑΝΗ,ΤΣΑΙ	2010	ΔΥΤΙΚΟΣ ΟΛΥΜΠΟΣ	8±0
9	ΑΚΑΚΙΑ	2010	ΟΛΥΜΠΟΣ	22±11
10	ΑΓΡΙΟΒΟΤΑΝΑ ΚΑΙ ΘΥΜΑΡΙ	2010	ΑΝ.ΟΛΥΜΠΟΣ	43±5
11	ΚΟΥΜΑΡΙΑ	2010	ΝΟΤΙΟ ΠΗΛΙΟ	7±0
12	ΑΝΘΟΜΕΛΟ:ΠΟΛΥΚΟ ΜΠΟΣ ΚΑΙ ΚΡΟΚΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2009	ΚΡΟΚΟΣ ΚΟΖΑΝΗΣ	8±0
13	ΑΝΘΟΜΕΛΟ	15/6/2010	ΚΡΟΚΟΣ ΚΟΖΑΝΗΣ	12±6
14	ΑΝΘΟΜΕΛΟ	ΙΟΥΛΙΟΣ 2010	ΒΟΥΡΙΚΑΣ	8±0
15	ΠΟΛΥΚΟΜΠΟΣ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2010	ΓΥΡΩ ΑΠΟ ΤΗ ΛΙΜΝΗ ΚΕΡΚΙΝΗ,ΚΕΝ.ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ	-
16	ΕΥΚΑΛΥΠΤΟΣ	ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ 2010	ΕΠΑΡΧΙΑ ΛΕΥΚΩΣΙΑΣ	24±5
17	ΘΥΜΑΡΙ	ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ 2010	ΛΕΜΕΣΟΣ	21±6
18	ΜΑΡΑΘΟΣ	ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ 2010	ΕΠΑΡΧΙΑ ΛΕΥΚΩΣΙΑΣ	7±0
19	ΗΛΙΑΝΘΟΣ	2010	ΚΟΜΟΤΗΝΗ	24±7
20	ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ:80% ΑΝΘΗ ΠΟΡΤΟΚΑΛΙΑΣ	2010	ΑΡΓΟΣ	8±0
21	ΒΑΜΒΑΚΙ:20% ΑΛΛΑ ΑΝΘΗ	2010	ΣΕΡΡΕΣ	30±6
22	ΘΥΜΑΡΙ:30% ΓΥΡΕΟΚΟΚΚΟΙ	2010	ΚΡΗΤΗ	45±6
23	ΚΑΣΤΑΝΙΑ ΜΕ ΛΙΓΟ ΠΕΥΚΟ	2010	ΑΓΙΟ ΟΡΟΣ	23±6
24	ΚΟΥΜΑΡΙΑ	2010	ΠΗΛΙΟ	13±3

25	ΤΣΑΙ ΚΑΙ ΡΙΓΑΝΗ	2010	ΣΟΥΡΠΗ ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	34±5
26	ΜΕΛΙ ΑΝΘΕΩΝ: ΑΓΡΙΑ ΡΙΓΑΝΗ ΚΑΙ ΑΓΡΙΟ ΤΡΙΦΥΛΛΙ	2010	ΟΡΕΙΝΑ ΛΕΙΒΑΔΙΑ ΚΑΙ ΔΑΣΗ ΤΟΥ ΟΛΥΜΠΟΥ	156±44
27	ΚΑΣΤΑΝΙΑ	2010	ΠΗΛΙΟ	7±0
28	ΕΛΑΤΟ	2010	ΔΡΑΚΟΤΡΥΠΑ ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ	7±0
29	ΑΝΘΟΜΕΛΟ	2010	ΒΑΣΙΛΙΤΣΑ ΓΡΕΒΕΝΩΝ	9±0
30	ΒΕΛΑΝΙΔΙΑ	2010	ΠΗΛΙΟ	50±6
31	ΚΟΥΜΑΡΙΑ	2010	ΜΕΛΙΒΟΙΑ ΑΡΚΑΔΙΑΣ	8±0



**Εικόνα 3.** Μορφή βακτηριακών αποικιών σε Plate Count Agar (PCA).

[www.labm.com](http://www.labm.com)

### **3.2. Καταμέτρηση φορτίου μυκήτων**

Το φορτίο των μυκήτων καταμετρήθηκε σε κάθε ένα τριβλίο για κάθε μέλι χωριστά, σε θρεπτικό υπόστρωμα Oxytetracycline Glucose Yeast Extract (O.G.Y.E). Και πάλι έγιναν δυο επαναλήψεις και η διαδικασία εύρεσης του τελικού φόρτου για κάθε ένα δείγμα, ήταν η ίδια με την διαδικασία βακτηριακού φόρτου. Στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 6) φαίνεται το φορτίο των μυκήτων για κάθε μέλι.

