



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ  
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ  
ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΜΕΛΙΩΝ ΤΟΥ ΟΛΥΜΠΟΥ»



ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΥΣ ΕΛΕΝΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2018

«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ  
ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΜΕΛΙΩΝ ΤΟΥ ΟΛΥΜΠΟΥ»

"INVESTIGATING THE RESISTANCE OF PATHOGENIC  
BACTERIA AGAINST OLYMPUS HONEY"

### **Τριμελής επιτροπή:**

**Μόσιαλος Δημήτριος (επιβλέπων):** Επίκουρος καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Μαρκουλάτος Παναγιώτης:** Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Αμούτζιας Γρηγόρης:** Επίκουρος καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκ. Καθηγητή κ. Μόσιαλο Δημήτρη, κυρίως για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, και την υπομονή που έκανε κατά την διάρκεια της υλοποίησης της πτυχιακής εργασίας. Όπως επίσης, και για την συνεχή βοήθεια και καθοδήγηση του, καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής αυτής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγίωτη και τον Επίκ. Καθηγητή κ. Αμούτζια Γρηγόριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, οι οποίοι στήριξαν τις σπουδές μου και πίστεψαν σε μένα, από την αρχή μέχρι το τέλος, με διάφορους τρόπους, φροντίζοντας για τη καλύτερη δυνατή μου μόρφωση

## Περίληψη

Για αρκετά χρόνια, η βιοδραστικότητα του μελιού αποτέλεσε και αποτελεί αντικείμενο ενδιαφέροντος της επιστημονικής κοινότητας. Η ισχυρή *in vitro* δράση του μελιού έναντι βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά και η επιτυχής εφαρμογή του στη θεραπεία μολυσμένων πληγών που δεν ανταποκρίνονται στην αντιβιοτική θεραπεία προσέλκυσε το ενδιαφέρον της μοντέρνας ιατρικής ως εναλλακτική θεραπεία.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η πιθανή *in vitro* ανθεκτικότητα των παθογόνων βακτηρίων *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* έναντι της αντιβακτηριακής δράσης μελιών του Ολύμπου σε σύγκριση με το μέλι Manuka. Η διερεύνηση της ανθεκτικότητας έγινε με δύο τρόπους: α) βραχυπρόθεσμη έκθεση υπό σταθερές συγκεντρώσεις μελιού για 12 συνεχείς μέρες και διερεύνηση της παροδικής ή μόνιμης φύσης της ανθεκτικότητας των κλινικών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* έναντι συγκεκριμένων μελιών μετά το τέλος της έκθεσης τους για 12 συνεχείς μέρες, χρησιμοποιώντας τα βακτήρια που εκτέθηκαν στο μέλι για ανακαλλιέργεια 10 ημερών απουσία μελιού και β) βραχυπρόθεσμη έκθεση σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού για 12 συνεχείς μέρες και διερεύνηση της παροδικής ή μόνιμης φύσης της ανθεκτικότητας των *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* έναντι συγκεκριμένων μελιών μετά το τέλος της έκθεσης τους για 12 συνεχείς μέρες, χρησιμοποιώντας τα βακτήρια που εκτέθηκαν στο μέλι για ανακαλλιέργεια 10 ημερών απουσία μελιού.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων συνοψίζονται ως εξής:

- Υπό σταθερή συγκέντρωση μελιού ανάλογα με την *ελάχιστη ανασταλτική τους συγκέντρωση (MIC)* έναντι βακτηρίων *Pseudomonas aeruginosa*:

α)ανάπτυξη μόνιμης ανθεκτικότητας βακτηρίων έναντι των μελιών με αριθμό 1,17,18,19 β) βακτήρια τα οποία δεν ανέπτυξαν ανθεκτικότητα έναντι του μελιού με αριθμό 3

- Υπό σταθερή συγκέντρωση μελιού ανάλογα με την *ελάχιστη ανασταλτική τους συγκέντρωση (MIC)* έναντι βακτηρίων *Staphylococcus aureus* :

α) ανάπτυξη μόνιμης ανθεκτικότητας βακτηρίων έναντι των μελιών με αριθμό 18,19 β) ανάπτυξη παροδικής ανθεκτικότητας βακτηρίων έναντι μελιών με αριθμό 17 και γ) βακτήρια τα οποία δεν ανέπτυξαν ανθεκτικότητα έναντι μελιών με αριθμό 1, 3

- Υπό αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού ανάλογα με την *ελάχιστη ανασταλτική τους συγκέντρωση (MIC)* έναντι βακτηρίων *Pseudomonas aeruginosa*:

α) ανάπτυξη μόνιμης ανθεκτικότητας βακτηρίων έναντι του μελιού με αριθμό 1 β) ανάπτυξη παροδικής ανθεκτικότητας βακτηρίων έναντι μελιών με αριθμό 17,18,19 και γ) βακτήρια τα οποία δεν ανέπτυξαν ανθεκτικότητα έναντι μελιών με αριθμό 3 και 20

- Υπό αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού ανάλογα με την *ελάχιστη ανασταλτική τους συγκέντρωση (MIC)* έναντι βακτηρίων *Staphylococcus aureus* :

α) ανάπτυξη μόνιμης ανθεκτικότητας βακτηρίων έναντι μελιών με αριθμό 18,19 και 20 β) ανάπτυξη παροδικής ανθεκτικότητας βακτηρίων έναντι του μελιού με αριθμό 1 και γ) βακτήρια τα οποία δεν ανέπτυξαν ανθεκτικότητα έναντι μελιών με αριθμό 3 και 20

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη αποδεικνύει τα εξής: Α) Στα περισσότερα μέλια φαίνεται ότι η ανακαλλιέργεια βακτηρίων σε συγκέντρωση μελιών μικρότερη της MIC οδήγησε σε ανθεκτικότητα των στελεχών Β) Είναι πολύ σημαντικό στην κλινική πρακτική η χρήση του μελιού να γίνεται στην σωστή συγκέντρωση (ίση ή και μεγαλύτερη της MIC) ώστε να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα ανθεκτικότητας. Γ) Στο μέλι με αριθμό 3, ένα μέλι με μέτρια αντιμικροβιακή δράση, δεν υπήρξε ένδειξη ανθεκτικότητας σε κανένα από τα δύο πειράματα και σε κανένα από τα δύο βακτήρια.

## Abstract

For several years, the bioactivity of honey has been a subject of interest to the scientific community. The strong in vitro action of honey against antibiotic-resistant bacteria and its successful application in the treatment of infected wounds that do not respond to antibiotic therapy attracted the interest of modern medicine as an alternative treatment.

The purpose of this study was to investigate the potential in vitro resistance of pathogenic bacteria of strains *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to the antibacterial action of Olympos honey compared to Manuka honey. The investigation of resistance was done in two ways: a) short-term exposure at constant concentrations of honey for 12 consecutive days and investigation of the transient or permanent resistance of the clinical strains *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to a specific honey after the end of their exposure for 12 consecutive days, using the bacteria exposed to honey for a 10-day passage in the absence of honey; and b) short-term exposure to gradually increasing concentrations of honey for 12 consecutive days and investigation of the transient or persistent nature of the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to specific honey after the end of their exposure for 12 consecutive days using the bacteria exposed to honey for 10 days passage in the absence of honey. The results of the experiments are summarized as follows:

- With a constant concentration of honey according to their minimum inhibitory concentration (MIC) against *Pseudomonas aeruginosa*:  
a) development of permanent resistance of bacteria against honey no. 1,17,18,19 b) bacteria which did not develop resistance against honey no. 3
- With a constant concentration of honey according to their minimum inhibitory concentration (MIC) against *Staphylococcus aureus*:  
a) development of permanent resistance to bacteria against honey by number 18,19 b) development of transient bacterial resistance against honey numbers 17 and c) bacteria which did not develop resistance against honeys no. 1, 3
- Increasing concentrations of honey according to their minimum inhibitory concentration (MIC) against *Pseudomonas aeruginosa*:  
a) development of permanent bacterial resistance against honey no. 1

b) development of transient bacterial resistance against honeys no. 17,18,19 and c) bacteria which did not develop resistance against honeys no. 3 and 20

- With increasing concentrations of honey according to their minimum inhibitory concentration (MIC) against *Staphylococcus aureus* bacteria:

a) development of permanent resistance to bacteria against honeys no. 18, 19 and 20 b) development of transient bacterial resistance against honeys no. 1 and c) bacteria which did not develop resistance against honeys no. 3 and 20

In conclusion, this study demonstrates the following: A) In most honeys, it appears that the passage of bacteria at a concentration of honey less than MIC resulted in resistance to strains B) It is very important in clinical practice to use the honey at the correct concentration (equal or and higher than the MIC) to minimize the probability of resilience. C) In honey no. 3, a honey with moderate antimicrobial activity, there was no evidence of resistance to either of the two experiments and to either of the two bacteria.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη – abstract

1. Εισαγωγή
  - 1.1. Τι είναι το μέλι;
    - 1.1.1 Λίγη ιστορία.....
    - 1.1.2 Από το νέκταρ στο μέλι
    - 1.1.3 Διατροφική αξία και συστατικά του μελιού
    - 1.1.4 Ευεργετικές δράσεις του μελιού
  - 1.2 Τα είδη μελιού
  - 1.3 Τα είδη του ελληνικού μελιού
    - 1.3.1 Πεύκο
    - 1.3.2 Έλατο
    - 1.3.4 Βελανιδιά
    - 1.3.5 Καστανιά
    - 1.3.6 Θυμάρι
    - 1.3.7 Μέλι άνθεων
    - 1.3.8 Μέλι εσπεριδοειδών
    - 1.3.9 Ακακία
    - 1.3.10 Βαμβάκι
    - 1.3.11 Ευκάλυπτος
    - 1.3.12 Σιδηρίτης ή τσάι βουνού
    - 1.3.13 Ηλιανθός
    - 1.3.14 Μέλι κρόκου
    - 1.3.15 Ρίγανη
  - 1.4 Μέλι : Βασικός Αντιμικροβιακός Παράγοντας
  - 1.5 Μέλι Manuka
  - 1.6 *Pseudomonas Aeruginosa*
  - 1.7 *Staphylococcus Aureus*
2. Σκοπός της παρούσας εργασίας
3. Πειραματικό μέρος
  - 3.1 Υλικά
    - 3.1.1 Δείγματα μελιών
  - 3.2 Μεθόδοι
    - 3.2.1 Υγρές καλλιέργειες των *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus*
    - 3.2.2 Μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης
      - 3.2.2.1 Αρχή της μεθόδου
      - 3.2.2.2 Πειραματική Διαδικασία
    - 3.2.3 Διερεύνηση της ανθεκτικότητας βακτηρίων κλινικής σημασίας έναντι δειγμάτων μελιού, με βραχυπρόθεσμη έκθεση υπό σταθερές συγκεντρώσεις μελιού
      - 3.2.3.1 Αρχή της μεθόδου

- 3.2.3.2 Πειραματική Διαδικασία
- 3.2.4 Διερεύνηση της ανθεκτικότητας βακτηρίων κλινικής σημασίας έναντι δειγμάτων μελιού, με βραχυπρόθεσμη έκθεση σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού
  - 3.2.4.1 Αρχή της μεθόδου
  - 3.2.4.2 Πειραματική διαδικασία
- 3.3 Οπτικός προσδιορισμός της ανθεκτικότητας βακτηρίων με την μέθοδο διάχυσης σε άγαρ
  - 3.3.1 Αρχή της μεθόδου
  - 3.3.2 Πειραματική διαδικασία

#### 4. Αποτελέσματα

- 4.1 Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (minimum inhibitory concentration)
- 4.2 Προσδιορισμός της ανθεκτικότητας βακτηρίων κλινικής σημασίας έναντι δειγμάτων μελιού, με βραχυπρόθεσμη έκθεση υπό σταθερές συγκεντρώσεις μελιού
- 4.3 Προσδιορισμός της ανθεκτικότητας βακτηρίων κλινικής σημασίας έναντι δειγμάτων μελιού, με βραχυπρόθεσμη έκθεση σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού
- 4.4 Οπτικός προσδιορισμός της ανθεκτικότητας βακτηρίων με την μέθοδο disk-diffusion

#### 5. Συζήτηση

#### 6. Βιβλιογραφία

## **1.Εισαγωγή**

### 1.1 Τι είναι το μέλι;

Σύμφωνα με την Κοινοτική Οδηγία 2014/63 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, μέλι είναι η φυσική γλυκιά ουσία που παράγουν οι μέλισσες του είδους *Apis mellifera* από το νέκταρ των φυτών ή από εκκρίσεις ζώντων μερών φυτών ή εκκρίματα εντόμων απομυζούντων φυτά ευρισκόμενα πάνω στα ζώντα μέρη των φυτών, τα οποία οι μέλισσες συλλέγουν, μετατρέπουν αναμιγνύοντας με ειδικές ύλες του σώματός τους, αποθέτουν, αφυδατώνουν, εναποθηκεύουν και φυλάσσουν στις κηρήθρες της κυψέλης, προκειμένου να ωριμάσουν.

Οι απαιτήσεις αυτές συνάδουν και με το πρότυπο του Codex Alimentarius για το μέλι (Codex Stan 12-1981). Όταν το νέκταρ εισέλθει στο στομάχι της μέλισσας, σταδιακά μετατρέπεται σε μέλι. Τα ένζυμα από τους αδένες της κεφαλής που ονομάζονται διαστάσες-ιμβρερτάσες και ένζυμα από θωρακικό αδένα (οξειδάση της γλυκόζης) αναμιγνύονται με το νέκταρ με σκοπό το σχηματισμό της γεύσης και του αρώματος του μελιού (Abdullah and Clemencia, 2009)

#### 1.1.1 Λίγη ιστορία.....

Το μέλι, ως η μόνη φυσικά διαθέσιμη γλυκαντική ουσία, ήταν ένα σημαντικό φαγητό για τον *Homo sapiens* από την αρχή. Έτσι, η σχέση ανάμεσα σε μέλισσες και ανθρώπους ξεκίνησε από την Λίθινη εποχή. Η πρώτη γραπτή αναφορά για το μέλι εμφανίστηκε στο δίσκο των Σουμέριων που χρονολογείται από το 2100-2000 π.Χ, όπου αναφέρεται η χρήση του σαν φάρμακο και σαν αλοιφή. Στις περισσότερες αρχαίες κουλτούρες χρησιμοποιούνταν και για θρεπτικούς αλλά και για ιατρικούς σκοπούς. Η άποψη αυτή ότι το μέλι είναι θρεπτικό (τρόφιμο), φάρμακο και αλοιφή συνεχίζεται ακόμη και στις μέρες μας. Για πολύ καιρό, αποτελούσε σημαντική πηγή υδατανθράκων και η μόνη άφθονα διαθέσιμη γλυκαντική ουσία, μέχρι που την αντικατέστησε η ζάχαρη μετά το 1800. (Alvarez-Suarez et al., 2010).

### 1.1.2 Από το νέκταρ στο μέλι

Η πρώτη ύλη λοιπόν 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 όπου και σχηματίζεται το μελίτωμα, το οποίο χρησιμοποιούν για τις ανάγκες τους. Αυτό που περισσεύει βγαίνει με τη 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.