**Πίνακας 6.** Φορτίο μυκήτων για κάθε μέλι(cfu/gr).

<b>A/A</b>	<b>ΕΙΔΟΣ</b>	<b>ΗΜΕΡ/ΝΙΑ</b>	<b>ΠΑΡΑΓΩΓΟΣ</b>	<b>Cfu/gr ΚΑΙ Η ΤΥΠΙΚ Η ΑΠΟΚ ΛΙΣΗ</b>
<b>1</b>	ΡΕΙΚΙ ΚΩΝΟΦΟΡΟ	20 ΜΑΙΟΥ 2009	ΔΡΥΜΟΣ ΣΚΥΡΙΤΙΔΟΣ ΒΛΑΧΟΚΕΡΑΣΙΑ ΑΡΚΑΔΙΑΣ	-
<b>2</b>	ΕΛΑΤΟ ΜΑΙΝΑΛΟΥ	15/6/2010	ΛΕΙΒΙΔΙ ΑΡΚΑΔΙΑΣ	19±5
<b>3</b>	ΕΛΑΤΟ ΒΑΝΙΛΙΑ ΜΑΙΝΑΛΟΥ	15/6/2009	ΛΕΙΒΙΔΙ ΑΡΚΑΔΙΑΣ	12±6
<b>4</b>	ΕΛΑΤΟ ΒΑΝΙΛΙΑ ΜΑΙΝΑΛΟΥ	15/6/2008	ΛΕΙΒΙΔΙ ΑΡΚΑΔΙΑΣ	10±0
<b>5</b>	ΚΟΥΜΑΡΙΑ ΚΑΙ ΡΕΙΚΙ	30/11/2010	ΚΑΛΤΕΤΖΕΣ ΑΡΚΑΔΙΑΣ	9±0
<b>6</b>	ΚΑΣΤΑΝΙΑ	ΙΟΥΛΙΟΣ 2009	ΑΝΩ ΔΟΛΝΑ ΑΡΚΑΔΙΑΣ	12±6
<b>7</b>	ΠΕΥΚΟ	2010	ΘΑΣΟΣ	15±7
<b>8</b>	ΜΕΝΤΑ,ΡΙΓΑΝΗ,ΤΣΑΙ	2010	ΔΥΤΙΚΟΣ ΟΛΥΜΠΟΣ	14±7
<b>9</b>	ΑΚΑΚΙΑ	2010	ΟΛΥΜΠΟΣ	19±0
<b>10</b>	ΑΓΡΙΟΒΟΤΑΝΑ ΚΑΙ ΘΥΜΑΡΙ	2010	ΑΝ.ΟΛΥΜΠΟΣ	27±6
<b>11</b>	ΚΟΥΜΑΡΙΑ	2010	ΝΟΤΙΟ ΠΗΛΙΟ	-
<b>12</b>	ΑΝΘΟΜΕΛΟ:ΠΟΛΥΚΟ ΜΠΟΣ ΚΑΙ ΚΡΟΚΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2009	ΚΡΟΚΟΣ ΚΟΖΑΝΗΣ	9±0
<b>13</b>	ΑΝΘΟΜΕΛΟ	15/6/2010	ΚΡΟΚΟΣ ΚΟΖΑΝΗΣ	15±7
<b>14</b>	ΑΝΘΟΜΕΛΟ	ΙΟΥΛΙΟΣ 2010	ΒΟΥΡΙΚΑΣ	-
<b>15</b>	ΠΟΛΥΚΟΜΠΟΣ	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2010	ΓΥΡΩ ΑΠΟ ΤΗ ΛΙΜΝΗ ΚΕΡΚΙΝΗ,ΚΕΝ.ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ	773±22 6
<b>16</b>	ΕΥΚΑΛΥΠΤΟΣ	ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ 2010	ΕΠΑΡΧΙΑ ΛΕΥΚΩΣΙΑΣ	10±0

17	ΘΥΜΑΡΙ	ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ 2010	ΛΕΜΕΣΟΣ	14±7
18	ΜΑΡΑΘΟΣ	ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ 2010	ΕΠΑΡΧΙΑ ΛΕΥΚΩΣΙΑΣ	-
19	ΗΛΙΑΝΘΟΣ	2010	ΚΟΜΟΤΗΝΗ	13±6
20	ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ:80% ΑΝΘΗ ΠΟΡΤΟΚΑΛΙΑΣ	2010	ΑΡΓΟΣ	9±0
21	ΒΑΜΒΑΚΙ:20% ΑΛΛΑ ΑΝΘΗ	2010	ΣΕΡΡΕΣ	13±6
22	ΘΥΜΑΡΙ:30% ΓΥΡΕΟΚΟΚΚΟΙ	2010	ΚΡΗΤΗ	10±5
23	ΚΑΣΤΑΝΙΑ ΜΕ ΛΙΓΟ ΠΕΥΚΟ	2010	ΑΓΙΟ ΟΡΟΣ	8±0
24	ΚΟΥΜΑΡΙΑ	2010	ΠΗΛΙΟ	7±0
25	ΤΣΑΙ ΚΑΙ ΡΙΓΑΝΗ	2010	ΣΟΥΡΠΗ ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	6±0
26	ΜΕΛΙ ΑΝΘΕΩΝ:ΑΓΡΙΑ ΡΙΓΑΝΗ ΚΑΙ ΑΓΡΙΟ ΤΡΙΦΥΛΛΙ	2010	ΟΡΕΙΝΑ ΛΕΙΒΑΔΙΑ ΚΑΙ ΔΑΣΗ ΤΟΥ ΟΛΥΜΠΟΥ	9±0
27	ΚΑΣΤΑΝΙΑ	2010	ΠΗΛΙΟ	-
28	ΕΛΑΤΟ	2010	ΔΡΑΚΟΤΡΥΠΑ ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ	8±0
29	ΑΝΘΟΜΕΛΟ	2010	ΒΑΣΙΛΙΤΣΑ ΓΡΕΒΕΝΩΝ	-
30	ΒΕΛΑΝΙΔΙΑ	2010	ΠΗΛΙΟ	12±6
31	ΚΟΥΜΑΡΙΑ	2010	ΜΕΛΙΒΟΙΑ ΑΡΚΑΔΙΑΣ	9±0



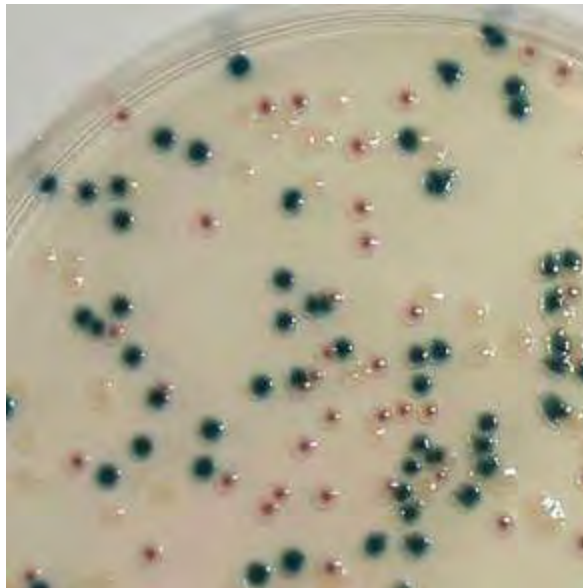
**Εικόνα 4.** Μορφή αποικιών μυκήτων σε Ο.Γ.Υ.Ε.

[www.labm.com](http://www.labm.com)

### 3.3. Ανίχνευση εντεροβακτηρίων

Παρουσία της *E.coli* στα τρόφιμα ή το νερό σημαίνει κοπρανώδη μόλυνση. Κοινώς αποκαλείται κολοβακτηρίδιο και είναι ιδιαίτερα κοινό βακτήριο στην φύση. Η λοιμογόνος δύναμη της *E.coli* γενικά δεν είναι μεγάλη. Η "δόση" υπολογίζεται στην τάξη των  $10^8$  ανά g ή ml τροφίμου. Υπάρχουν όμως και στελέχη *E.coli*, όπως τα *VTEC*, με έντονη λοιμογόνο δράση. Γενικά τα στελέχη της *E.coli* μπορούν να προκαλέσουν τροφική δηλητηρίαση με την ικανότητα προσκόλλησης στα κύτταρα του εντέρου και έκκρισης εντεροτοξινών ή διείσδυσης σε αυτά και πρόκλησης φλεγμονών. Στον άνθρωπο, το στέλεχος, με την ονομασία *Escherichia coli* O157:H7, είναι εκείνο που δημιουργεί προβλήματα υγείας (Vogt, 2005).

Όλα τα δείγματα μελιού ήταν αρνητικά στην παρουσία *E.coli*. Στο θρεπτικό υπόστρωμα Harlequin *E.coli*/Colifurm Medium δεν αναπτύχθηκαν καθόλου αποικίες.



**Εικόνα 5.** Μορφή αποικιών *E.coli* σε Harlequin *E.coli*/Colifurm Medium.

[www.labm.com](http://www.labm.com)

### **3.4. Gram<sup>+</sup> που απομονώθηκαν από τους διάφορους τύπους μελιών**

- **Bacillus cereus**

Το βασικό χαρακτηριστικό που κάνει το *Bacillus cereus* να ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα παθογόνα μικρόβια που ευθύνονται για τροφοδηλητηριάσεις είναι ο σχηματισμός θερμοάντοχων στο μαγείρεμα σπορίων κατά τη θερμική επεξεργασία μολυσμένων με *B. cereus* τροφίμων. Το *Bacillus cereus* έχει παθογόνο δράση με τον σχηματισμό τοξίνης. Για την αποφυγή τροφοδηλητηριάσεων από *B. cereus* απαιτείται διατήρηση των ετοιμών (μαγειρεμένων και μη) τροφίμων σε ψυχρές συνθήκες και για λίγο χρόνο. Τα περισσότερα στελέχη του αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες μεταξύ 10° και 42° C κυρίως σε αερόβιες συνθήκες (Gilliam, 1978).

- **Bacillus subtilis**

Το *B.subtilis* εκκρίνει διάφορα ένζυμα, όπως αμυλάση, πρωτεάση κ.α. Αποτελεί gram θετικό βακτήριο, που συνήθως βρίσκεται στο έδαφος. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής σπορίων είναι 25°C-35°C (Bandow et al.,2002).

- **Bacillus licheniformis**

Πρόκειται για ένα Gram θετικό βακτήριο, που συναντάται συνήθως στο χώμα και στα φτερά των πτηνών. Είναι θεμόφιλο και η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής του είναι 50°C, αν και μπορεί να επιβιώσει και σε υψηλότερες θερμοκρασίες (Edberg, 1992).

- **Bacillus safensis**

Είναι ένα βακτήριο εξαιρετικά ανθεκτικό στην υπεριώδη ακτινοβολία και λέγεται πώς έχει ανιχνευθεί στον πλανήτη Άρη (Ara, 2007). Τα σπόρια του αντέχουν τις σκληρές περιβαλλοντικές συνθήκες και έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούνται με τις κατάλληλες συνθήκες. Τα μεσόφιλα σπόριά του αναπτύσσονται στους 30-37°C, αλλά όχι σε θερμοκρασίες πάνω από 40-45°C (Masataka et al., 2006).

- **Bacillus pumilus**

Αποτελεί ένα αερόβιο gram θετικό βακτήριο, που σχηματίζει ραβδόμορφα σπόρια. Υπάρχει στο έδαφος, στο νερό, στον αέρα και στα αποσυντιθεμένα φυτά. Οι

καλύτερες θερμοκρασίες ανάπτυξης των σπορίων είναι μεταξύ 55°C και 60°C (Kumar, 2002).

- *Staphylococcus xylosus*

Πρόκειται για ένα gram θετικό βακτήριο, το οποίο παράγει οξύ τόσο αερόβια, όσο και αναερόβια. Αποτελεί κοινό παράσιτο των ανθρώπων και των ζώων (δέρμα, βλεννογόνοι), ενώ απομονώνεται από μια μεγάλη ποικιλία τροφίμων. Ανάπτυξη παρατηρείται από 35°C και άνω (Karl H. et al., 1975).

- *Staphylococcus saprophyticus*

Είναι ένα gram θετικό υπεύθυνο για λοιμώξεις και κυρίως ουρολοιμώξεις. Παράγει καταλάση, ένα ένζυμο που διασπά το υπεροξειδίο του οξυγόνου (Kuroda M. et al., 2005).