Η διαδικασία μετατροπής του νέκταρ σε μέλι ξεκινά από τον προλοβό της μέλισσας με προσθήκη ενζύμων από τους σιελογόνους και υποφαρυγγικούς αδένες της. Οι υποφαρυγγικοί αδένες βρίσκονται στο πάνω μέρος του κεφαλιού της μέλισσας και είναι δύο λεπτοί και μακροί αγωγοί με πολλές διακλαδώσεις. Είναι ανεπτυγμένοι στην νεαρή εργάτρια και είναι υπεύθυνοι για τον σχηματισμό του βασιλικού πολτού (White, 1993). Στις, μεγαλύτερης ηλικίας, εργάτριες μέλισσες οι αδένες αυτοί συρρικνώνονται και παράγουν το ένζυμο ιμβερτάση, που είναι απαραίτητο για την μετατροπή του νέκταρ σε μέλι και το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης, που μετατρέπει την γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ. (Abdullah and Clemencia, 2009, White, 1993)

Κατά τη μετατροπή του φυσικού αυτού χυμού (νέκταρ) σε μέλι, γίνεται μεταβολισμός σακχάρων, κυρίως η αποδόμηση του δισακχαρίτη σουκρόζη (της κοινής ζάχαρης) στους άμεσα αφομοιώσιμους μονοσακχαρίτες γλυκόζη και φρουκτόζη. Η ανασύνθεση σε δισακχαρίτες και τρισακχαρίτες είναι πολύ περιορισμένη. Οι αρωματικές ενώσεις (τερπένια) και οι χρωστικές ουσίες από το νέκταρ δεν μεταβολίζονται, ενώ το μέλι εμπλουτίζεται και με το άρωμα των οργανικών οξέων που προκύπτουν από την διάσπαση της γλυκόζης. Επίσης, το μέλι εμπλουτίζεται συνεχώς με ένζυμα από τους αδένες της εργάτριας μέλισσας, τα οποία διασπούν τα σάκχαρα, όπως αναφέρθηκε. Τέλος, τα μεταλλικά στοιχεία του μελιού είναι ακριβώς τα ίδια με αυτά που περιέχονται και στον πρωτογενή φυτικό χυμό (White, 1993).

Ο μεταβολισμός των σακχάρων του νέκταρος και του μελιτώματος συνεχίζεται και ολοκληρώνεται μέσα στα κελιά των κηρήθρων, από την ώρα που οι φυτικοί χυμοί αποθηκεύονται μέσα σε αυτές. Η ικανότητα των κοινωνικών μελισσών ως ειδών εντόμων να μετατρέπουν το ευαίσθητο σε ζυμώσεις (αλλοιώσεις) νέκταρ και αντίστοιχα μελίτωμα στο εξαιρετικά συντηρήσιμο μέλι αποτελεί για αυτές έναν από τους βασικούς μηχανισμούς προσαρμογής τους στη φύση, ο οποίος διασφαλίζει την επιβίωση τους (Υφαντίδης, 2005).

Τέλος, η σύνθεση του μελιού εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως:

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

### 1.1.3 Διατροφική αξία και συστατικά του μελιού

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. Αποτελείται κυρίως από απλά σάκχαρα αλλά και από πλήθος άλλων στοιχείων. Ανιχνεύτηκαν και πιστοποιήθηκαν 182 διαφορετικές ουσίες (Winston, 1987). Το προϊόν αυτό αποτελείται 70-80% από σάκχαρα, κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη και έχει μεγάλη θρεπτική αξία, και απορροφάται άμεσα από τον ανθρώπινο οργανισμό (1 κουταλιά της σούπας μέλι αποδίδει στον οργανισμό 64 Kcal). Περιέχει νερό σε ποσοστό 16% , οργανικά οξέα, πρωτεΐνες και αμινοξέα, μεταλλικά στοιχεία σε μικρές ποσότητες (κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο, σίδηρος κ.ά.), ένζυμα (από τους αδένες των μελισσών και είναι αυτά που μετατρέπουν το νέκταρ και το μελίτωμα των φυτών σε μέλι (Σταθόπουλος, 1993)), συμπλέγματα πρωτεϊνών, βιταμίνες (B2, B6, C, D, E, παντοθενικό οξύ, φολικό οξύ κ.ά.), φυσικές αρωματικές ουσίες κ.ά.. Επιπλέον, το μέλι έχει υψηλή ενεργειακή και θρεπτική αξία. Τα ανόργανα στοιχεία του μελιού συμμετέχουν

σε διάφορα ενζυμικά συστήματα και παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό. Αυτό που προκαλεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι η συνύπαρξη όλων των θρεπτικών στοιχείων και ο τρόπος με τον οποίο δρουν στον ανθρώπινο οργανισμό.

Το μέλι αποτελεί ένα φυσικό γλυκαντικό με μεγάλη γλυκαντική δύναμη χάρη στη φρουκτόζη 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 τροφή και δίνει άμεση ενέργεια σε παιδιά, εγκύους, αθλητές, άτομα που βρίσκονται σε ανάρρωση καθώς και για ανθρώπους που ασκούν υψηλή σωματική ή πνευματική εργασία (National Honey Board, 2010).

Επιπροσθέτως, αποδείχθηκε ως ένα 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 σακχάρου στο αίμα ή της οξύτητας στο ουρικό οξύ. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι φάρμακα σε συνδυασμό με μέλι είχαν καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα. Τα υπάρχοντα στοιχεία στο μέλι όπως 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 τρέφονται καλά καθώς και σε ηλικιωμένα άτομα (εκατό γραμμάρια μέλι παρέχουν στον άνθρωπο 315θερμιδες) . Τέλος πολλοί αποδίδουν τη μακροζωία τους στη συστηματική διατροφή τους με μέλι (Μπίκος, 1991).

#### 1.1.4 Ευεργετικές δράσεις του μελιού

Το μέλι έχει ευεργετικές δράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό (Herold, 1970) και κάποιες από αυτές είναι:

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

#### 1.2 Τα είδη μελιού

Ταξινομούμε τα μέλια σε δύο κατηγορίες: τα *μέλια των ανθέων* (ή νέκταρος) που προέρχονται από το νέκταρ των φυτών και τα *μέλια μελιτώματος* που προέρχονται από τους φυσικούς χυμούς των φυτών και των εντόμων που τρέφονται από τα φυτά αυτά. Η χημική σύνθεση του μελιού ποικίλλει από είδος σε είδος.

- Μέλια ανθέων: πορτοκαλιάς, θυμαριού, ευκάλυπτου, δεντρολίβανου, λεβάντας, λυγαριάς, ακακίας είναι μερικά από τα μέλια που προέρχονται από το νέκταρ που παράγουν τα αντίστοιχα φυτά.
- Μέλια μελιτώματος: το μέλι του πεύκου και του ελάτου είναι μερικά από τα μέλια που προέρχονται τα αντίστοιχα φυτά ( Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990).

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

ηλικία) του εντόμου, τη ζωτικότητα του δέντρου, τις κλιματολογικές συνθήκες και το είδος του πεύκου στο οποίο παρασιτεί το έντομο (Καϊλίδης, 1965). Στην περίοδο των αλλαγών του δέρματος (εκδύσεων) καθώς και όταν ενηλικιωθεί, το έντομο δεν τρέφεται και δεν παράγει μελίτωμα. Οι μέτριες θερμοκρασίες με δροσερό καιρό ευνοούν την κυκλοφορία των χυμών του πεύκου και την άφθονη παραγωγή μελιτοεκκρίσεων σε αντίθεση με τις υψηλές θερμοκρασίες και τη μεγάλη ξηρασία.

Ο εργάτης αποβάλλει περισσότερες μελιτοεκκρίσεις όταν παρασιτεί στην τραχεία (*Pinus brutia* Ten.) παρά στη χαλέπιο (*Pinus halepensis* Miller) (Τυπάλδος-Ξυδιάς, 1979).

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 σε μια περιοχή δεν υπάρχει μια επικρατούσα ανθοφορία, το μέλι που θα παραχθεί θα είναι μέλι ποικίλης ανθοφορίας ενώ όταν υπάρχει μια επικρατούσα ανθοφορία τότε το μέλι θα πάρει τα χαρακτηριστικά της (γεύση, άρωμα, χρώμα) και θα ονομαστεί ανάλογα π.χ. μέλι θυμαριού (Θρασυβούλου, 2001). Το χρώμα του μελιού ποικίλλει από σχεδόν άχρωμο έως καφέ σκούρο. Ως προς τη σύσταση, μπορεί να είναι ρευστό, παχύρρευστο ή μη, μερικώς ή ολικώς κρυσταλλωμένο.

Η κρυστάλλωση του μελιού είναι πολύπλοκο φαινόμενο. Αρχικά οφείλεται στη διαφορετική σχέση φρουκτόζης και γλυκόζης αλλά η θέρμανση σε χαμηλές θερμοκρασίες επαναφέρει το μέλι σε ρευστή του κατάσταση και έτσι εικάζεται ότι μπορεί να προκαλείται και από ένζυμα. Όταν όμως το μέλι διατηρείται για κάποιο χρονικό διάστημα τότε η κρυστάλλωση επανεμφανίζεται. Το κρυσταλλωμένο μέλι δεν έχει χάσει τίποτα από την θρεπτική αξία και πρέπει να καταναλώνεται όπως είναι διότι η θέρμανση του για να λιώσει και να αποκτήσει την αρχική του ωραία φυσική κατάσταση οπωσδήποτε μετουσιώνει ορισμένα από τα θρεπτικά του συστατικά (Ζερφυρίδης, 1998).



### 1.3 Τα είδη του ελληνικού μελιού

Η Ελλάδα διακρίνεται από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές με έντονο ανάγλυφο και διαφορετική χλωρίδα. Ερευνητές, με το πέρασ πλήθος ειδών αναλύσεων, οι οποίες έχουν εφαρμοστεί και διεθνώς, αλλά και καινοτόμες, κατάφεραν να ταυτοποιήσουν και τελικώς να νομοθετηθεί η ύπαρξη αμιγών καθαρών ποικιλιών του ελληνικού μελιού.

Γνωρίζοντας, τον τρόπο παρασκευής του μελιού από τις μέλισσες, προσανατόλισαν την έρευνά τους στην παρασκευή του μελιού από διάφορες φυτικές προελεύσεις, ολοκλήρωσαν τις φυσικοχημικές αναλύσεις σε δείγματα μελιών από διάφορες γεωγραφικές περιοχές και διαφορετικές φυτικές προελεύσεις. Η μελέτη των ελληνικών μελιών ξεκίνησε με προσδιορισμό των φυσικών ιδιοτήτων (χρώμα, οσμή, ειδικό βάρος) και των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών (υγρασία, τέφρα, ζάχαρα, οξύτητα, ηλεκτρική αγωγιμότητα, περιεκτικότητα), το ποσό γλυκόζης-φρουκτόζης, το ποσό σακχαρόζης, και τέλος, το είδος γυρεόκοκκων και την περιεκτικότητα σε υδροξυμεθυλοφουρφούφαλη (HMF). Η HMF ( $C_5H_4O_2$ ) είναι ένα πτητικό μόριο που παράγεται από την τροποποίηση των σακχάρων κατά τη διάρκεια διάσπασης της πεντόζης ή / και κατά την αντίδραση Maillard. Η ποσότητα της είναι ένας βασικός δείκτης για την αξιολόγηση της ευρωστίας των τροφίμων και της οργανοληπτικής ποιότητας του φαγητού (γεύση και άρωμα). Οι χαμηλές της συγκεντρώσεις στα τρόφιμα είναι μια βασική παράμετρος για την καλή ποιότητα του τροφίμου.

Με βάση τα πιο πάνω, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ανθόμελων και των μελιών των κωνοφόρων δέντρων. Το ανθόμελο είναι πιο ανοιχτόχρωμο, λεπτόρρευστο και αρωματικό και με την πάροδο του χρόνου σε χαμηλές θερμοκρασίες γίνεται παχύρρευστο, κρυσταλλώνει και με τον καιρό στερεοποιείται. Ακόμη, περιέχει μεγαλύτερο ποσοστό γλυκόζης και φρουκτόζης (μεγαλύτερο του 65%) και μπορεί να περιέχει υπολείμματα γύρης. Από την άλλη, το πευκόμελο είναι σκουρόχρωμο, παχύρρευστο και κρυσταλλώνει λιγότερο. Έχει μικρότερο ποσοστό σακχάρων (38%) αλλά είναι πλούσιο σε μεταλλικά ιόντα (Υφαντίδης, 1983)

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

### 1.3.1 Πεύκο – *Pinus halepensis* (κοινό πεύκο), (παραγωγή μελιού από μελίτωμα)

Περίπου το 65% της συνολικής παραγωγής μελιού στην Ελλάδα προέρχεται από το πεύκο. Θεωρείται ως το σημαντικότερο μελισσοκομικό φυτό της χώρας. Προέρχεται από τις μελιτώδεις εκκρίσεις του εντόμου *Marchalina hellinica*, γνωστό ως «βαμβακάδα», «εργάτης», «μικρόβιο ή παράσιτο» του πεύκου. Γι' αυτό και το μέλι αυτό έχει χαρακτηριστικά μελιτώματος, όπως υψηλή συγκέντρωση τέφρας και υψηλό Ph. Το παράσιτο βρίσκεται κυρίως στη περιοχή της Θάσου, αλλά και στη Χαλκιδική, Εύβοια, Σκόπελο, Σκιάθο, Ζάκυνθο, Ρόδο, Κρήτη και αλλού.



Εικόνα 1. Πεύκο ([www.analogiajournal.com](http://www.analogiajournal.com))

Λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης σακχάρων που περιέχει δεν είναι ιδιαίτερα γλυκό στη γεύση. Το χρώμα του είναι πιο σκούρο από το θυμαρίσιο. Αυτό, μάλιστα, που παράγεται την άνοιξη, είναι πιο ανοιχτόχρωμο και πιο διαυγές από εκείνο που παράγεται το φθινόπωρο. Είναι πλουσιότερο από το ανθόμελο σε ιχνοστοιχεία, σε πρωτεΐνες και αμινοξέα και έχει τις λιγότερες θερμίδες. Σακχαρώνεται σχετικά αργά αφού η φυσική περιεκτικότητά του σε γλυκόζη είναι χαμηλή. Συγκεκριμένα, τα αμιγή πευκόμελα παραμένουν

ρευστά (δηλαδή χωρίς να κρυσταλλώνουν) για περισσότερο από ενάμιση χρόνο. Επιπλέον, 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 (ασβέστιο, μαγνήσιο, σίδηρος, χαλκός), τα οποία βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα ελληνικά πευκόμελα (Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990).

### 1.3.2 Έλατο – *Abies sp.*, (παραγωγή μελιού από μελίτωμα)

Μία από τις καλύτερες και ακριβότερες κατηγορίες μελιού. Δίνει μέλι εξαιρετικής ποιότητας από μελιτοεκκρίσεις εντόμων τον Ιούνιο. Είναι ιδιαίτερα πυκνόρρευστο. Υπολογίζεται ότι το 5-10% περίπου του μελιού που παράγεται στην Ελλάδα είναι από έλατα. Το συγκεκριμένο είδος διακρίνεται για την ιδιαίτερα καλή του γεύση, δεν παρουσιάζει έντονο άρωμα και λόγω του χαμηλού ποσοστού γλυκόζης, δεν κρυσταλλώνει. Είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία (κάλιο, μαγνήσιο, σίδηρος κλπ.) και 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).

Το ελληνικό έλατο, γνωστό ως ελάτη η Κεφαλληνική (*Abies cephalonica*), συναντιέται μόνο στην Ελλάδα και συγκεκριμένα στην Ευρυτανία, τον Ταΰγετο, το Περούλι, την Πάρνηθα και άλλες περιοχές. Το μέλι που παράγεται είναι δυο ειδών. Το ένα, γνωστό ως *βανίλια*, είναι εξαιρετικά πυκνόρρευστο, δεν κρυσταλλώνει, παρουσιάζει αναλαμπές χρωμάτων και έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα. Παράγεται στο Μαίναλο ή στον Πάρνωνα της Πελοποννήσου και ιδιαίτερα αυτό του Μαινάλου είναι το μοναδικό ελληνικό μέλι που έχει χαρακτηριστεί στην Ευρωπαϊκή Ένωση ως Π.Ο.Π.. Το δεύτερο είδος μοιάζει με το συνηθισμένο μέλι που παράγεται από την ευρωπαϊκή ελάτη (*Abies alba*), γνωστό ως *δασόμελο*.