### **3.5. Μοριακή ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών**

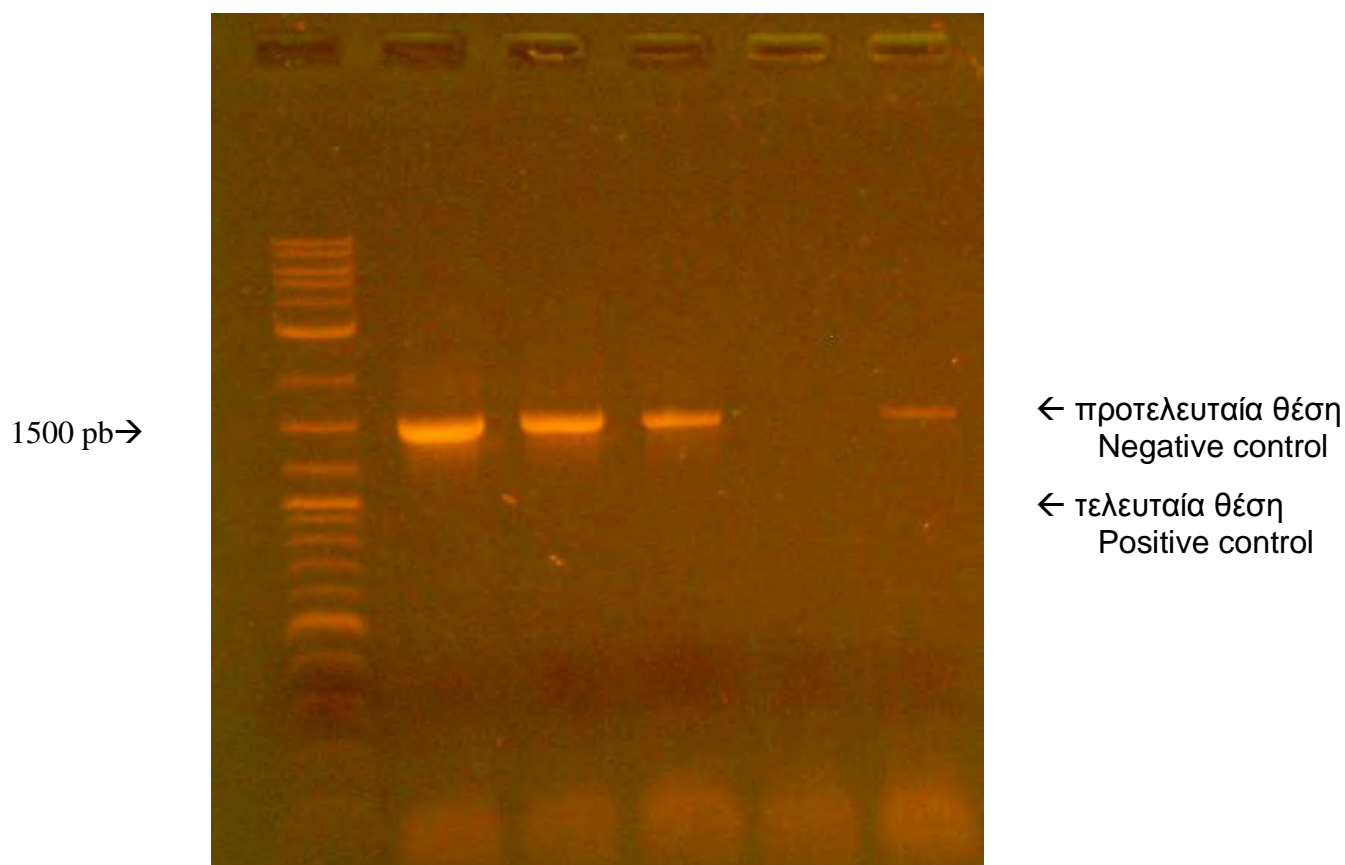
Η ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών, που απομονώθηκαν βασίστηκε στην ενίσχυση του γενετικού τύπου του 16S rRNA με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και στην αλληλούχιση αυτού για τον ακριβή προσδιορισμό της ταυτότητας του.

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

Στην παρακάτω εικόνα (Εικ.6) παρουσιάζονται κάποια από τα προϊόντα, τα οποία κατά την ηλεκτροφόρηση εμφανίστηκαν στο αναμενόμενο ύψος των 1500 βάσεων περίπου. Στο προτελευταίο πηγαδάκι «φορτώθηκε» το αρνητικό control (negative



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



**Εικόνα 6.** Τα τρία πρώτα πηγαδάκια περιέχουν DNA προϊόν, το τέταρτο το negative control και το τελευταίο το positive control.

Τα προϊόντα της PCR αλληλουχίστηκαν. Η αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου κάθε στελέχους συγκρίθηκε, με την βοήθεια του προγράμματος BLAST και RDP (Παράρτημα I), με την αντίστοιχη αλληλουχία όλων των γνωστών βακτηριακών γονιδιωμάτων και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη σύγκριση αυτή μέσω BLAST φαίνονται στους παρακάτω πίνακες :

Πίνακες 7-11. Αποτελέσματα σύμφωνα με το Blast Basic Local Alignment Search Tool.

## 10H4

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">JF322973.1</a>	Bacillus subtilis strain 1145 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1133</u>	1133	100%	0.0	99%
<a href="#">JF322942.1</a>	Bacillus subtilis strain 1034 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1133</u>	1133	100%	0.0	99%
<a href="#">JF795476.1</a>	Bacillus sp. HTS126 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1133</u>	1133	100%	0.0	99%
<a href="#">GQ340512.1</a>	Bacillus licheniformis strain M107 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1133</u>	1133	100%	0.0	99%
<a href="#">HQ336645.1</a>	Bacillus licheniformis strain W14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1133</u>	1133	100%	0.0	99%
<a href="#">HQ238460.1</a>	Bacillus licheniformis strain S522B-39 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1133</u>	1133	100%	0.0	99%
<a href="#">JF309230.1</a>	Bacillus sp. 3560BRRJ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1133</u>	1133	100%	0.0	99%
<a href="#">JF309229.1</a>	Bacillus sp. 3547BRRJ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1133</u>	1133	100%	0.0	99%

## 21H5

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">HQ696447.1</a>	Bacillus safensis strain KTT-25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1164</u>	1164	100%	0.0	99%
<a href="#">HQ696430.1</a>	Bacillus safensis strain KTT-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1164</u>	1164	100%	0.0	99%
<a href="#">HQ696405.1</a>	Bacillus safensis strain KTT-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1164</u>	1164	100%	0.0	99%
<a href="#">AB666457.1</a>	Bacillus sp. MaI11-9 gene for 16S rRNA, partial sequence	<u>1164</u>	1164	100%	0.0	99%
<a href="#">JN540803.1</a>	Bacillus pumilus strain FJAT-10687 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1164</u>	1164	100%	0.0	99%
<a href="#">HM026299.1</a>	Bacillus sp. MJT9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1164</u>	1164	100%	0.0	99%
<a href="#">HM026212.1</a>	Bacillus sp. MJBC19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1164</u>	1164	100%	0.0	99%

# 31H1

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
<u>AB641886.1</u>	Staphylococcus sp. NCCP-277 gene for 16S rRNA, partial sequence	<u>1118</u>	1118	100%	0.0	100%
<u>HQ634945.1</u>	Staphylococcus sp. k-4(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1118</u>	1118	100%	0.0	100%
<u>HQ238893.1</u>	Bacillus safensis strain Z2B-72 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1118</u>	1118	100%	0.0	100%
<u>HQ238867.1</u>	Staphylococcus xylosus strain Z2B-71 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1118</u>	1118	100%	0.0	100%
<u>HQ238730.1</u>	Staphylococcus saprophyticus strain J9B-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1118</u>	1118	100%	0.0	100%
<u>HQ238663.1</u>	Staphylococcus xylosus strain Z8B-65 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1118</u>	1118	100%	0.0	100%
<u>HQ238655.1</u>	Staphylococcus sp. Z8B-48 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1118</u>	1118	100%	0.0	100%
<u>HQ238595.1</u>	Staphylococcus xylosus strain S433Ba-79 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1118</u>	1118	100%	0.0	100%
<u>JF088977.1</u>	Uncultured bacterium clone ncd1277f12c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1118</u>	1118	100%	0.0	100%
<u>HM822023.1</u>	Uncultured bacterium clone nby400h11c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1118</u>	1118	100%	0.0	100%
<u>HM822018.1</u>	Uncultured bacterium clone nby400h02c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1118</u>	1118	100%	0.0	100%

# 31H3

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
<u>FR873790.1</u>	Staphylococcus sp. CFC2P.21 partial 16S rRNA gene, isolate CFC2P.21	<u>1109</u>	1109	100%	0.0	100%
<u>HM584049.1</u>	Staphylococcus saprophyticus strain CAIM 1047 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1109</u>	1109	100%	0.0	100%
<u>HM073702.1</u>	Uncultured Staphylococcus sp. clone DH02_50 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1109</u>	1109	100%	0.0	100%
<u>FJ155342.1</u>	Staphylococcus xylosus strain Sn21-040808 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1109</u>	1109	100%	0.0	100%
<u>AY731373.1</u>	Staphylococcus sp. GWS-AG-H62 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1105</u>	1105	100%	0.0	99%
<u>JF232862.1</u>	Uncultured bacterium clone ncd2681h12c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1103</u>	1103	100%	0.0	99%
<u>JF221429.1</u>	Uncultured bacterium clone ncd2684e02c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1103</u>	1103	100%	0.0	99%
<u>JF221373.1</u>	Uncultured bacterium clone ncd2681g10c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1103</u>	1103	100%	0.0	99%
<u>EU637642.1</u>	Bacterium C-TJ35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1101</u>	1101	100%	0.0	99%
<u>EU660431.1</u>	Bacterium ID4404 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1099</u>	1099	100%	0.0	99%
<u>HM026222.1</u>	Staphylococcus sp. MJBC34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1098</u>	1098	100%	0.0	99%
<u>JF322987.1</u>	Staphylococcus sp. 1146(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1098</u>	1098	100%	0.0	99%

# 18H3

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<u>HQ696447.1</u>	Bacillus safensis strain KTT-25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1120</u>	1120	100%	0.0	100%
<u>HQ696430.1</u>	Bacillus safensis strain KTT-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1120</u>	1120	100%	0.0	100%
<u>JN210575.1</u>	Bacillus pumilus strain AU_SW4_M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1120</u>	1120	100%	0.0	100%
<u>HQ453403.1</u>	Bacillus sp. cs-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1120</u>	1120	100%	0.0	100%
<u>JF266571.1</u>	Bacillus sp. 05-4004 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1120</u>	1120	100%	0.0	100%
<u>HQ241829.1</u>	Bacillales bacterium TB4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1120</u>	1120	100%	0.0	100%
<u>HQ711448.1</u>	Bacillus sp. Qira18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1120</u>	1120	100%	0.0	100%

**Πίνακας 12.** Χαρακτηρισμός βακτηρίων που απομονώθηκαν κατά την ανάλυση αλληλουχίας.

ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΜΗΚΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	MAX IDENT
10H4	619	<i>Bacillus sp.</i>	99%
21H5	638	<i>Bacillus sp.</i>	99%
31H1	605	<i>Staphylococcus sp.</i>	100%
31H3	600	<i>Staphylococcus sp.</i>	99,5%
18H3	606	<i>Bacillus sp.</i>	100%

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα η 16S rRNA ταυτοποιεί σε επίπεδο είδους μόνο στελέχη βακτηρίων που παρουσιάζουν πολύ μεγάλη ομοιότητα  $\geq 99$ . Οργανισμοί

που δε μπορούν να ταξινομηθούν λόγω της χαμηλής σχέσης τους ως προς τα ήδη περιγραφόμενα είδη και εξαιτίας της μοναδικής φυλογενετικής θέσης τους, χρειάζονται νέα έρευνα προκειμένου να λάβουν ειδικό ταξινομικό χαρακτήρα. (Stackebrandt et al., 1994).

Οπότε τα 5 δείγματα ταυτοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα αυτών παρουσιάζονται παρακάτω (πίνακες 8-12). Από αυτά τα τρία ήταν του γένους *Bacillus* και δυο του γένους *Staphylococcus*.

Όσον αφορά τον χαρακτηρισμό σε επίπεδο είδους και τα 5 βακτήρια, εμφάνισαν ομοιότητα 99%-100%. Το δείγμα 10H4 (μέλι αγριοβοτάνων και θυμαριού) εμφάνισε το βακτηριακό στέλεχος *Bacillus*. Τα δυο κοντινότερα βακτηριακά είδη είναι το *B.licheniformis* και το *B.subtilis* με ποσοστό ομοιότητας 99%. Το 21H5 (μέλι βαμβακιού-20%άλλα άνθη) έδωσε επίσης στελέχη *Bacillus*, με κοντινότερα είδη το *B.pumilus* και το *B.safensis* σε ποσοστό ομοιότητας 99% για το καθένα. Εν συνεχεία, το δείγμα 31H1(μέλι κουμαριάς) παρουσίασε βακτηριακά στελέχη *Staphylococcus*, με κοντινότερα είδη το *S.xylosus* και το *S.saprophyticus* σε ποσοστό ομοιότητας 100%. Ανάλογο αποτέλεσμα παρουσίασε και το μέλι 31H3 (μέλι κουμαριάς), όπου τα στελέχη του ήταν 100% *S.xylosus*. Τέλος το δείγμα 18H3 (μάραθος) εμφάνισε κατά 100% στελέχη *Bacillus*, με κοντινότερα είδη τα *B.pumilus* και *B.safensis*.

**Πίνακας 13.** Αποτελέσματα κατάταξης βακτηριακών ειδών σύμφωνα με το RDP (Ribosomal Database Project).

<b>ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ</b>	<b>CLASSIFIER</b>
<b>10H4</b>	<b>domain :Bacteria</b> <b>phylum :''Firmicutes''</b> <b>class :''Bacilli''</b> <b>order :Bacillales</b> <b>family :Bacillaceae</b> <b>genus :Bacillus</b>
<b>21H5</b>	<b>domain :Bacteria</b> <b>phylum :''Firmicutes''</b> <b>class :''Bacilli''</b> <b>order :Bacillales</b> <b>family :Bacillaceae</b> <b>genus :Bacillus</b>

<b>31H1</b>	<b>domain :Bacteria</b> <b>phylum : "Firmicutes"</b> <b>class : "Bacilli"</b> <b>order :Bacillales</b> <b>family : "Staphylococcaceae"</b> <b>genus :Staphylococcus</b>
<b>31H3</b>	<u><b>domain :Bacteria</b></u> <u><b>phylum : "Firmicutes"</b></u> <u><b>class : "Bacilli"</b></u> <u><b>order :Bacillales</b></u> <u><b>family : "Staphylococcaceae"</b></u> <u><b>genus :Staphylococcus</b></u>
<b>18H3</b>	<u><b>domain :Bacteria</b></u> <u><b>phylum : "Firmicutes"</b></u> <u><b>class : "Bacilli"</b></u> <u><b>order :Bacillales</b></u> <u><b>family :Bacillaceae</b></u> <u><b>genus :Bacillus</b></u>

#### **4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Το μέλι είναι ένα αρωματικό, ιξώδες, 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 (Sacket, 1919).