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

### 1.3.3 **Βελανιδιά** – *Quercus macrolepis*, (παραγωγή μελιού από μελίτωμα)

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



Εικόνα 2. Βελανιδιά

([https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/70/Quercus\\_suber.JPG1.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/70/Quercus_suber.JPG1.jpg))

### 1.3.4 **Καστανιά** – *Castanea sativa*

Το μέλι καστανιάς παράγεται από το νέκταρ και τις μελιτώδεις εκκρίσεις της καστανιάς που είναι ένα αξιόλογο μελισσοκομικό δέντρο. Οι μελιτώδεις εκκρίσεις παράγονται από την αφίδα *Myzocallis castanicola*, που συναντάται στην κάτω επιφάνεια των φύλλων αλλά και πάνω στα εχινόμορφα κύπελλα που περιβάλλουν τους καρπούς. Οι εκκρίσεις αυτές αρχίζουν το Μάιο και συνεχίζονται μέχρι τον Ιούλιο (Σάντας, 1983).

Είναι αρκετά διαδεδομένο στα ορεινά μέρη της Ελλάδας και κυρίως παράγεται στη χερσόνησο του Αγίου Όρους. Η γεύση του είναι αρκετά δυνατή και ελαφρώς πικρή και σε προσμίξεις με άλλα μέλια υπερκαλύπτει τη γεύση των άλλων μελιών. Έχει έντονο άρωμα και το χρώμα του ποικίλλει ανάλογα με την προέλευση του, από ανοιχτό καφετί μέχρι σκούρο. Κρυσταλλώνει πολύ αργά, είναι ανθεκτικό στη θέρμανση και είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία (κάλιο, μαγνήσιο, μαγγάνιο, βάριο). Θεωρείται ότι ευνοεί την κυκλοφορία του αίματος (Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990).

Όλα τα μέλια καστανιάς χαρακτηρίζονται από υψηλό pH, υψηλή συγκέντρωση τέφρας, χαμηλά ανάγοντα σάκχαρα τα οποία είναι αριστερόμορφα και για αυτό κυρίως το λόγο το μέλι καστανιάς παρόλο που έχει χαρακτηριστικά μελιτώματος, κατατάσσεται στα ανθόμελα. Έτσι θεωρείται απαραίτητη η αναγραφή στην ετικέτα της συσκευασίας η βοτανική προέλευση του μελιού είτε αυτό διατίθεται αμιγές είτε σε ανάμιξη.

Εφαρμόσθηκε το τεστ *Bonrehi & Gomez* (1988) από τους Θρασυβούλου και Μανίκη (1993) και βρέθηκε ότι το είδος της καστανιάς προτιμήθηκε και κατατάχθηκε στην τρίτη (3<sup>η</sup>) θέση στην Ελλάδα, με πρώτο της ελάτης, δεύτερο του πεύκου και ακολουθούν της καστανιάς, του θυμαριού, της πορτοκαλιάς, του ηλίανθου, της ερείκης και του βαμβακιού.

#### 1.3.5 **Θυμαρί** – *Thymus sp.*, (παραγωγή μελιού από νέκταρ).

Το θυμαρίσιο μέλι παράγεται κυρίως στα νησιά και σε όλη την ηπειρωτική Ελλάδα και όπου φυτρώνουν τα διάφορα είδη θυμαριού. Στη Μεσόγειο υπάρχουν 120 είδη θυμαριού, τα 12 εκ των οποίων ζουν στην Ελλάδα. Η παραγωγή του ανέρχεται περίπου στο 10% της συνολικής παραγωγής μελιού της Ελλάδας (Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990).

Το μέλι που παράγεται στην Ελλάδα προέρχεται κυρίως από τα είδη *Corynodothymus capitatus*, *Thymus serpyllum* και *Satureja sp.*. Φρύγανο πολύκλαδο, πυκνό, αρωματικό, μικρό, με άνθη σε πυκνές κεφαλόμορφες ταξιαρχίες. Κοινό σε ημιορεινή ζώνη και σε πετρώδεις θέσεις. Η άνθηση του φυτού γίνεται κυρίως Μάιο με Ιούνιο.

Το μέλι αυτό χαρακτηρίζεται ως ένα μέλι αρίστης ποιότητας λόγω του εξαιρετικού του αρώματος και της ευχάριστης γεύσης του. Η χαρακτηριστική του όμως αυτή γεύση μερικές φορές αφήνει μία αίσθηση καψίματος λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σε φρουκτόζη. Έχει έντονο άρωμα, το χρώμα του είναι συνήθως ανοιχτό κεχριμπαρένιο και κρυσταλλώνει σε διάστημα 6-18 μηνών. Θεωρείται ότι έχει τονωτικές και αντισηπτικές ιδιότητες (Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990).

### 1.3.6 **Μέλι ανθέων**, (παραγωγή μελιού από νέκταρ)

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



Εικόνα 3. Μέλι άνθεων ([www.melissokomia.gr](http://www.melissokomia.gr))

### 1.3.7 **Μέλι εσπεριδοειδών**, (παραγωγή μελιού από νέκταρ)

Τα εσπεριδοειδή (πορτοκαλιά, λεμονιά) αποτελούν μια σημαντική πηγή νέκταρος για την παραγωγή μελιού. Η πορτοκαλιά (*Citrus aurantium*) είναι ο κύριος αντιπρόσωπος των εσπεριδοειδών και αποτελεί μια σημαντική πηγή νέκταρος για την παραγωγή μελιού. Παράγεται κυρίως στην Κρήτη, στον Πόρο, στην Πελοπόννησο και στην Ήπειρο, Έχει ντελικάτη και ελαφρώς όξινη γεύση, αναδίδει το άρωμα του πορτοκαλιού και το χρώμα του είναι ανοιχτό κίτρινο, κεχριμπαρένιο. Σαν μέλι είναι αραιό, κρυσταλλώνει πολύ γρήγορα

(μέσα σε 1-2 μήνες) και δεν αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες (Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990).

Όλα τα μέλια εσπεριδοειδών χαρακτηρίζονται από χαμηλή συγκέντρωση προλίνης, χαμηλή διασάση (ένζυμο που διασπά το άμυλο και χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό της νοθείας του μελιού) και από υψηλή συγκέντρωση ασβεστίου 2-7,2 mg/kg και γενικά πλούσια σε μεταλλικά στοιχεία (Δημητριάδης, 2005).

#### 1.3.8 **Ακακία** – *Robinia pseudoacacia*, (παραγωγή μελιού από νέκταρ)

Η ακακία είναι ένα πολύ διαδεδομένο δέντρο, αυτοφυές σε χέρσα εδάφη και σε ρεματιές, αλλά και καλλωπιστικό. Το μέλι ακακίας είναι ιδιαίτερα γνωστό στην Κεντρική Ευρώπη λόγω των μεγάλων εκτάσεων ακακίας που έχουν εκεί. Στην Ελλάδα η παραγωγή του μελιού αυτού είναι πιο σταθερή λόγω των διαφορετικών ποικιλιών ακακίας που υπάρχουν. Το χρώμα του είναι ανοιχτόχρωμο και θεωρείται ως ένα μέλι ιδιαίτερα διαυγές το οποίο δύσκολα κρυσταλλώνεται.

#### 1.3.9 **Βαμβάκι** – *Gossypium hirsutum*, (παραγωγή μελιού από νέκταρ)

Το είδος αυτό καλλιεργείται στην Ελλάδα και παρά το γεγονός ότι είναι πολυετές, στη χώρα μας καλλιεργείται ως ετήσιο. Οι μελισσοπαραγωγοί αποφεύγουν τις βαμβακοφυτείες γιατί στη βαμβακοκαλλιέργεια πραγματοποιούνται πολλοί ψεκασμοί, οι οποίοι είναι ιδιαίτερα επώδυνοι για τη μέλισσα καθώς επίσης του γεγονότος ότι το τελευταίο χρονικό διάστημα έχουν εισαχθεί υβρίδια με περιορισμένη νεκταροέκκριση.



Εικόνα 4. Βαμβάκι (<http://grypasbees.blogspot.gr>)

Η έκκριση νέκταρος από το άνθος του βαμβακιού ξεκινά μερικές ώρες μέχρι και ημέρες πριν ανοίξει το άνθος και ολοκληρώνεται όταν τα πέταλα αλλάξουν χρώμα και από άσπρα γίνουν ροδοκόκκινα. Το νέκταρ από τα άνθη του βαμβακιού είναι πλούσιο σε σάκχαρα (70%) αλλά δεν προσελκύει ιδιαίτερα τις μέλισσες, λόγω των χαμηλών ποσοστών σουκρόζης που περιέχει. Αντίθετα, οι μέλισσες προσελκύνονται περισσότερο από το νέκταρ που εκκρίνεται από εξωανθικά νεκτάρια που βρίσκονται στην εξωτερική πλευρά των βράκτιων φύλλων καθώς επίσης στη βάση και τους νεύρωνες των φύλλων. Το νέκταρ που παράγεται από τους αδένες αυτούς, είναι πλούσιο σε σάκχαρα και γίνεται ακόμη πιο πλούσιο με την παθητική εξάτμιση του νέκταρος. Το μέλι βαμβακιού είναι ανοιχτόχρωμο και μετά την κρυστάλλωση του, η οποία γίνεται μέσα σε 1-2 μήνες από τη παραγωγή του, μετατρέπεται σε άσπρο (Τσέλλιος & Θρασυβούλου, 1989). Ένα θέμα που προκύπτει το τελευταίο χρονικό διάστημα είναι με τα εντομοκτόνα τα οποία ανιχνεύονται στο μέλι καθώς περνάνε από τη μέλισσα στο μέλι με αποτέλεσμα την επίδραση στην υγεία του ανθρώπου. Παρ' όλα αυτά όμως το βαμβάκι αποτελεί μία από τις κύριες πηγές νέκταρος για τον Έλληνα μελισσοκόμο.

#### 1.3.10 **Ευκάλυπτος** – *Eucalyptus spp.*, (παραγωγή μελιού από νέκταρ)

Υπάρχουν πολλά μελισσοκομικά είδη ευκάλυπτου που ανθίζουν σχεδόν όλες τις εποχές (Χαριζάνης, 1989, 1996β). Στην Ελλάδα συναντάμε πολύ συχνά το είδος *E.globules*, γνωστό ως ο ευκάλυπτος ο σφαιρικός. Το μέλι ευκάλυπτου είναι συνήθως ανοιχτόχρωμο και κρυσταλλώνεται γρήγορα.



#### 1.3.11 **Σιδηρίτης ή τσάι του βουνού** – *Sideritis spp.*, (παραγωγή μελιού από νέκταρ)

Το μέλι σιδηρίτη θεωρείται ως ένα από τα καλύτερα μέλια που παράγεται όμως σε μικρές ποσότητες. Στην Ελλάδα το συναντάμε στις περιοχές του Ταΰγετου, της Εύβοιας, του Ολύμπου, του Παρνασσού, της Κρήτης και του Αγίου Όρους. Το χρώμα του είναι σκούρο, με πολύ έντονο άρωμα, γεύση του τσαγιού και είναι παχύρρευστο (Τσέλλιος & Θρασυβούλου, 1989).

#### 1.3.12 **Ηλιάνθος** – *Helianthus annuus*, (παραγωγή μελιού από νέκταρ)

Το μέλι ηλιάνθου συλλέγεται κατά κύριο λόγο στον Έβρο, όπου υπάρχουν εκτάσεις όπου καλλιεργείται το συγκεκριμένο φυτό. Χαρακτηρίζεται ως ένα ανοιχτόχρωμο μέλι που κρυσταλλώνει σε 1-2 μήνες και το οποίο είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ποιότητα της διατροφής μας (Τσέλλιος & Θρασυβούλου, 1989).

#### 1.3.13 **Μέλι κρόκου** – *Crocus sativus*, (παραγωγή μελιού από νέκταρ)

Το μέλι αυτό προέρχεται από το φυτό κρόκος, το οποίο στη χώρα μας καλλιεργείται στην περιοχή της Κοζάνης. Το φυτό αυτό φυτεύεται το καλοκαίρι και ανθίζει το φθινόπωρο. Το μέλι κρόκου είναι ανοιχτόχρωμο, κρυσταλλοποιείται σε 8-10 μήνες. Θεωρείται σπάνιο και περιζήτητο μέλι και ιδιαίτερα ακριβό και σχεδόν το 90% από το μέλι που παράγεται εξάγεται κυρίως στο εξωτερικό (Wilkins & Yinrong, 1993). Τα άνθη του κρόκου έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε φαινόλες και άλλα αντιοξειδωτικά, που θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στην εφαρμογή τους, ως λειτουργικά συστατικά (Serrano-Diaz J, Sanchez AM et al., 2012).

#### 1.3.14 **Ρίγανη** – *Origanum vulgare*, (παραγωγή μελιού από νέκταρ)

Το μέλι ρίγανης παράγεται τον Ιούλιο και θεωρείται αρκετά σπάνιο μέλι. Η παραγωγή του γίνεται κυρίως στις περιοχές της Μακεδονίας, της Θράκης και της Θεσσαλίας. Το φυτό της ρίγανης αξιοποιεί τις ορεινές και μειονεκτικές

περιοχές με ικανοποιητικές στρεμματικές αποδόσεις. Το αιθέριο έλαιο του *Origanum vulgare* είναι αποτελεσματικό στους μύκητες *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger* (dos Santos NS, Athayde Aguiar AJ et al., 2012).

#### 1.4 Μέλι : Βασικός Αντιμικροβιακός Παράγοντας

Ανέκαθεν, οι επιδράσεις του μελιού στην υγεία κινούσαν το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Για πολλές εκατοντάδες χρόνια, το μέλι χρησιμοποιούταν για θεραπεία πληγών καθώς και για θεραπεία παθήσεων του γαστρεντερικού συστήματος ( Zumla & Luat, 1989, Olaitan et al., 2007). Με την έλευση όμως των αντιβιοτικών, η κλινική εφαρμογή του μελιού μειώθηκε στη δυτική ιατρική (Kwakman et al., 2010). Η ισχυρή *in vitro* δράση του μελιού έναντι βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά (Cooper et al., 2002) και η επιτυχής εφαρμογή του στη θεραπεία μολυσμένων πληγών που δεν ανταποκρίνονται στην αντιβιοτική θεραπεία (Efem, 1988), προσέλκυσε εκ νέου το ενδιαφέρον της μοντέρνας ιατρικής ως εναλλακτική θεραπεία.

Το μέλι έχει ευρύ φάσμα δράσης κατά των παθογόνων μικροοργανισμών και των βακτηρίων που προσβάλλουν τον άνθρωπο και τα τρόφιμα (Cooper et al., 2002, Kwakman et al., 2008, Mundo et al., 2004, Taormina et al., 2001). Χωρίζεται σε ποικιλίες που διαφοροποιούνται λόγω του τύπου του φυτού (από το οποίο συλλέγονται το νέκταρ και η γύρη), της χώρας προέλευσης καθώς και του τρόπου παραγωγής (Carnwath et al., 2013).

Το μέλι είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό σε διάφορα κλινικά στελέχη βακτηρίων και ενισχύει τη δράση των αντιβιοτικών όταν χορηγείται μαζί με αυτά (Wang et al., 2012). Συγκεκριμένα, πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η χρήση του μελιού ενάντια σε κλινικά στελέχη του *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa*, θανάτωσε τα κύτταρα που ήταν σε ελεύθερη διαβίωση, σε όλα τα στελέχη που δοκιμάστηκαν (Alandejani et al., 2009). Αυτό που το καθιστά ιδιαίτερα σημαντικό είναι η ικανότητα του να σκοτώνει τα βακτήρια ακόμη και στην πιο ανθεκτική κατάσταση των βιοϋμένων τους, με αποτέλεσμα να αποδεικνύεται πιο αποτελεσματικό από οποιοδήποτε μεμονωμένο, χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό (Wang et al. 2012). Σε μεγάλο μέρος των

ερευνών που έχουν γίνει για τη χρήση του μελιού σε μικροβιακές λοιμώξεις και επούλωση τραυμάτων, δεν αναφέρεται ο τύπος του μελιού που έχει χρησιμοποιηθεί (Al-Waili et al., 2013).

Προσπάθειες για τον εντοπισμό της πηγής της βακτηριοκτόνου δράσεως του μελιού έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη μορίων όπως η μεθυλγλυοξάλη (Kwakman et al., 2010), ο ακριβής όμως χαρακτηρισμός των αποτελεσμάτων τους είναι δύσκολος λόγω του μεγάλου αριθμού των συστατικών και της δυνατότητας συνδυαστικών επιδράσεων (Wang et al, 2012).

Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού οφείλεται κυρίως στην ενζυμική παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου μέσω του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης (Dustmann, 1979, Molan, 1992a) της οξύτητας του, της ώσμωσης του και σε άλλα συστατικά του μελιού (Anthimidou & Mossialos, 2013), όπως αρωματικά οξέα ή φαινολικές ενώσεις και πρωτεΐνες (Weston, 2000).

Συγκεκριμένα:

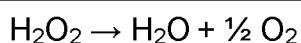
- Όσμωση: Το μέλι περιέχει στη σύσταση του μεγάλη ποσότητα σακχάρων με αποτέλεσμα να θεωρείται ως ένα υπέρκορο υδατικό διάλυμα σακχάρων, στο οποίο οι συγκεντρώσεις είναι μεγαλύτερες από εκείνες που κανονικά μπορούν να ανευρίσκονται μέσα στην υγρή φάση του. Η υψηλή αυτή περιεκτικότητα δημιουργεί ένα υψηλό ωσμωτικό δυναμικό (με πολύ μικρή ποσότητα νερού) με αποτέλεσμα τα βακτήρια κυριολεκτικά να αφυδατώνονται και να πεθαίνουν μέσα στη μάζα του (Joirisch, 1970).

- Οξύτητα: Το pH του μελιού κυμαίνεται μεταξύ 3 και 4. Τα βακτήρια δεν μπορούν να επιβιώσουν σε ένα τόσο όξινο περιβάλλον όπως αυτό. Ωστόσο, αν το μέλι αραιωθεί τότε μπορεί να μειωθεί σε ένα βαθμό η οξύτητα του. (White JW et al., 1963)

- Ένζυμα: Δύο ένζυμα η οξειδάση της γλυκόζης και η καταλάση παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιμικροβιακή δράση του μελιού. Η οξειδάση της γλυκόζης είναι ένα ένζυμο που προσθέτει η συλλέκτρια μέλισσα από τους υποφαρυγγικούς αδένες της. Το ένζυμο αυτό είναι υπεύθυνο για την

παρασκευή του γλυκονικού οξέος από τη γλυκόζη και κατά τη βιοχημική αυτή αντίδραση σχηματίζεται ως παραπροϊόν το υπεροξειδίο του υδρογόνου H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα περισσότερα βακτήρια δεν μπορούν να αναπτυχθούν μέσα στη μάζα του μελιού, εξαιτίας αυτών των δύο συστατικών. Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> έχει την ικανότητα να αναχαιτίζει την ανάπτυξη των βακτηρίων αλλά και να τα θανατώνει. Επιπλέον, βρέθηκε ότι σε μικρές συγκεντρώσεις το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συμμετέχει ως ένας από τους παράγοντες επούλωσης πληγών, όταν σε αυτές εφαρμόζονται επιθέματα με μέλι (Herold, 1970).

Η καταλάση είναι ένζυμο το οποίο επιταχύνει την αντίδραση διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου:



Η μετατροπή αυτή είναι αναγκαία για τη ζωή του κυττάρου, γιατί το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> που παράγεται κατά τις αντιδράσεις μεταβολισμού είναι ιδιαίτερα τοξικό. Συνήθως, η καταλάση βρίσκεται στα κύτταρα του ήπατος και των νεφρών στα θηλαστικά και στα φυτικά κύτταρα της γύρης και του νέκταρος, με συνέπεια να ανιχνεύεται και στο μέλι.

Έτσι, τα δυο αυτά ένζυμα, η οξειδάση της γλυκόζης (η οποία παράγει το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και η καταλάση (η οποία διασπά το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) καθορίζουν τα επίπεδα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο μέλι (Weston, 2000). Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε διαφορετικά μέλια (από διαφορετικές φυτικές πηγές) έχουν ως αποτέλεσμα τις διαφορές στην αντιμικροβιακή δράση των μελιών (White JW et al., 1963, Molan PC, 1992).

- Φυτοχημικά συστατικά: Τέτοια συστατικά είναι τα φαινολικά οξέα, η λυσοζύμη, τα φλαβονοειδή (Cooper et al., 1999), οι πρωτεΐνες, τα ολιγοπεπτίδια (Mundo et al., 2004) και η μεθυλγλυοξάλη MGO (Mavric E et al., 2008), τα οποία φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιβακτηριδιακή δράση του μελιού. Υπάρχει μια πρωτεΐνη, η bee-defensin-1, η οποία εκκρίνεται στο μέλι από τους υποφαρυγγικούς αδένες της εργάτριας

μέλισσας. Μετά από μελέτη παρατηρήθηκε ότι η έκφραση της bee-defensin-1 από τους υποφαρυγγικούς αδένες και/ή η ποσότητα των εκκρίσεων που προστίθεται, μπορεί να ποικίλλει έντονα λόγω της διαφοράς των επιπέδων της στα διάφορα μέλια (Kwakman PH et al., 2010)

### 1.5 Μέλι Manuka

Το μέλι Manuka παράγεται από το νέκταρ του φυτού *Leptospermum scoparium*, ένα γηγενές φυτό της νότιας Ζηλανδίας και νοτιοανατολικής Αυστραλίας. Είναι θάμνος ή μικρό δέντρο ιδιαίτερα γνωστό στη φυλή Maori, οι οποίοι το χρησιμοποιούσαν για αιώνες στην παραδοσιακή ιατρική τους. Το μέλι αυτό το χρησιμοποιούσαν και για τις θεραπευτικές, αντιβιοτικές και αντιβακτηριδιακές του ιδιότητες (Adams CJ, 2009), με αποτέλεσμα να οδηγήσει τα μεγαλύτερα ιατρικά κέντρα του κόσμου να το προτείνουν σαν επικουρική θεραπεία σε πολλές 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 5. Μέλι manuka ([www.healthline.com/health/manuka-honey](http://www.healthline.com/health/manuka-honey))

Το πανεπιστήμιο του Waikato στο Χάμιλτον της Ν. Ζηλανδίας μελέτησε πρώτο τη σύνθεση του μελιού αυτού και την αντιμικροβιακή του δράση.

Αναπτύχθηκε μια μέθοδος για να μετράτε η αντιμικροβιακή δράση αυτού, το Unique Manuka Factor (UMF). Η μονάδα μέτρησης UMF κατηγοριοποιεί το μέλι με βάση την αντιβακτηριδιακή του δύναμη. Κάθε παρτίδα ελέγχεται συστηματικά από εγκεκριμένο εργαστήριο και ταξινομείται κατά αύξουσα σειρά αποδοτικότητας σε κλίμακα από το 0 μέχρι το 25. Όσο πιο υψηλό το επίπεδο, τόσο πιο αποδοτική είναι η αντισηπτική δράση του Manuka honey.

Η UMF, η μοναδική αξιόπιστη μονάδα μέτρησης αποδοτικότητας του μελιού Manuka, έχει προκύψει από τη σύγκριση της αντισηπτικής του ιδιότητας με αυτή του διαλύματος καρβοξυλικού οξέος, το οποίο είναι ένα πανίσχυρο αντισηπτικό μόριο που χρησιμοποιείται ευρέως στη μοντέρνα ιατρική. Το 2008, αναγνωρίστηκε η δραστική ουσία του Manuka honey, η μεθυλγλυοξάλη (MGO), η οποία ανιχνεύεται σε υψηλά επίπεδα (Adams CJ, 2009). Η μεθυλγλυοξάλη σχηματίζεται από τη μετατροπή της διυδροξυακετόνης (DHA) που βρίσκεται σε εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις στο νέκταρ των λουλουδιών του μελιού Manuka (Adams CJ, 2009). Είναι άγνωστο πως η DHA σχηματίζεται στο νέκταρ και γιατί είναι παρόν σε τόσο μεγάλες ποσότητες στο φυτό *Leptospermum scoparium*. Επίσημα πλέον η μεθυλγλυοξάλη αναγράφεται στη συσκευασία κάθε μελιού Manuka. Για παράδειγμα, MGO +100 σημαίνει ότι 100mg μεθυλγλυοξάλης περιέχονται σε 1 κιλό μελιού Manuka.

### 1.6 *Pseudomonas aeruginosa*

Η *Ps. aeruginosa* περιγράφηκε για πρώτη φορά ως ένα ξεχωριστό βακτηριακό είδος, στο τέλος του 19<sup>ου</sup> αιώνα μετά την ανάπτυξη των αποστειρωμένων μέσων καλλιέργειας από τον Παστέρ. Ο Carle Gessard το 1882 ανακάλυψε τη *Ps. aeruginosa* κατά τη διάρκεια ενός πειράματος, στο οποίο το βακτήριο αυτό ταυτοποιήθηκε μέσω των υδατοδιαλυτών χρωστικών ουσιών του και οι οποίες έδωσαν κυανοπράσινη χρώση μετά από την έκθεσή τους σε υπεριώδη ακτινοβολία. Μετέπειτα, η χρώση αυτή αποδόθηκε στην πυοκυανίνη, μια χρωστική της *Ps. aeruginosa* και μαζί με τα πειραματικά του ευρήματα ανέπτυξε τη θεωρία για την παθογόνο φύση της και τις μολυσματικές ομοιότητες που έχει με παρόμοιους μικροοργανισμούς. Ο

Charrin το 1890 χαρακτήρισε τη *Ps. aeruginosa* ως ένα ευκαιριακά παθογόνο αερόβιο βακτήριο, το οποίο έχει μια αξιοσημείωτη ικανότητα να προσαρμόζεται και να ευδοκιμεί σε μία ποικιλία περιβαλλόντων: ύδατος (Pellett et al., 1983), (Kimata et al., 2004), εδάφους (Cavalca et al., 2000), κλινικών (Wolfgang et al., 2003), νοσοκομείων, αστικών λυμάτων (Schwartz et al., 2006) και βιομηχανικών αποβλήτων ( Karadzic et al., 2006).

Η *Ps. aeruginosa* είναι Gram(-) αρνητικό, μη σπορογόνο βακτήριο με ραβδοειδές σχήμα. Αν και ταξινομείται στα αερόβια βακτήρια θεωρείται από πολλούς ως προαιρετικά αναερόβιο, διότι προσαρμόζεται καλά σε συνθήκες μερικής ή και ολικής έλλειψης οξυγόνου. Το κυτταρικό της τοίχωμα είναι όμοιας μορφολογίας με αυτόν των Gram(-) αρνητικών βακτηρίων και αποτελείται από την εσωτερική μεμβράνη, το στρώμα της πεπτιδογλυκάνης και την εξωτερική μεμβράνη. Τα πιο σημαντικά δομικά στοιχεία του βακτηριακού αυτού κυττάρου είναι η πρωτεΐνη F (OprF), το έλυτρο και τα τριχίδια διότι παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της λοιμογόνου δράσης της *Pseudomonas aeruginosa*. Η πρωτεΐνη F βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου και λειτουργεί ως πορίνη, επιτρέποντας σε ορισμένα μόρια και ιόντα να εισέλθουν στα κύτταρα, αλλά και ως δομική πρωτεΐνη, διατηρώντας το βακτηριακό κυτταρικό σχήμα.



Εικόνα 6. *Pseudomonas aeruginosa* ([www.fineartamerica.com](http://www.fineartamerica.com))

Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι η μόνη που έχει την ιδιότητα να παράγει τη χρωστική πράσινη πυοκυανίνη. Η χρωστική αυτή θεωρείται ως ένας

δευτερογενής μεταβολίτης με την ικανότητα να οξειδώνει και μπορεί να σκοτώνει τα μικρόβια που ανταγωνίζονται τη *Ps. aeruginosa*, καθώς και κύτταρα των πνευμόνων θηλαστικών τα οποία η *Ps. aeruginosa* έχει μολύνει κατά τη διάρκεια της κυστικής ίνωσης.

Ο σίδηρος είναι ένα απαραίτητο στοιχείο σχεδόν για όλα τα βακτήρια που υπό αερόβιες συνθήκες σχηματίζει αδιάλυτο σίδηρο (III), με αποτέλεσμα να μην είναι εύκολα διαθέσιμος. Έτσι πολλά βακτήρια για να ξεπεράσουν αυτό το πρόβλημα της προσβασιμότητας του σιδήρου παράγουν χηλικά παράγοντα σιδήρου που ονομάζονται σιδηροφόρα (Yeterian et al., 2010). Οι φθορίζουσες ψευδομονάδες παράγουν την πσυοβερδίνη (Manwar et al., 2004, Mossialos & Amoutzias, 2009) , η οποία αντιπροσωπεύει το κύριο σύστημα πρόσληψης σιδήρου των φθορίζουσων ψευδομονάδων και θεωρείται απαραίτητη για τη μόλυνση σε πολλά διαφορετικά μοντέλα νόσου (Mossialos & Amoutzias, 2007).

Η παραγωγή των μολυσματικών παραγόντων της *Ps. aeruginosa* έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζεται από την αίσθηση μεγέθους πληθυσμού (QS) (Annaroorani et al., 2013) για αυτό και η αναστολή του είναι επιθυμητή (Kohler et al., 2010). Το QS (Quorum sensing) είναι ένας όρος που περιγράφει τη βακτηριακή επικοινωνία που χρησιμοποιείται από πολλά βακτηριακά είδη και βασίζεται στην παραγωγή και ανίχνευση διάχυτων μορίων σήματος (Atkinson & Williams, 2009). Αυτά τα μόρια ενεργοποιούν μονοπάτια με αποτέλεσμα συλλογικές αλλαγές στη συμπεριφορά. Η παρεμπόδιση του διαταράσσει τα αμυντικά μέτρα και τη ρύθμιση της παθογένειας, με αποτέλεσμα την αποδυνάμωση μιας λοίμωξης και καθιστά τα παθογόνα βακτήρια πιο ευάλωτα σε βακτηριοκτόνα στοιχεία. Έτσι, αφού το QS δεν είναι απαραίτητο για την επιβίωση, μια στρατηγική για αναστολή του θα μειώσει τη μολυσματικότητα, ελαχιστοποιώντας ταυτόχρονα την επιλογή για αντίσταση (Wang et al., 2012). Τα δύο πιο γνωστά QS συστήματα της *Ps. aeruginosa* είναι τα LasIR και RhlIR (Smith & Iglewski, 2003). Για να επιταχύνει και να διευκολύνει την παθογένεια της η *Ps. aeruginosa*, παράγει LasIR και RhlIR μολυσματικούς παράγοντες όπως η έκκριση εξωτοξίνης και εξωενζύμων (π.χ. πρωτεάσες, σερίνη, ελαστάση) και η παραγωγή βιοϋμένων (Annaroorani et al., 2013).