Στην παρούσα μελέτη, έγινε εκτίμηση της μικροβιακής ποιότητας των διαφόρων Ελληνικών τύπων μελιού και κατά πόσο αυτά είναι ασφαλή για τον καταναλωτή.

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος 31 δειγμάτων μελιού, από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου. Ο έλεγχος αφορούσε την καταμέτρηση του βακτηριακού τους φόρτου και του φορτίου μυκήτων. Επιπλέον έγινε έλεγχος για την παρουσία εντεροβακτηρίων σε αυτά. Όλες αυτές οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν με την χρήση κατάλληλου θρεπτικού μέσου και τη καταμέτρηση αποικιών που αναπτύχθηκαν σε αυτά. Τέλος, απομονώθηκαν gram θετικά βακτήρια και με την βοήθεια της PCR, πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση κάποιων από αυτά.

Γενικά ο βακτηριακός φόρτος των ελληνικών τύπων μελιού ήταν σε χαμηλά επίπεδα. Σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Αργεντινή (Lurlina M., Fritz R., 2005), με σκοπό να προσδιοριστεί η μικροβιακή ποιότητα των μελιών της χώρας τους για τα 70 δείγματα που πραγματοποιήθηκε η μελέτη, οι μύκητες και τα βακτήρια παρουσίασαν ένα εύρος γύρω στα 103cfu/gr. Έγινε με την ίδια διαδικασία καταμετρώντας βακτηριακές αποικίες και αποικίες μυκήτων.

Όσον αφορά το φορτίο των μυκήτων επίσης ήταν σχετικά χαμηλό. Εξαίρεση αποτελεί το μέλι πολυκόμπου, από τη κεντρική Μακεδονία, στο οποίο εμφανίστηκε ανάπτυξη αποικιών μυκήτων σε υψηλότερα επίπεδα, της τάξεως 773±226cfu/gr. Ανάλογη επιστημονική έρευνα (Sacket et al, 1919), παρουσίασε την ευαισθησία του μελιού στους μύκητες και τα βακτήρια, σε σχέση με το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης.

Αν και έγινε έλεγχος για εντεροβακτήρια, δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα μέλι αποικία τους. Ανάλογη ερευνητική εργασία στην Ιταλία (Tyssey and Russeau, 1981), εμφάνισε σχεδόν το 85% των δειγμάτων (50 δείγματα) καθαρό από εντεροβακτήρια και ιδιαίτερα *E.coli*. Αντίθετα βρέθηκε κυρίαρχος ο μύκητας *Succhuromyces spp.*, σε ποσοστό 10%.



Δεν ταυτοποιήθηκαν αποικίες *B.cereus*, αν και απομονώθηκαν κάποιες με τα χαρακτηριστικά του. Η ταυτοποίηση πρέπει να γίνει με 16S rRNA.

Τέλος για πολλά βακτήρια δεν ήταν εφικτή η ταυτοποίηση, λόγω προβλημάτων με την PCR ή την απομόνωση ικανοποιητικής ποσότητας ποσότητας/ποιότητας DNA.

Συμπερασματικά η μικροβιακή ποιότητα των ελληνικών μελιού είναι πολύ ικανοποιητική. Για την συνέχιση αυτής της δουλειάς θα γίνει προσπάθεια ταυτοποίησης περισσότερων gram θετικών βακτηρίων.

Επίσης μια άλλη παράμετρος που πρέπει να μελετηθεί, είναι η παρουσία σπορίων *Clostridium*, των οποίων η παρουσία εγκυμονεί κινδύνους για τον καταναλωτή και την υγεία του.

## **5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### **ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Δερματόπουλος Β., (1949) Βασικές γνώσεις σύγχρονης μελισσοκομίας. Έκδοση Μελισσοκομικού Συνεταιρισμού Θεσσαλονίκης. σελ. 40-41.
2. Θρασυβούλου Α., (2001) Πρακτική Μελισσοκομία- Προβλήματα, αιτίες και λύσεις. Θεσσαλονίκη. σελ. 147-156, 171.
3. Θρασυβούλου Α. και Μανίκης Ι., (1990) Κατηγορίες Ελληνικού Μελιού 4(6) : 158-163.
4. Κατής Ι.Ν., Μαλιόγκα Ι.Β., (2000) Διαγνωστική Ιολογία, Εκδόσεις Γαρταγάνη. σελ. 25-30.
5. Λαυρεντιάδης Γ., (1983) Συστηματική Βοτανική, Μέρος Β. Εκδόσεις Υπηρεσία Δημοσιευμάτων. σελ. 18-19.
6. Μπίκος Θ., (1991) Όλα για το μέλι. Έκδοση του ιδίου. σελ. 263-270.
7. Οικονόμου Δ., Ταλαμάγκας Π., Σχοινάς Β. και Τσουκνίδης Α., (1987) Η Μελισσοκομία στην Ελλάδα. Εκδόσεις Αγροτικής Τράπεζας, Διεύθυνση Ζωικής παραγωγής.
8. Παππάς Ν., (1998) Η γύρη και η συλλογή της 2(4) : 106-110.
9. Σταθόπουλος Κ., (1993) Υγιεινή και διατροφική αξία του μελιού. Πρακτικά εκδήλωσης της επιτροπής προώθησης του Ελληνικού μελιού. Αθήνα
10. Τσέλλιος Δ. και Θρασυβούλου Α., (1989) Μελισσοκομικοί χειρισμοί και μελισσοκομικά φυτά 2 (7-8) : 208-220.
11. Υφαντίδη Μ., (1983) Μελισσοκομία, επιστήμη και εφαρμογή. Εκδόσεις Τσολακοπούλου, Θεσσαλονίκη. σελ. 56-67.
12. Χαριζάνης Π., (1996) Μέλισσα και μελισσοκομική τεχνική. Έκδοση Μελισσοκομική Επιθεώρηση, σελ. 263-267.