Η *Ps. aeruginosa* είναι το τέταρτο πιο συχνά απομονωμένο νοσοκομειακό παθογόνο αντιπροσωπεύοντας το 10,1% του συνόλου των νοσοκομειακών λοιμώξεων και συγκεκριμένα στα νοσοκομεία των Η.Π.Α. θεωρείται ότι αποτελεί κατά μέσο όρο το 0,4% των λοιμογόνων περιπτώσεων σύμφωνα με το Κέντρο Ελέγχου Λοιμώξεων. Σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή, η βακτηριακή μόλυνση μπορεί να επιφέρει μια πληθώρα ασθενειών (π.χ. πνευμονία, ενδοκαρδίτιδα, μηνιγγίτιδα). Δυστυχώς εμφανίζει αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά και μπορεί να προσαρμοστεί όταν εκτίθεται σε αντιμικροβιακούς παράγοντες και να αναπτύξει νέες αντιστάσεις. Ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες όμως που επικρατούν, προκύπτουν συχνά επιδερμικές λοιμώξεις όταν η *Ps. aeruginosa* διαπερνά τις άμυνες του ανθρώπινου ξενιστή και εισέρχεται στο εσωτερικό του δέρματος στην περιοχή μιας ανοιχτής πληγής. Ζωτικό ρόλο στη μόλυνση των εγκαυμάτων και των πληγών διαδραματίζουν οι βλεφαρίδες και τα τριχίδια της *Ps. aeruginosa* και η απουσία τους από τα στελέχη αυτού του βακτηρίου μειώνει τη λοιμογόνο δράση του. Συνήθως δεν προκαλεί ασθένειες σε υγιείς ανθρώπους γιατί θεωρείται ως ένας ευκαιριακά παθογόνος μικροοργανισμός.

Η ανθεκτικότητα της *Ps. aeruginosa* στα περισσότερα αντιβιοτικά είναι ένα γεγονός που καθιστά τη λοίμωξη από *Ps. aeruginosa* αρκετά επικίνδυνη ειδικά σε άτομα με επιβαρυσμένο ανοσοποιητικό. Αυτή η ανθεκτικότητα της οφείλεται στην ικανότητα της να αντιλαμβάνεται τότε το εξωτερικό στρώμα των βιοϋμένων καταστρέφεται, με αποτέλεσμα να ενδυναμώνει τα εσωτερικά στρώματα για να αποκαταστήσει τη βακτηριακή κοινότητα. Οι βιοϋμένες είναι πολύπλοκες κοινότητες που προσκολλώνται σε μια ποικιλία επιφανειών και τα οποία από τη στιγμή που σχηματίζονται, είναι δύσκολο να καταστραφούν. Επιπλέον, αυτό που αυξάνει την άμυνα της *Ps. aeruginosa* έναντι πολλών αντιβιοτικών και χημειοθεραπευτικών παραγόντων είναι η ενδογενής αντίσταση, που οφείλεται στη χαμηλή διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης. Αυτό προκαλείται είτε από την απουσία της πορίνης OprF, είτε από την παραγωγή των β-λακταμασών που διασπούν τις β-λακτάμες. Επιπλέον το γονιδίωμα της *Ps. aeruginosa* έχει πολυάριθμες αντλίες εκροής, μεταξύ των οποίων οι MexAB – OprM και MexXY – OprM, οι οποίες διώχνουν προς τα έξω τα αντιβιοτικά πριν προλάβουν αυτά να δράσουν στο βακτήριο. Μια φαινοτυπική ερευνητική προσέγγιση έδειξε ότι η πορίνη OprF απαιτείται

για τον έλεγχο της μολυσματικότητας της ψευδομονάδας. Η απουσία της OprF έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη προσκόλληση σε ζωικά κύτταρα, την έκκριση τοξινών και τη παραγωγή των λοιμογόνων παραγόντων της «απαρτίας ανίχνευσης» (Fito-Boncompagni et al., 2011). Η ιδιότητα αυτή της πορίνης OprF είναι επιθυμητή, διότι έτσι μειώνεται η πρόσληψη επιβλαβών ουσιών εντός του κυττάρου με αποτέλεσμα η *Ps. aeruginosa* να παρουσιάζει υψηλή αντίσταση στα αντιβιοτικά.

Έχουν γίνει διάφορες έρευνες όπου έχει αποδειχθεί ότι το *Manuka honey* καθώς και πολλά Ελληνικά μέλια αναστέλλουν την ανάπτυξη και τη δράση της *Ps. aeruginosa* (Anthimidou & Mossialos, 2013, Sherlock et al., 2010).

### 1.7 Staphylococcus aureus

Ο *S. aureus* ανήκει στο γένος βακτηρίων που είναι Gram(+) θετικοί κόκκοι. Θεωρείται ως το πιο κοινό είδος σταφυλόκοκκου, το οποίο προκαλεί τις πιο συχνές μολύνσεις. Η σταφυλοξανθίνη, μια καροτενοειδής χρωστική ουσία, είναι υπεύθυνη για το χαρακτηριστικό χρυσό χρώμα των αποικιών του. Αναπτύσσεται στο δέρμα, στην ανώτερη αναπνευστική οδό (κυρίως στη μύτη και στο λαιμό), στη φυσιολογική χλωρίδα του ρινοφάρυγγα των υγιών ενηλίκων, οι οποίοι μπορεί να είναι φορείς του παθογόνου χωρίς ωστόσο να νοσούν. Μπορεί να επιβιώσει επίσης σε οικόσιτα ζώα (όπως σκυλιά, γάτες, άλογα). Προκαλεί πυρετογόνες μολύνσεις (εξανθήματα), λοιμώξεις του δέρματος και των πληγών, λοιμώξεις του αναπνευστικού, σύνδρομο τοξικής καταπληξίας (TTS), τοξική επιδερμική νεκρόλυση, φλύκταινες, οστεομυελίτιδα, μηνιγγίτιδα, αρθρίτιδα. Ο *S. aureus* είναι το συνηθέστερο παθογόνο σε έλκη διαβητικών. Η δυσλειτουργία των αμυντικών μηχανισμών γύρω από τους νεκρωμένους ιστούς ή μέσα στα οστά, επιτρέπει στον *S. aureus* να προκαλεί οξείες λοιμώξεις (Νικολόπουλος και συν, 2006). Τοπική χρήση επιθεμάτων μελιού έχουν ευεργετική επίδραση στις πληγές αυτές (Molan, 1998, 1999a, 1999b), καθώς και σε τομές εγχείρησης (Ndayisaba et al., 1993) και εγκαύματα (Adesunkanmi et al., 1994, Efem, 1988) που έχουν προσβληθεί από το βακτήριο. Ο *χρυσίζων σταφυλόκοκκος* θεωρείται ως ένα άκρως

επιτυχημένο παθογόνο βακτήριο που προκαλεί σημαντικές ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις (Fridkin S.K. et al., 2005). Η επιτυχία του οφείλεται ένα μέρος στην ταχεία αντίσταση στις περισσότερες διαθέσιμες αντιμικροβιακές θεραπείες. Συγκεκριμένα, από την εισαγωγή των αντιβιοτικών στην Ιατρική, ο *S. aureus* παρουσίαζε μια συχνή και ταχεία ανάπτυξη και εξάπλωση της ανθεκτικότητας του σε αυτά (Boucher HW, 2008). Αντιβιοτικά ευρέου φάσματος όπως τα αμινογλυκοσίδια χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλα αντιβιοτικά, όπως οι β-λακτάμες (Ramirez MS et al., 2010). Η αδρανοποίηση των αμινογλυκοσιδίων κατά των τροποποιητικών ενζύμων της αμινογλυκοσίδης (AME), όπως φωσφοτρανσφεράση αμινογλυκοζιτής (APH), ακετυλο-τρανσφεράσες (AAC) και νουκλεοτιδυλο-τρανσφεράση (ANT) , θεωρείται ο πιο κοινός μηχανισμός αντοχής της αμινογλυκοσίδης (Ramirez MS et al., 2010, Fatholahzadeh B et al., 2009). Εκτός από την αντοχή του σε κάθε αποτελεσματικό αντιβιοτικό, η αντοχή του *S. aureus* (όπως ενός παθογόνου) μπορεί να αποδοθεί στους λοιμογόνους παράγοντες, οι οποίοι έχουν σχεδιαστεί για να αποφύγουν τις άμυνες του ξενιστή ή την επίθεση σε κάθε επίπεδο (Otto M., 2010, Bartlett A.H. et al., 2010). Ο *Staphylococcus aureus* παράγει μια σειρά τοξινών που είναι ικανές να στοχεύουν στο θάνατο του βακτηρίου δημιουργώντας κανάλια στη κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η προκύπτουσα οσμωτική ρύθμιση οδηγεί στην κυτταρική λύση.



Εικόνα 7. *Staphylococcus aureus* ([www.bacteriologynotes.com](http://www.bacteriologynotes.com))

Η επικράτηση των στελεχών του *Staphylococcus aureus* που είναι ανθεκτικά στη μεθικιλίνη (*MRSA*) έχει φτάσει σε υψηλά επίπεδα παγκοσμίως (Styers D et al., 2006). Συγκριμένα έχει αυξηθεί σε ποσοστό 40% τα τελευταία 10

χρόνια. Ο *MRSA* είναι ένα είδος του *S. aureus*, ο οποίος έγινε ιδιαίτερα ανθεκτικός σε αντιβιοτικά β-λακτάμης με την απόκτηση του γονιδίου *mecA* στο χρωμοσωμικό του DNA (Hiramatsu K, 1995). Απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1960 στην Αγγλία (Jevons MP, 1961) και προκάλεσε μια παγκόσμια επιδημία το 1970. Τουλάχιστον τρία διαφορετικά είδη γενοτύπων του *MRSA* ήταν παρών στη δεκαετία του 1980 (Hiramatsu K, 1995) και δύο από αυτά εξακολουθούν να κυριαρχούν στον κόσμο, όπως ο *HA-MRSA* που κυριαρχεί στη υγειονομική περίθαλψη και θεωρείται πολύ-ανθεκτικός στα αντιβιοτικά (Enright MC, 2002). Σύμφωνα με μια μελέτη των Η.Π.Α. το 2007, 880.000 άνθρωποι μολύνονταν από τον *MRSA* κάθε χρόνο. Δυστυχώς, το 5% των ατόμων με λοίμωξη από *MRSA* πεθαίνουν και ο αριθμός αυτός αντιστοιχεί σε 20.000 – 40.000 θανάτους το χρόνο (Klebens RM et al., 2007). Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι ο *MRSA* απέκτησε αντοχή σε όλα σχεδόν τα αντιβιοτικά και κατέκτησε ακόμη και την «τελευταία λύση» αντιβιοτικού, τη βανκομυκίνη (Hiramatsu K et al., 1997, Chang S et al., 2003). Το πιο ανησυχητικό είναι ότι πρόσφατα *S. aureus* έχει αρχίσει να προκαλεί θανατηφόρες λοιμώξεις εκτός του νοσοκομειακού περιβάλλοντος, σε σχετικά υγιή και νεαρά άτομα (Naimi T.S. et al., 2003, Herold B.C. et al., 1998).

## 2. Σκοπός της παρούσας εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η πιθανή *in vitro* ανθεκτικότητα παθογόνων βακτηρίων και συγκεκριμένα ανθεκτικών σε αντιβιοτικά στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* έναντι της αντιβακτηριακής δράσης μελιών του Ολύμπου σε σύγκριση με το μέλι Manuka.

### **3. Πειραματικό Μέρος**

#### **3.1 Υλικά**

Κατά της διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

- Τρυβλία Petri (100 mm)
- Μικροπλάκες 96 θέσεων (microplates)
- Αποστειρωμένα πλαστικά φιαλίδια τύπου falcon 50ml
- Θρεπτικό υλικό *Mueller Hinton Agar* (Χρησιμοποιείται για στερεό θρεπτικό υπόστρωμα σε τρυβλία και για καλλιέργεια μη απαιτητικών σε διατροφικά στοιχεία οργανισμών)
- Θρεπτικό υλικό *Mueller Hinton Broth* (Χρησιμοποιείται για υγρές καλλιέργειες και για μη απαιτητικούς σε διατροφικά στοιχεία οργανισμούς)
- Θρεπτικό υλικό LB agar
- Πιπέτες
- Eppendorfs
- Φασματοφωτόμετρο

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι:

- *Pseudomonas Aeruginosa*
- *Staphylococcus Aureus*

#### **3.1.1 Δείγματα μελιών**

Για την πραγματοποίηση του πειράματος, εκτελέστηκαν πειράματα για τα οποία συλλέχθηκαν δείγματα μελιού από την περιοχή του Ολύμπου, από την πλευρά προς την θάλασσα, τον κάτω Όλυμπο (όπως Καρύα Ολύμπου), αλλά και από την άλλη πλευρά του Ολύμπου, την περιοχή της Θεσσαλίας (Κρανιά Ελασσόνας).

Εξετάστηκαν τα παρακάτω 6 δείγματα μελιών (Πίνακας 1). Κάθε δείγμα κατείχε ένα νούμερο κωδικό και λεπτομέρειες για τον τόπο προέλευσης,

την ημερομηνία συγκομιδής και τον παραγωγό τους. Η συλλογή του έγινε σε γυάλινα βαζάκια που φυλάχτηκαν σε δροσερό και σκιερό μέρος.

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά Δειγμάτων μελιών του Ολύμπου

| Α/Α | ΤΥΠΟΣ   | ΗΜ.<br>ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  | ΠΕΡΙΟΧΗ                  | ΠΑΡΑΓΩΓΟΣ                                 |
|-----|---|-------------------|--------------------------|---|
| 1   | Μέλι Άνθεων   | Ιούλιος 2013      | Καρύα<br>Ολύμπου         | Σαμαράς<br>Γεώργιος                       |
| 3   | Μέλι Άνθεων   |                   | Συκέα<br>Ελασσόνας       | Σδανής<br>Γεώργιος,<br>Σδανής<br>Νικόλαος |
| 17  | Παλιούρι,<br>Καβαλαρία,<br>αγριοτριφύλλι,<br>αγριοτριανταφυλιά,<br>αγριοσπάραγκο,<br>πέυκο-καπνός,<br>ακακία, κρινάκια,<br>κιχύριο-φλομός | 2014              | Δρυμός<br>Ελασσόνας      | Αργυρόπουλος<br>Ελευθερίου                |
| 18  | Ακακία, τσάι του<br>βουνού,<br>βατομουρίες, έλατο   | 30/8/2014         | Καρύα<br>Ολύμπου         | Κατσίβελος<br>Γιώργος                     |
| 19  | Άνθη και κωνοφόρα   | Αύγουστος<br>2014 | Άζωρος                   | Νταλίπη<br>Χρυσούλα                       |
| 20  | Άνθεων και<br>κωνοφόρων   | 2014              | Γαλανόβρυση<br>Ελασσόνας | Καρμίρη Αθηνά-<br>Καρετσός<br>Ανδρέας     |

### 3.1.2. Μέλι Manuka

Το μέλι Manuka που χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση με τα ελληνικά μέλια ήταν το MGO550+ και UMF 25+. Περιέχει τουλάχιστον 550mg/kg

μεθυλ-γλυοξάλλη και ανήκει στην βαθμική κατηγορία super high. Είναι της εταιρίας Manuka health που εδρεύει στη Νέα Ζηλανδία.

### 3.2 Μέθοδοι

#### 3.2.1 Υγρές καλλιέργειες των *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus*

Αρχικά, προετοιμάζονται οι καλλιέργειες των βακτηρίων χρησιμοποιώντας καλλιέργειες (glycerol stock) που διατηρούνται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Με μικροβιολογικό κρίκο και σε αποστειρωμένο περιβάλλον, παίρνουμε μια μικρή ποσότητα βακτηρίων από την καλλιέργεια stock και τα τοποθετούμε σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton Agar. Για την Παρασκευή 1000ml θρεπτικού μέσου, ζυγίστηκαν 38gr MHA και προστέθηκαν σε 1L απιονισμένο νερό. Μετά από την καλή ανάδευση που πραγματοποιήθηκε για μερικά λεπτά, έγινε αποστείρωση στους  $120^{\circ}\text{C}$  για 20 λεπτά.

Μετά την αποστείρωση, το διάλυμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου έτσι ώστε να φτάσει στους  $47^{\circ}\text{C}$  και στην συνέχεια μοιράστηκε σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri, υπό ασηπτικές συνθήκες, πριν στερεοποιηθεί και τοποθετήθηκαν για επώαση σε κλίβανο στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 24 ώρες.

Από τα τρυβλία που αναπτύχθηκαν τα βακτήρια, πάρθηκε, με μικροβιολογικό κρίκο και σε ασηπτικό περιβάλλον, ένα κομμάτι από τις αποικίες τους και τοποθετήθηκαν σε falcons 50ml με θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton Broth. Για την Παρασκευή 1000ml θρεπτικού υποστρώματος Mueller Hinton Broth, ζυγίστηκαν 21gr MHB και προστέθηκαν σε 1L απιονισμένο νερό. Αφού έγινε αποστείρωση του διαλύματος, μοιράστηκαν 5ml του θρεπτικού μέσου σε κάθε ένα από τα falcons. Τελικά, τα falcons με τη μικρή ποσότητα βακτηρίων ( υγρή καλλιέργεια), τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα υπό ανάδευση (incubator shaker) για 24 ώρες στους  $37^{\circ}\text{C}$  στις 210 στροφές.



### 3.2.2 Μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration MIC)

#### 3.2.2.1 Αρχή της μεθόδου

Η *in vitro* μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC πραγματοποιήθηκε σε αποστειρωμένες μικροπλάκες (microplates) πολυστερίνης 96 θέσεων η καθεμία. Για τη δοκιμασία της μεθόδου ακολουθήθηκε η διαδικασία που αναγράφεται στην βιβλιογραφία (Thomas Patton et al., 2005, Sherlock et al., 2010). Το MIC, για τις υγρές καλλιέργειες, ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα, στην οποία δεν ανιχνεύεται καμία ανάπτυξη, δηλαδή έχουμε 100% αναστολή της αύξησης του υπό εξέταση οργανισμού. (Sherlock et al., 2010).

Στη συνέχεια, οι μικροπλάκες τοποθετήθηκαν σε microplate reader (ELx808 Absorbance Microplate Reader, Biotek), το οποίο είναι συνδεδεμένο με ένα ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η ανάλυση των οπτικών απορροφήσεων των καλλιέργειών έγινε με το λογισμικό Gen5 Data Analysis Software (Biotek).

#### 3.2.2.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάστηκαν οι καλλιέργειες των βακτηρίων χρησιμοποιώντας καλλιέργειες (glycerol stock) που διατηρούνται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Με μικροβιολογικό κρίκο και σε αποστειρωμένο περιβάλλον, παίρνουμε μια μικρή ποσότητα βακτηρίων από την καλλιέργεια stock και τα τοποθετούμε σε falcons, που περιέχουν 5ml θρεπτικού μέσου Mueller Hinton Broth. Τα falcons τοποθετήθηκαν σε επωαστήριο υπό ανάδευση στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 24 ώρες στις 210 στροφές/min. Έπειτα οι καλλιέργειες αραιώθηκαν, μέχρι την παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος, θολερότητας ίση με 0,5 McFarland (περίπου  $1,5 \cdot 10^8 \frac{cfu}{ml}$ ).

Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600nm, έγινε μέχρι να πετύχουμε τιμή 0,132 η οποία αντιστοιχεί σε 0,5 McFarland (περίπου  $1,5 \cdot 10^8 \frac{cfu}{ml}$ ).

Τα δείγματα των μελιών που χρησιμοποιήθηκαν για την *Pseudomonas aeruginosa* είναι 6 και αντίστοιχα για τον *Staphylococcus aureus* 6 και όλα δοκιμάστηκαν σε 7 διαφορετικές διαδοχικές αραιώσεις (50% v/v, 25% v/v, 12,5% v/v, 6,25% v/v, 3,125% v/v, 1,5% v/v, 0,78% v/v) για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης.

Στη πλάκα μικροπιλοποίησης, το κάθε μέλι (συμπεριλαμβανομένου και του Manuka), χρησιμοποιήθηκε εις τριπλούν, σε 7 πηγαδάκια. Στο καθένα από αυτά προστέθηκε 190μl από την αραιώση του εκάστοτε υπό εξέταση μελιού διαδοχικά και  $5 \cdot 10^4$  CFUs καλλιέργειας. Σε μία σειρά με 7 πηγαδάκια προστέθηκαν διαδοχικά 190μl *Mueller Hinton Broth* και  $5 \cdot 10^4$  CFUs καλλιέργειας (control).

Αρχικά η μικροπλακέτα τοποθετήθηκε στο φασματοφωτόμετρο *ELx808 Absorbance Microplate Reader* και έγινε η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 630nm για χρόνο  $t=0$ . Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν και καταγράφηκαν από το λογισμικό *Gen5™ Data Analysis Software*. Έπειτα η μικροπλακέτα τοποθετήθηκε στον επωαστήρα στους 37° C για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα ακολούθησε εκ νέου ανάγνωση από το φασματοφωτόμετρο *ELx808* στα 630nm για χρόνο  $t=24$ .

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο μετρήσεων προσδιορίσαμε την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση στην οποία δεν υπήρξε βακτηριακή ανάπτυξη με βάση τα εξής:

Η οπτική πυκνότητα (OD) για το κάθε πηγαδάκι προκύπτει από την αφαίρεση της μέτρησης για  $t=24$  μείον τη μέτρηση για  $t=0$ . Δηλαδή,

$$OD_{testwell} = T_{24_{test}} - T_{0_{test}}$$

και

$$OD_{of\ corresponding\ control\ well} = T_{24_{test}} - T_{0_{test}}$$

Η αναστολή της ανάπτυξης για το κάθε δείγμα μελιού υπολογίζεται με τη χρήση του τύπου:

$$100\% \text{ ΑΝΑΣΤΟΛΗ} = 1 - \left( \frac{OD_{testwell}}{OD_{of\ corresponding\ control\ well}} \right) \times 100$$

(Thomas Patton et al., 2005).

Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν για το κάθε μέλι και για κάθε συγκέντρωση.

### 3.2.3 Διερεύνηση της ανθεκτικότητας βακτηρίων κλινικής σημασίας έναντι δειγμάτων μελιού, με βραχυπρόθεσμη έκθεση υπό σταθερές συγκεντρώσεις μελιού

#### 3.2.3.1 Αρχή της μεθόδου

Έγινε προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC μετά τη βραχυπρόθεσμη έκθεση που πραγματοποιήθηκε με την παρουσία σταθερής συγκέντρωσης συγκεκριμένων δειγμάτων μελιού για 12 συνεχείς μέρες.

Έπειτα έγινε διερεύνηση της παροδικής ή μόνιμης φύσης της ανθεκτικότητας των κλινικών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* έναντι συγκεκριμένων μελιών μετά το τέλος της έκθεσης τους για 12 συνεχείς μέρες, χρησιμοποιώντας τα δείγματα για ανακαλλιέργεια 10 ημερών.

#### 3.2.3.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάστηκαν οι υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* σύμφωνα με τη πρώτη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω. Έπειτα, σε ένα αποστειρωμένο πλαστικό φιαλίδιο τύπου falcon τοποθετήθηκαν 5ml θρεπτικού μέσου *Mueller Hinton Broth* με 5% v/v δείγμα μελιού και εμβολιάστηκαν με 50μl από την υγρή καλλιέργεια της *Pseudomonas aeruginosa* που είχαν ετοιμαστεί πριν 24 ώρες και σε ένα άλλο falcon τοποθετήθηκαν αντίστοιχα 5ml θρεπτικού μέσου *Mueller Hinton Broth*

με 3% v/v δείγμα μελιού και εμβολιάστηκαν με 50μl από την υγρή καλλιέργεια του *Staphylococcus aureus*. Στη συνέχεια, τα falcon επωάστηκαν στους 37° C για 24 ώρες στις 210 στροφές/min.

Η μέθοδος αυτή πραγματοποιήθηκε για 12 διαδοχικές μέρες, με τη προσθήκη 50μl από την καλλιέργεια που αναπτύχθηκε στο falcon της προηγούμενης μέρας σε ένα νέο, το οποίο περιείχε το θρεπτικό μέσο *Mueller Hinton Broth* και την αντίστοιχη συγκέντρωση δείγματος μελιού για κάθε βακτήριο. Πραγματοποιήθηκε δηλαδή ανακαλλιέργεια, με σκοπό την «εκπαίδευση» των βακτηρίων μας στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δείγματος μελιού.

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για την *Pseudomonas aeruginosa* σε 5 δείγματα μελιών και αντίστοιχα για τον *Staphylococcus aureus* σε 3, όπως και το μέλι Manuka και για τα δύο βακτήρια, σε δύο ανεξάρτητα πειράματα μέτρησης.

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση MIC για τα δείγματα όπως αναφέρθηκε παραπάνω ( 3.2.2.2 )

Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν για το κάθε μέλι και για κάθε συγκέντρωση.

Έπειτα έγινε διερεύνηση της παροδικής ή μόνιμης φύσης της ανθεκτικότητας των βακτηρίων έναντι των μελιών μετά το τέλος της έκθεσης τους για 12 συνεχείς μέρες, χρησιμοποιώντας τα δείγματα για ανακαλλιέργεια 10 διαδοχικών ημερών χωρίς την παρουσία μελιού. Δηλαδή, σε ένα αποστειρωμένο πλαστικό φιαλίδιο τύπου falcon τοποθετήθηκαν 5ml θρεπτικού μέσου *Mueller Hinton Broth* ενοφθαλμίζοντας με 50μl τη καλλιέργεια της *Pseudomonas aeruginosa* που είχε εκτεθεί σε σταθερές συγκεντρώσεις μελιού και σε ένα άλλο falcon τοποθετήθηκαν 5ml θρεπτικού μέσου *Mueller Hinton Broth* ενοφθαλμίζοντας με 50μl τη καλλιέργεια του *Staphylococcus aureus* που είχε εκτεθεί σε σταθερές συγκεντρώσεις μελιού. Στη συνέχεια, τα falcon επωάστηκαν στους 37° C για 24 ώρες στις 210 στροφές/min.

Η ανακαλλιέργεια πραγματοποιήθηκε για 10 διαδοχικές μέρες, με τη προσθήκη μόνο των 50μl από την καλλιέργεια που αναπτύχθηκε στο falcon της προηγούμενης μέρας σε ένα νέο και του θρεπτικού μέσου *Mueller Hinton Broth*.

Στο τέλος, προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση MIC για τα δείγματα όπως αναφέρθηκε παραπάνω ( 3.2.2.2 )

#### 3.2.4 Διερεύνηση της ανθεκτικότητας βακτηρίων κλινικής σημασίας έναντι δειγμάτων μελιού, με βραχυπρόθεσμη έκθεση σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού

##### 3.2.4.1 Αρχή της μεθόδου

Έγινε προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC μετά τη βραχυπρόθεσμη έκθεση που πραγματοποιήθηκε με την παρουσία σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις συγκεκριμένων δειγμάτων μελιού για 12 συνεχείς μέρες.

Στη συνέχεια, έγινε διερεύνηση της παροδικής ή μόνιμης φύσης της ανθεκτικότητας των κλινικών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* έναντι των συγκεκριμένων μελιών μετά το τέλος της έκθεσης τους για 12 συνεχείς μέρες, χρησιμοποιώντας τα δείγματα για ανακαλλιέργεια 10 ημερών.

##### 3.2.4.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάστηκαν οι υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* σύμφωνα με τη πρώτη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω. Έπειτα, σε ένα αποστειρωμένο πλαστικό φιαλίδιο τύπου falcon τοποθετήθηκαν 5ml θρεπτικού μέσου *Mueller Hinton Broth* με 2% v/v δείγμα μελιού και εμβολιάστηκαν με 50μl από την υγρή καλλιέργεια της *Pseudomonas aeruginosa* που είχαν ετοιμαστεί πριν 24 ώρες και σε ένα άλλο falcon τοποθετήθηκαν αντίστοιχα 5ml θρεπτικού μέσου *Mueller Hinton Broth* με 1% v/v δείγμα μελιού και εμβολιάστηκαν με 50μl από την υγρή καλλιέργεια

του *Staphylococcus aureus*. Στη συνέχεια, τα falcon επωάστηκαν στους 37° C για 24 ώρες στις 210 στροφές/min.

Η μέθοδος αυτή πραγματοποιήθηκε για 12 διαδοχικές μέρες, με τη προσθήκη 50μl από την καλλιέργεια που αναπτύχθηκε στο falcon της προηγούμενης μέρας σε ένα νέο, το οποίο περιείχε το θρεπτικό μέσο *Mueller Hinton Broth* και την αντίστοιχη συγκέντρωση δείγματος μελιού για κάθε βακτήριο αυξάνοντας τη συγκέντρωση κάθε μέρα κατά 0,5% v/v και για τα δύο βακτήρια.

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για την *Pseudomonas aeruginosa* σε 7 δείγματα μελιών και αντίστοιχα για τον *Staphylococcus aureus* σε 3, όπως και το μέλι Manuka και για τα δύο βακτήρια, σε δύο ανεξάρτητα πειράματα μέτρησης.

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση MIC για τα δείγματα όπως αναφέρθηκε παραπάνω ( 3.2.2.2 )

Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν για το κάθε μέλι και για κάθε συγκέντρωση.

Έπειτα έγινε διερεύνηση της παροδικής ή μόνιμης φύσης της ανθεκτικότητας των βακτηρίων έναντι των μελιών μετά το τέλος της έκθεσης τους για 12 συνεχείς μέρες, χρησιμοποιώντας τα δείγματα για ανακαλλιέργεια 10 διαδοχικών ημερών χωρίς την παρουσία μελιού. Δηλαδή, σε ένα αποστειρωμένο πλαστικό φιαλίδιο τύπου falcon τοποθετήθηκαν 5ml θρεπτικού μέσου *Mueller Hinton Broth* ενοφθαλμίζοντας με 50μl τη καλλιέργεια της *Pseudomonas aeruginosa* που είχε εκτεθεί σε σταθερές συγκεντρώσεις μελιού και σε ένα άλλο falcon τοποθετήθηκαν 5ml θρεπτικού μέσου *Mueller Hinton Broth* ενοφθαλμίζοντας με 50μl τη καλλιέργεια του *Staphylococcus aureus* που είχε εκτεθεί σε σταθερές συγκεντρώσεις μελιού. Στη συνέχεια, τα falcon επωάστηκαν στους 37° C για 24 ώρες στις 210 στροφές/min.

Η ανακαλλιέργεια πραγματοποιήθηκε για 10 διαδοχικές μέρες, με τη προσθήκη μόνο των 50μl από την καλλιέργεια που αναπτύχθηκε στο falcon της προηγούμενης μέρας σε ένα νέο και του θρεπτικού μέσου *Mueller Hinton Broth*.

Στο τέλος, προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση MIC για τα δείγματα όπως αναφέρθηκε παραπάνω ( 3.2.2.2 ).

### 3.3 Οπτικός προσδιορισμός της ανθεκτικότητας βακτηρίων με την μέθοδο διάχυσης σε άγαρ

#### 3.3.1 Αρχή της μεθόδου

Μετά τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC των πειραμάτων 3.2.3 και 3.2.4 εφαρμόστηκε η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ για την οπτική ανάλυση των βακτηρίων τα οποία ανέπτυξαν μόνιμη ανθεκτικότητα ως προς τα υπό εξετάζων μέλια.