## **ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J of Mol. Biol.* Vol 215 (3):403-410.
2. Allen K.L., Molan P.C., Reid G.M., (1991) A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys *J. Pharm. Pharmacol* 43(12): 817-822.
3. Ara K., (2007) *Bacillus minimum* genome factory effective utilization of microbial genome information. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 46(3):169-178.
4. Bandow J.E., Britz H., Hecker M., (2002) *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology.* 184(2):459-467.
5. Bartlett J.M., Stirling D. (2003) A short history of the Polymerase Chain Reaction 226.pp 3-6.
6. Beetlestone F. (1994) Botulism spores and honey. *Am. Bee. J* 134(7): 471-473.
7. Berg J.M., Tymoczko J.L. and Styer L. (2002) *Biochemistry* (5<sup>th</sup> ed) WH freeman.
8. Berthold R. (1997) Medicinal use of honey in folk medicine. *American Bee Jourval* 12 : 872-874.
9. Bryant j., (1766) A new system : An analysis of ancient mythology. Pp 299-233.
10. Bustin S.A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.
11. Chinou I., Karapati C., Roussis V., Mazavuenos B.E., Chinou E., Golemati-Persidou N. (1998) Volatile constituents from 20 Greek bee-honeys and their antibacterial spectrum 46<sup>th</sup> Annual Congress, Society for Medicinal Plant Research Vienna.
12. Crane B., (1980) A book of honey. Oxford University Press, Oxford, U.K.
13. Edberg S.C., (1992) Human healthy assessment. *Bacillus licheniformis*, U.S. Enviromental protection Agency, Washigton, D.C.
14. Frank J.E. (2004) Historical notes on botulism, *Clostridium botulinum*, notulinumtoxin 19 : 22-26.
15. Gilliam M., (1978)Bacteria belonging to the genus *Bacillus* isolated from selected argans of queen honey bees, *Apis mellifera*. *J. Invert. Pathol.* 31.
16. Hepburn H.R. (1986) The nectar flow-An experimental Natural History. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Paris, London pp.199-201.

17. Joirisch N.P. (1970) Curative properties of honey and bee renom. Foreign languages Publishing House. Μετάφραση στα ελληνικά N. Τοπαλίδης (Μελισσοκομική Ελλάς) (20) : 42-43, (231) : 84-86, (232) : 115-117, 146-148.
18. Karl H. Schleifer and Wesley E. Kloos (1975) Isolation and characterization of *Staphylococcus xylosus* from human skin. 25:50-61.
19. Krochmol C. (1994) The healing powers of honey. Am. Bee. J. (7) : 470-473.
20. Krochmol C. (1999) Poison honeys. Am. Bee. J. 134(8) : 549-559.
21. Kumar C.G., (2002) Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophylic *Bacillus pumilus*. 34:18-30.
22. Kuroda M., Yamashida A., Hirakawa H (2005) Whole genome sequence of *staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary track infection. 102(37):13272-77.
23. Larson, Jennifer (2001) Greek Nymphs : Myth, Cult, Lore. Oxford University Press pp. 88.
24. Masataka S., Myron T.La Duc and Venkateswaran K., (2006) *Bacillus safensis* sp. Isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. International journal of systematic and Evolutionary Microbiology. 56(8):1735-1740.
25. McMeekin T.A., Chandler R.E., Doe P.E., Garland C.D., Olley J., Putro S., Ratkowsky D.A., (1987) Model for combined effect of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosus*. 62(6):543-550.
26. Nakano H. and Sakacuchi G. (1991) An unusually heavy contamination of honey products by *Clostridium botulinum* type F and *Bacillus*. FEMS Microbiol. Lett. (79) : 171-178.
27. National Honey Board Carbohydrates and the sweetness of honey (2010).
28. Piana M.L., Poda G., Cesaroni D., Cuetti L., Bucci M.A. and Gotti P. (1991) Research on microbial characteristics of honey samples of udine province. Riv. Soc. Ital. Sci. Aliment.
29. Root A.I. (1983) The ABC and XYZ of bee culture. The A.I. Root Co., Medina, OH.
30. Rychlik W., Spencer W.J., Rhoads R.E.(1990) Optimization of the anuealing temperature for DNA amplification in vitro. Nucl Acids Res 18(21) : 6409-6412.
31. Sacket W.G. (1919) Honey as a carrier of intestinal diseases. Col. St. Univ. Agr. Expt. Sta. Ft. Collins. Colorado, pp. 18.

32. Seeley T.D. (1985) Honeybee ecology. Princeton University Press, USA.
33. Snowdon J.A. and Cliver D.O. (1995) Microorganisms in honey, *International Journal of Food Microbiology* (31) : 1-26
34. Spilker T., Coenye T., Vandamme P. and Li Puma J.J. (2004) PCR-Based Assay for differentiation of *Pseudomonas Auruginosa* from other *Pseudomonas* Species. *J. clin. Microbiol.*
35. Stackebrandt E. and Goebel B.M. (1994) Taxonomic note : a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int.J.Syst Bacteriol* 44:846-849.
36. Tysset C. and Durand C. (1968) Contribution to the study of the intestinal microbism of healthy foraging bees : inventory of the gram-negative bacterial populations, Fourth report. *Bull. Apicole* (11) : 107-118.
37. Tysset C. and Rousseau M. (1981) Problem of microbes and hygiene of commercial honey. *Rev. Med. Vet.* (132) : 591-600.a.
38. Vogt R.L. (2005) E.coli 0157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef 120(2): 174-178.
39. Wadhan H. (1998) Causes of the antimicrobial activity of honey. 26(1): 26-31.
40. White J.W., Jr., Subers M.H. and Schepartz A.I. (1962a) The identification of inhibine the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochim. Biophys. Acta.* (73): 57-79.
41. Wilkins A.L., Yinrong L. (1993) Extractable organic substances from New Zeland Unifloral Mnuka (*Leptospermum Scoparium*) Honey *Journal of Apicultural Research* 32(1) : 3-9.
42. Winston L.M. (1987) The biology of the honey bee. Harvard University Press Cambridge, Massachusetts, London, England, pp.281.

## ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

- <http://www.melinet.gr/>
- <http://melissoktima.blogspot.com/>
- <http://www.greek-honey.gr/index.php>
- <http://www.mednutrition.gr/>
- <http://www.iatronet.gr/>
- <http://www.melostagma.gr/>
- <http://www.bees.gr/>
- <http://www.dromostherapeia.gr/>
- <http://www.medlook.net/>
- <http://www.herbscancure.com/>
- <http://el.wikipedia.org/>
- <http://findarticles.com/>
- <http://www.melifera.gr/>
- <http://beelab.agro.auth.gr/>
- <http://www.iatrikionline.gr/>
- <http://www.iama.gr/ethno/>
- <http://www.labm.com/>
- <http://www.molecularstation.com/>
- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- <http://rdp.cme.msu.edu/>

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1. Στοιχεία μελιών που χρησιμοποιήθηκαν

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



16	ΕΥΚΑΛΥΠΤΟΣ	ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ 2010	Επαρχία Λευκωσίας	Κυπριακό μέλι HoneyMell zp.lt.4 Νίκου Δημητρίου 3913 Λάρνακα
17	ΘΥΜΑΡΙ	ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ 2010	Λεμεσός	Κυπριακό μέλι HoneyMell zp.lt.4 Νίκου Δημητρίου 3913 Λάρνακα
18	ΜΑΡΑΘΟΣ	ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ 2010	Επαρχία Λευκωσίας	Κυπριακό μέλι HoneyMell zp.lt.4 Νίκου Δημητρίου 3913 Λάρνακα
19	ΗΛΙΑΝΘΟΣ	2010	Κομοτηνή	Αγροτικός Μελισσοκομικός συναιτερισμός Νικήτης Χαλκιδικής
20	ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ: σχεδόν 80% από άνθη πορτοκαλιάς	2010	Άργος	Αγροτικός Μελισσοκομικός συναιτερισμός Νικήτης Χαλκιδικής
21	ΒΑΜΒΑΚΙ: με 20% περίπου άλλων ανθέων	2010	Σέρρες	Αγροτικός Μελισσοκομικός συναιτερισμός Νικήτης Χαλκιδικής
22	ΘΥΜΑΡΙ: γυρεόκκοκοι 30%	2010	Κρήτη	Αγροτικός Μελισσοκομικός συναιτερισμός Νικήτης Χαλκιδικής
23	ΚΑΣΤΑΝΙΑ με λίγο Πεύκο	2010	Άγιο Όρος	Αγροτικός Μελισσοκομικός συναιτερισμός Νικήτης Χαλκιδικής
24	ΚΟΥΜΑΡΙΑ	2010	Πήλιο	Σαμαράς Γιώργος Κέντρο Μελισσοκομίας Θεσσαλίας (Βόλος) Παραγωγός: Ελευθερία Κασσαβέτη
25	ΤΣΑΙ ΚΑΙ ΡΙΓΑΝΗ	2010	Σούρπη Μαγνησίας	Σαμαράς Γιώργος Κέντρο Μελισσοκομίας Θεσσαλίας (Βόλος)
26	ΜΕΛΙ ΑΝΘΕΩΝ: ΑΓΡΙΑ ΡΙΓΑΝΗ ΚΑΙ ΑΓΡΙΟ ΤΡΙΦΥΛΛΙ	2010	Ορεινά λιβάδια και δάση του Ολύμπου	Σαμαράς Γιώργος Κέντρο Μελισσοκομίας Θεσσαλίας (Βόλος)

27	ΚΑΣΤΑΝΙΑ	2010	Πήλιο	Σαμαράς Γιώργος Κέντρο Μελισσοκομίας Θεσσαλίας (Βόλος) Παραγωγός: Ελευθερία Κασσαβέτη
28	ΈΛΑΤΟ	2010	Δρακότρυπα Ν.Καρδίτσας	Σαμαράς Γιώργος Κέντρο Μελισσοκομίας Θεσσαλίας (Βόλος)
29	ΑΝΘΟΜΕΛΟ	2010	Βασιλίτσα Γρεβενών	Λόλας Πέτρος
30	ΒΕΛΑΝΙΔΙΑ	2010	Πήλιο	Αρβανίτης Μελίχρυσος
31	ΚΟΥΜΑΡΙΑ	2010	Μελιβοΐα Αρκαδίας	Κα Γιάννα

## Οι αλληλουχίες του πειράματος

### **10H4 (619 letters)**

GCTTGCTCCCTTAGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG  
GGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAACCGGG  
GCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATYATAA  
AAGGTGGCTTTYAGCTACCACTTGCAGATGGACCCGCGGCGCA  
TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCG  
TAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC  
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC  
GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAT  
GAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAA  
GTRCCGTTCTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGA  
AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA  
GGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGC  
AGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCG  
GGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGG  
AGAGTGGAATTCCACGTGTAGCG

### **21H5 (638 letters)**

TTGCTCCCKGATGTTAGCGGCGGACGGGTGWAGTAACACGTG  
GGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAACCGGW  
GCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGA  
AAGACGGTTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCAT  
TAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGT  
AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA  
CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC  
AATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA  
AGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT  
GCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAG  
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG  
GCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGC  
GGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGA  
GGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG  
TGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGA

### **31H1 (605 letters)**

GCTTGCTCCTTTGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT  
GGGTAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGG  
AGCTAATACCGGATAACATTTAGAACCGCATGGTTCTAAAGTG  
AAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACCCGCGCCGTAT  
TAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATACGT  
AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAACA  
CGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC  
AATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA  
AGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGAACAAAT  
GTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGGTACCTAATCAGAAAG  
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG  
GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGC  
GGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGA  
GGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAG  
TGGAATT

### **31H3 (600 letters)**

GATAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAG  
TAACACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG  
AAACCGGAGCTAATACCGGATAACATTTGGAACCGCATGGTTC  
TAAAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACCCGC  
GCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAAC  
GATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAC  
TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA  
TCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTG  
AGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTATTAGGGA  
GAACAAATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGGTACCTAA  
TCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT  
ACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCG  
CGCGTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTC  
AACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGA  
AGA

### **18H3 (606 letters)**

GTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGG  
GAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTT  
CAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCC  
GCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCG  
ACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG  
ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG  
AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGT  
GAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA  
AGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTA  
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA  
TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGG  
GCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCT  
CAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAG  
AAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG  
AGATGTGGA