#### 3.3.2 Πειραματική διαδικασία

Χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία Petri με αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα LB agar και μέλι. Στα τρυβλία, με μικροβιολογικό κρίκο και σε ασηπτικό περιβάλλον, τοποθετήθηκαν περίπου  $10^6$ - $10^7$  βακτήρια, είτε *Pseudomonas aeruginosa* είτε *Staphylococcus aureus* ( $OD_{600}=0.7$ ). Η ποσότητα μελιού ρυθμίστηκε έτσι ώστε η συγκέντρωση του μελιού να είναι κάτω από την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) στη ζώνη αναστολής. Στην συνέχεια, επωάστηκαν στους 37 ° C για 24 ώρες έως ότου παρατηρηθούν οι ζώνες αναστολής. Για κάθε δείγμα μελιού, έγιναν 3 επαναληπτικές μετρήσεις και έγινε μέτρηση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής, του μέσου όρου και της τυπικής απόκλισης για κάθε μέλι. Ως θετικό control, χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια από την καλλιέργεια stock.

## **4. Αποτελέσματα**

### 4.1 Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (minimum inhibitory concentration).

Για αρχή, προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση των μελιών, η οποία μπορεί να αναστείλει πλήρως την ανάπτυξη των *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus*. Το μέλι με **No. 3** έδωσε τιμή MIC, ίση με **12,5% v/v**, ενώ τα μέλια με **No. 1, 17, 18, 19, 20** έδωσαν τιμή MIC, ίση με **6,25% v/v**.

Αντίστοιχα, για το ***Staphylococcus aureus***, τα μέλια με **No. 1, 3 και 17** έδωσαν την ίδια τιμή MIC με αυτή του Manuka 25+, δηλαδή **6,25% v/v**, ενώ τα μέλια **No. 18, 19, 20** έδωσαν μικρότερη τιμή MIC, ίση με **3,125%**.



**Πίνακας 2.** Αποτελέσματα μετρήσεων MIC έναντι της *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus*.

| <u>No Μέλι</u> | <u>Τύπος Μελιού</u>   | <u>MIC</u><br><u><i>Pseudomonas</i></u><br><u><i>aeruginosa</i></u> | <u>MIC</u><br><u><i>Staphylococcus</i></u><br><u><i>aureus</i></u> |
|----------------|---|---|--|
| 1              | Μέλι Άνθεων   | 6,25%   | 6,25%  |
| 3              | Μέλι Άνθεων   | 12,5%   | 6,25%  |
| 17             | Παλιούρι,<br>Καβαλαρία,<br>αγριοτριφύλλι,<br>αγριοτριανταφυλιά,<br>αγριοσπάραγκο,<br>πέυκο-καπνός,<br>ακακία, κρινάκια,<br>κιχύριο-φλομός | 6,25%   | 6,25%  |
| 18             | Ακακία, τσάι του<br>βουνού,<br>βατομουρίες,<br>έλατο  | 6,25%   | 3,125%   |
| 19             | Άνθη και<br>κωνοφόρα  | 6,25%   | 3,125%   |
| 20             | Άνθεων και<br>κωνοφόρων   | 6,25%   | 3,125%   |
| Manuka         |   | 12,5%   | 6,25%  |

#### 4.2 Προσδιορισμός της ανθεκτικότητας βακτηρίων κλινικής σημασίας έναντι δειγμάτων μελιού, με βραχυπρόθεσμη έκθεση υπό σταθερές συγκεντρώσεις μελιού

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση των μελιών (MIC) προσδιορίστηκε μετά τη βραχυπρόθεσμη έκθεση των *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* σε σταθερές συγκεντρώσεις δειγμάτων μελιών.

Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 3, τα μέλια με **No. 3** και **Manuka** μετά από βραχυπρόθεσμη έκθεση της *Pseudomonas aeruginosa* σε σταθερή συγκέντρωση μελιού δεν έδωσαν διαφορετική τιμή MIC από αυτή που μετρήσαμε αρχικά. Άρα δεν υπάρχει ένδειξη ανθεκτικότητας της *Pseudomonas aeruginosa* ως προς αυτά τα μέλια.

Η έκθεση της *Pseudomonas aeruginosa* σε σταθερή συγκέντρωση των μελιών με **No 1, 17, 18 και 19** οδήγησε στη μόνιμη ανθεκτικότητα του βακτηρίου, καθώς αυξήθηκε η τιμή MIC και η οποία διατηρήθηκε και μετά το πέρας της ανακαλλιέργειας των 10 ημερών απουσία μελιού.

**Πίνακας 3.** Αποτελέσματα μετρήσεων MIC της *Pseudomonas aeruginosa* μετά τη βραχυπρόθεσμη έκθεση σε σταθερές συγκεντρώσεις δειγμάτων μελιού και της παροδικής ή μόνιμης φύσης της ανθεκτικότητας της.

- **Με πράσινο χρώμα:** Το MIC των βακτηρίων παραμένει σταθερό
- **Με κόκκινο χρώμα:** Το MIC των βακτηρίων αυξάνεται μόνιμα

| No μέλια | MIC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | MIC ύστερα από έκθεση σε σταθερές συγκεντρώσεις μελιού | MIC ύστερα από έλεγχο παροδικής ή μόνιμης ανθεκτικότητας (απουσία μελιού) |
|----------|-----------------------------------|--|---|
| 1        | 6,25% v/v                         | 12,5% v/v  | 12,5% v/v   |
| 3        | 12,5% v/v                         | 12,5% v/v  | -   |
| 17       | 6,25% v/v                         | 12,5% v/v  | 12,5% v/v   |
| 18       | 6,25% v/v                         | 12,5% v/v  | 12,5% v/v   |
| 19       | 6,25% v/v                         | 12,5% v/v  | 12,5% v/v   |
| Manuka   | 12,5% v/v                         | 12,5% v/v  | -   |

Αντίστοιχα, για τον *Staphylococcus aureus*, όπως μπορούμε να δούμε και στο Πίνακα 4. τα μέλια με **No. 1, 3 και Manuka** μετά τη βραχυπρόθεσμη έκθεση τους σε σταθερή συγκέντρωση μελιού, δεν έδωσαν διαφορετική τιμή MIC από αυτή που μετρήσαμε αρχικά. Άρα δεν υπάρχει ένδειξη ανθεκτικότητας του *Staphylococcus aureus* ως προς τα μέλια αυτά. Αντιθέτως, η έκθεση του *Staphylococcus aureus* σε σταθερή συγκέντρωση του μελιού με **No. 17** οδήγησε σε παροδική ανθεκτικότητα του βακτηρίου, καθώς αυξήθηκε η τιμή MIC και η οποία φαίνεται όμως να χάνεται καθώς η τιμή MIC επανήλθε στα αρχικά επίπεδα μετά το τέλος της ανακαλλιέργειας των 12 ημερών απουσία μελιού. Ενώ, στην περίπτωση της έκθεσης του *Staphylococcus aureus* σε σταθερή συγκέντρωση μελιού με **No. 18 και 19** παρατηρείται μια μόνιμη ανθεκτικότητα του βακτηρίου, καθώς αυξήθηκε η τιμή

MIC και παρέμεινε και μετά το πέρας της ανακαλλιέργειας των 12 ημερών απουσία μελιού.

**Πίνακας 4.** Αποτελέσματα μετρήσεων MIC του *Staphylococcus aureus* μετά τη βραχυπρόθεσμη έκθεση του σε σταθερές συγκεντρώσεις δειγμάτων μελιού και της παροδικής ή μόνιμής φύσης της ανθεκτικότητας του

- **Με πράσινο χρώμα:** Το MIC των βακτηρίων παραμένει σταθερό
- **Με κόκκινο χρώμα:** Το MIC των βακτηρίων αυξάνεται μόνιμα
- **Με κίτρινο χρώμα:** Το MIC των βακτηρίων αυξάνεται παροδικά

| Νο μέλια | MIC <i>Staphylococcus aureus</i> | MIC ύστερα από έκθεση σε σταθερές συγκεντρώσεις μελιού | MIC ύστερα από έλεγχο παροδικής ή μόνιμης ανθεκτικότητας (απουσία μελιού) |
|----------|----------------------------------|--|---|
| 1        | 6,25% v/v                        | 6,25% v/v  | -   |
| 3        | 6,25% v/v                        | 6,25% v/v  | -   |
| 17       | 6,25% v/v                        | 12,5% v/v  | 6,25% v/v   |
| 18       | 3,125% v/v                       | 6,25% v/v  | 6,25% v/v   |
| 19       | 3,125% v/v                       | 6,25% v/v  | 6,25% v/v   |
| Manuka   | 6,25% v/v                        | 6,25% v/v  | -   |

4.3 Προσδιορισμός της ανθεκτικότητας βακτηρίων κλινικής σημασίας έναντι δειγμάτων μελιού, με βραχυπρόθεσμη έκθεση σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού

Προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση των μελιών μετά τη βραχυπρόθεσμη έκθεση των *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις δειγμάτων μελιών.

Όπως μπορούμε να δούμε στον πίνακα 5, τα μέλια με **No 3 και Manuka** μετά την βραχυπρόθεσμη έκθεση της *Pseudomonas aeruginosa* σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού, δεν έδωσαν διαφορετική τιμή MIC από αυτή που μετρήσαμε αρχικά. Άρα δεν υπάρχει ένδειξη ανθεκτικότητας της *Pseudomonas aeruginosa* ως προς αυτά τα μέλια. Ενώ το μέλι **No. 1** μετά από έκθεση σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού, φαίνεται ότι οδήγησε σε μόνιμη ανθεκτικότητα των βακτηρίων καθώς αυξήθηκε η τιμή MIC και παρέμεινε και μετά το πέρας της ανακαλλιέργειας των 12 ημερών απουσία μελιού.

**Πίνακας 5.** Αποτελέσματα μετρήσεων MIC της *Pseudomonas aeruginosa* μετά από της βραχυπρόθεσμη έκθεση της σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού και της παροδική ή μόνιμης φύσης της ανθεκτικότητας της

- **Με πράσινο χρώμα:** Το MIC των βακτηρίων παραμένει σταθερό
- **Με κόκκινο χρώμα:** Το MIC των βακτηρίων αυξάνεται μόνιμα
- **Με κίτρινο χρώμα:** Το MIC των βακτηρίων αυξάνεται παροδικά

| No μέλια | MIC<br><i>Pseudomonas<br/>aeruginosa</i> | MIC ύστερα από<br>έκθεση σε<br>σταθερές<br>συγκεντρώσεις<br>μελιού | MIC ύστερα από<br>έλεγχο παροδικής<br>ή μόνιμης<br>ανθεκτικότητας<br>(απουσία μελιού) |
|----------|--|--|---|
| 1        | 6,25% v/v                                | 12,5% v/v  | 12,5% v/v   |
| 3        | 12,5% v/v                                | 12,5% v/v  | -   |
| 17       | 6,25% v/v                                | 12,5% v/v  | 6,25% v/v   |
| 18       | 6,25% v/v                                | 12,5% v/v  | 6,25% v/v   |
| 19       | 6,25% v/v                                | 12,5% v/v  | 6,25% v/v   |
| 20       | 12,5% v/v                                | 12,5% v/v  | -   |
| Manuka   | 12,5% v/v                                | 12,5% v/v  | -   |

Αντίστοιχα, για τον ***Staphylococcus aureus***, όπως παρατηρείται και στον πίνακα 6, τα μέλια με **No 3 και 17 και Manuka** σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού, δεν έδωσαν διαφορετική τιμή MIC από αυτή που μετρήσαμε αρχικά. Άρα δεν υπάρχει ένδειξη της ανθεκτικότητας της *Pseudomonas aeruginosa* ως προς τα μέλια αυτά. Αντιθέτως, η έκθεση του *Staphylococcus aureus* σε σταδιακά αυξανόμενη συγκέντρωση του μελιού με **No. 1** οδήγησε σε παροδική ανθεκτικότητα του βακτηρίου, καθώς αυξήθηκε η τιμή MIC και η οποία φαίνεται όμως να χάνεται καθώς η τιμή MIC επανήλθε στα αρχικά επίπεδα μετά το τέλος της ανακαλλιέργειας των 12 ημερών απουσία μελιού. Ενώ, στην περίπτωση της έκθεσης του *Staphylococcus aureus* σε σταθερή συγκέντρωση μελιού με **No. 18, 19 και 20** παρατηρείται μια μόνιμη ανθεκτικότητα του βακτηρίου, καθώς αυξήθηκε η τιμή MIC και παρέμεινε και μετά το πέρας της ανακαλλιέργειας των 12 ημερών απουσία μελιού.

**Πίνακας 6.** Αποτελέσματα μετρήσεων MIC του *Staphylococcus aureus* μετά από της βραχυπρόθεσμη έκθεση της σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού και της παροδική ή μόνιμης φύσης της ανθεκτικότητας της

- **Με πράσινο χρώμα:** Το MIC των βακτηρίων παραμένει σταθερό
- **Με κόκκινο χρώμα:** Το MIC των βακτηρίων αυξάνεται μόνιμα
- **Με κίτρινο χρώμα:** Το MIC των βακτηρίων αυξάνεται παροδικά

| Νο μέλια | MIC <i>Staphylococcus aureus</i> | MIC ύστερα από έκθεση σε σταθερές συγκεντρώσεις μελιού | MIC ύστερα από έλεγχο παροδικής ή μόνιμης ανθεκτικότητας (απουσία μελιού) |
|----------|----------------------------------|--|---|
| 1        | 6,25% v/v                        | 12,5% v/v  | 6,25% v/v   |
| 3        | 6,25% v/v                        | 6,25% v/v  | -   |
| 17       | 6.25% v/v                        | 6,25% v/v  | -   |
| 18       | 3,125% v/v                       | 6,25% v/v  | 6,25% v/v   |
| 19       | 3,125% v/v                       | 6,25% v/v  | 6,25% v/v   |
| 20       | 3,125% v/v                       | 6,25% v/v  | 6,25% v/v   |
| Manuka   | 6,25% v/v                        | 6,25% v/v  | -   |

#### 4.4 Οπτικός προσδιορισμός της ανθεκτικότητας βακτηρίων με την μέθοδο διάχυσης σε άγαρ

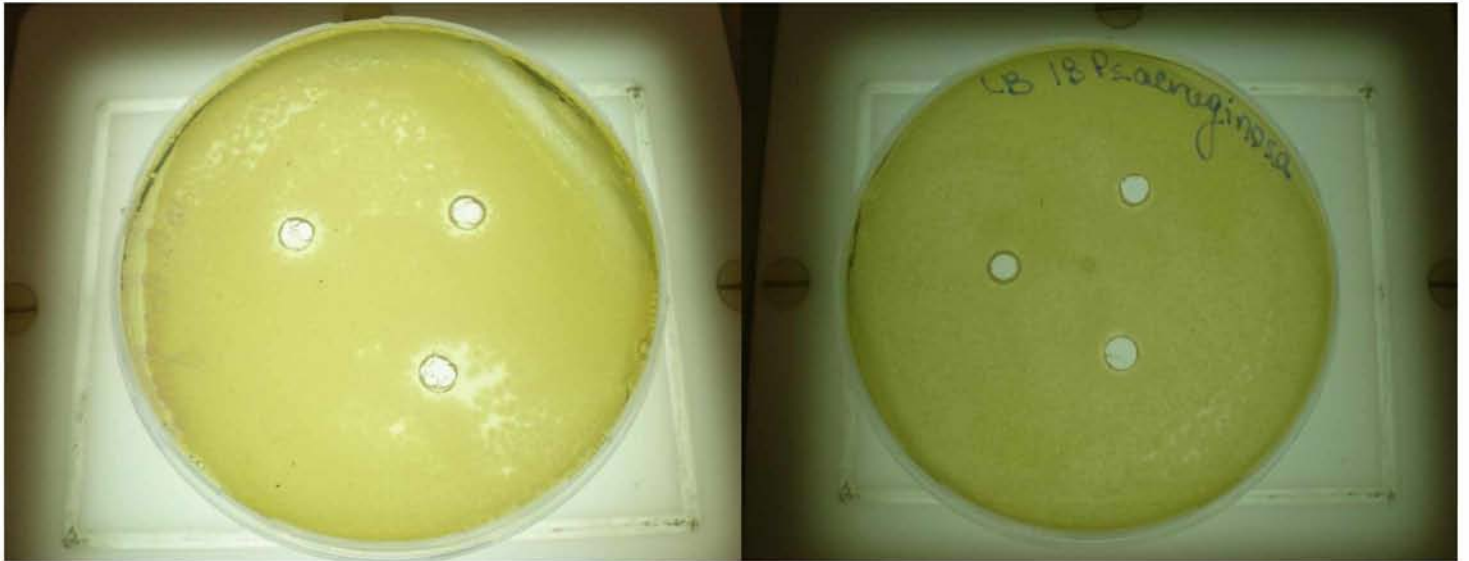
Με την βοήθεια της μεθόδου διάχυσης σε άγαρ έγινε οπτική ανάλυση και επιβεβαίωση για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των βακτηρίων με την βραχυπρόθεσμη έκθεση τους σε σταθερές ή σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω και περιγράφονται στους παρακάτω πίνακες και για τα δύο βακτήρια. Σημαντικό αποτέλεσμα είναι το ότι για τα βακτήρια τα οποία εμφάνισαν ανθεκτικότητα έναντι των μελιών δεν παρατηρήθηκε ζώνη αναστολής, σε αντίθεση με τα βακτήρια τα οποία δεν εκπαιδεύτηκαν σε σταθερές ή σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιών εμφάνισαν έντονες ζώνες αναστολής γύρω από το μέλι.

#### *Pseudomonas aeruginosa*

#### Πίνακας 9. Αποτελέσματα μετρήσεων της διαμέτρου ζώνης αναστολής σε βακτήρια *Pseudomonas aeruginosa* (μέσος όρος και τυπική απόκλιση)

| Νο μελιού | Διάμετρος ζώνης αναστολής |
|-----------|---------------------------|
| 1         | 8.3mm ± 2.335             |
| 18        | 12mm ± 1                  |
| 19        | 11.3mm ± 2.335            |
| 20        | 11mm ± 1                  |





Εικόνα 8.

Εικόνα 9.

**Εικόνες 8 και 9.** Παρατηρείται ζώνη αναστολής στα βακτήρια *Pseudomonas aeruginosa* τα οποία εκπαιδεύτηκαν σε σταθερές ή σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού (εικόνα 8), σε αντίθεση με τα βακτήρια τα οποία έχουν εκπαιδευτεί και έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα (εικόνα 9).

*Staphylococcus aureus*

**Πίνακας 8.** Αποτελέσματα μετρήσεων της διαμέτρου ζώνης αναστολής σε βακτήρια *Staphylococcus aureus* (μέσος όρος και τυπική απόκλιση)

| Νο μελιού | Διάμετρος ζώνης αναστολής |
|-----------|---------------------------|
| 1         | 12mm ± 1                  |
| 18        | 13.3mm ± 1.335            |
| 19        | 9.3mm ± 2.335             |
| 20        | 11.6mm ± 0.34             |



Εικόνα 10.



Εικόνα 11.

**Εικόνες 10 και 11.** Παρατηρείται ζώνη αναστολής στα βακτήρια *Staphylococcus aureus* τα οποία εκπαιδεύτηκαν σε σταθερές ή σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού (εικόνα 10), σε αντίθεση με τα βακτήρια τα οποία έχουν εκπαιδευτεί και έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα (εικόνα 11).

## 5.Συζήτηση

Η εύρεση εναλλακτικών θεραπειών είναι αναγκαία αφού η χρήση αντιβιοτικών οδήγησε στην εξάπλωση ανθεκτικών βακτηρίων (Alandejani et al., 2009). Η χρήση του μελιού αποτελεί μια τέτοια θεραπεία, και έχει γίνει γνωστό για την αντιμικροβιακή του δράση. Πιο συγκεκριμένα, έρευνες έδειξαν ότι η χρήση του μελιού ενάντια σε κλινικά απομονωμένα στελέχη *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* θανάτωσε τα κύτταρα που ήταν σε ελεύθερη διαβίωση, σε όλα τα στελέχη που δοκιμάστηκαν (Alandejani et al., 2009). Το ερώτημα, όμως που τίθεται είναι εάν η χρήση του μελιού ως εναλλακτική θεραπεία μπορεί να οδηγήσει τελικά στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας ανάλογης με αυτής που αναπτύσσουν τα βακτήρια στα αντιβιοτικά.

Στην παρούσα εργασία, έγινε η διερεύνηση της πιθανής ανθεκτικότητας παθογόνων βακτηρίων *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* έναντι της παρατεταμένης έκθεσης τους σε διάφορα μέλια του Ολύμπου, σε σύγκριση με το μέλι Manuka. Η διερεύνηση της ανθεκτικότητας έγινε με δύο τρόπους: α) βραχυπρόθεσμη έκθεση υπό σταθερές συγκεντρώσεις μελιού για 12 συνεχείς μέρες και διερεύνηση της παροδικής ή μόνιμης φύσης της ανθεκτικότητας των κλινικών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* έναντι συγκεκριμένων μελιών μετά το τέλος της έκθεσης τους για 12 συνεχείς μέρες, χρησιμοποιώντας τα βακτήρια που εκτέθηκαν στο μέλι για ανακαλλιέργεια 10 ημερών απουσία μελιού και β) βραχυπρόθεσμη έκθεση σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού για 12 συνεχείς μέρες και διερεύνηση της παροδικής ή μόνιμης φύσης της ανθεκτικότητας των *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* έναντι συγκεκριμένων μελιών μετά το τέλος της έκθεσης τους για 12 συνεχείς μέρες, χρησιμοποιώντας τα βακτήρια που εκτέθηκαν στο μέλι για ανακαλλιέργεια 10 ημερών απουσία μελιού.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων συνοψίζονται στις εξής κατηγορίες:

Υπό σταθερή συγκέντρωση μελιού ανάλογα με την *ελάχιστη ανασταλτική τους συγκέντρωση (MIC)* έναντι βακτηρίων *Pseudomonas aeruginosa*:

α) ανάπτυξη μόνιμης ανθεκτικότητας βακτηρίων έναντι των μελιών με αριθμό 1,17,18,19

β) βακτήρια τα οποία δεν ανέπτυξαν ανθεκτικότητα έναντι του μελιού με αριθμό 3.

Υπό σταθερή συγκέντρωση μελιού ανάλογα με την *ελάχιστη ανασταλτική τους συγκέντρωση (MIC)* έναντι βακτηρίων *Staphylococcus aureus* :

α) ανάπτυξη μόνιμης ανθεκτικότητας βακτηρίων έναντι των μελιών με αριθμό 18,19 β) ανάπτυξη παροδικής ανθεκτικότητας βακτηρίων έναντι μελιών με αριθμό 17 και γ) βακτήρια τα οποία δεν ανέπτυξαν ανθεκτικότητα έναντι μελιών με αριθμό 1, 3

Υπό αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού ανάλογα με την *ελάχιστη ανασταλτική τους συγκέντρωση (MIC)* έναντι βακτηρίων *Pseudomonas aeruginosa*:

α) ανάπτυξη μόνιμης ανθεκτικότητας βακτηρίων έναντι του μελιού με αριθμό 1 β) ανάπτυξη παροδικής ανθεκτικότητας βακτηρίων έναντι μελιών με αριθμό 17,18,19 και γ) βακτήρια τα οποία δεν ανέπτυξαν ανθεκτικότητα έναντι μελιών με αριθμό 3 και 20

Υπό αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού ανάλογα με την *ελάχιστη ανασταλτική τους συγκέντρωσης (MIC)* έναντι βακτηρίων *Staphylococcus aureus* :

α) ανάπτυξη μόνιμης ανθεκτικότητας βακτηρίων έναντι μελιών με αριθμό 18,19 και 20 β) ανάπτυξη παροδικής ανθεκτικότητας βακτηρίων έναντι του μελιού με αριθμό 1 και γ) βακτήρια τα οποία δεν ανέπτυξαν ανθεκτικότητα έναντι μελιών με αριθμό 3 και 20

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη αποδεικνύει τα εξής: Α) Στα περισσότερα μέλια φαίνεται ότι η ανακαλλιέργεια βακτηρίων σε συγκέντρωση μελιών μικρότερη της MIC οδήγησε σε ανθεκτικότητα των στελεχών Β) Είναι πολύ σημαντικό στην κλινική πρακτική η χρήση του μελιού να γίνεται στην σωστή συγκέντρωση (ίση ή και μεγαλύτερη της MIC) ώστε να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα ανθεκτικότητας. Γ) Στο μέλι με αριθμό 3, ένα μέλι με μέτρια αντιμικροβιακή δράση, δεν υπήρξε ένδειξη ανθεκτικότητας σε κανένα από τα δύο πειράματα και σε κανένα από τα δύο βακτήρια.

## 6. Βιβλιογραφία

### Ελληνική

1. Δερματόπουλος Β.(1949) Βασικές γνώσεις σύγχρονης μελισσοκομίας. Έκδοση Μελισσοκομικού Συνεταιρισμού Θεσσαλονίκης. σελ. 40-41.
2. Δημητριάδης Κ. (2005). Μελίαμα. Περιοδική έκδοση επιστημονικού κέντρου μελισσοθεραπείας. Τεύχος 3. Φθινόπωρο-Χειμώνας 2005-2006. Σελ 14.
3. Ζερφυρίδης, Γ. (1998). Διατροφή του Ανθρώπου. Τέταρτη Έκδοση. Εκδόσεις Γιαχούδη. Θεσσαλονίκη, Ελλάδα.
4. Θρασυβούλου Α. και Μανίκης Ι.( 1990) Κατηγορίες Ελληνικού μελιού Μελισσοκομική Επιθεώρηση 4 (6): 158-160.
5. Θρασυβούλου Α. και Μανίκης Ι.( 1993) Η ταυτότητα του ελληνικού μελιού. Πρακτικά ημερίδας: Το μέλι. Δυνατότητες Πληρέστερης Εκμετάλλευσης της μέλισσας. Γερακινή Χαλκιδικής, 2 Οκτωβρίου, 1992. Γεωτεχνικό Επιμελητήριο Ελλάδας. Σελ 121-132.
6. Θρασυβούλου Ανδρέας, 2001 Πρακτική μελισσοκομία Θεσσαλονίκη pg.11-12, 25-26, 149-195.
7. Καϊλίδης Σ.Δ. (1965) *Monophlebus hellenicus (=Marchalina hellenica)* Genn, Το μελισσοτροφικό έντομο της πεύκης, Δασικά χρονικά 81/82 (7-8): 1-16
8. Μπίκος Θ. (1991) Όλα για το μέλι. Έκδοση του ιδίου. σελ. 263-270.
9. Νικολόπουλος Α., Τεντολούρης Ν., Κωστάκη Μ., Κατσιλάμπρος Ν., 2006 Λοιμώξεις στο διαβητικό πόδι Archives of Hellenic Medicine 23(3):222-232
10. Σταθόπουλος Κ. (1993) Υγιεινή και διατροφική αξία του μελιού. Πρακτικά εκδήλωσης της επιτροπής προώθησης του Ελληνικού μελιού. Αθήνα
11. Τσέλλιος Δ. και Θρασυβούλου Α. (1989) Μελισσοκομικοί χειρισμοί και μελισσοκομικά φυτά 2(7-8): 208-210
12. Τυπάλδος – Ξυδιάς Α, 1979 Θάσος και Κασσάνδρα: οι μεγαλύτερες μελισσοκομικές περιφέρειες της Ελλάδας, Μελισσοκομική Ελλάς (29): 105-111
13. Υφαντίδης Μ. (1983) Μελισσοκομία, επιστήμη και εφαρμογή. Εκδόσεις Τσολακοπούλου, Θεσσαλονίκη. σελ. 56-67.
14. Υφαντίδης Δ. Μιχαήλ (2005) Η σύγχρονη μελισσοκομία ως επιστήμη και πράξη pg.505-515

15. Χαριζάνης Π. (1989) Ευκάλυπτος, το δέντρο που υπόσχεται πολλά στη μελισσοκομία, Μελισσοκομική Επιθεώρηση 3(3) 69-71
16. Χαριζάνης Π. (1996β) Ευκάλυπτος: ένα δέντρο με πολλά πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα, Μελισσοκομική Επιθεώρηση 10 (12) 487-489

### Ξενόγλωσση

1. Adams CJ, Manley-Harris M, Molan PC (2009). The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr Res* 344:1050-1053.
2. Adesunkanmi, K.; Oyelami, O. A. (1994) The pattern and outcome of burn injuries at Wesley Guild Hospital, Ilesha, Nigeria: a review of 156 cases. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 97(2): 108-112
3. Alandejani, T., Marsan, J., Ferris, W., Slinger, R. and Chan, F. (2009). Effectiveness of honey on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 141,114-118.
4. Allen KL, Molan PC, Reid GM (1991) A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *J Pharm Pharmacol* 43: 817–822
5. Al-Waili, N., Al Ghamdi, A., Javed Ansari, M., Al-Attal, Y., Al-Mubarak, A. and Salom, K. (2013). Differences in composition of honey samples and their impact on the antimicrobial activities against drug multiresistant bacteria and pathogenic fungi. *Archives of Medical Research* 44 (4), 307-316.
6. Annapoorani, A., Kalpana, B., Syed Musthafa, K., Karutha Pandian, S. and Veera Ravi, A. (2013). Antipathogenic potential of *Rhizophora* spp. against the quorum sensing mediated virulence factors production in drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Phytomedicine* 20 (11), 956-963.
7. Anthimidou, E. and Mossialos, D. (2013). Antibacterial Activity of Greek and Cypriot Honeys against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in Comparison to Manuka Honey. *Journal of Medicinal Food* 16 (1), 42-47.
8. Atkinson, S. and Williams, P. (2009). Quorum sensing and social networking in the microbial world. *Journal of the Royal Society Interface* 6 (40), 959-978.
9. Bartlett A.H., K.G. Hulten (2010), *Staphylococcus aureus* pathogenesis: secretion systems, adhesins, and invasions *Pediatr Infect Dis J*, 29 pp. 860–861

10. Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 2008;46:344–9.
11. Carnwath, R., Graham, E., Reynolds, K. and Pollock, P. (2013). The antimicrobial activity of honey against common equine wound bacterial isolates.
12. Cavalca L., Di Gennaro P., Colombo M., Andreoni V., Bernasconi S., Ronco I. and Bestetti G. (2000). Distribution of catabolic pathways in some hydrocarbon-degrading bacteria from a subsurface polluted soil. Res. Microbiol., 151: 877 – 887.
13. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D, Fridkin SK. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Investigative Team. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. N Engl J Med.2003;348:1342–1347.
14. Cooper RA and Molan PC , 1999 The use of honey as an antiseptic in managing *Pseudomonas* infection. J. Wound Care 8 (4) 161-164
15. Cooper, R., Molan, P. and Harding, K. (2002). The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. Journal of Applied Microbiology 93, 857-863.
16. dos Santos NS, Athayde Aguiar AJ, de Oliveira CE, Veríssimo de Sales C, de Melo E Silva S, Sousa da Silva R, Stamford TC, de Souza EL. Food Microbiol. 2012 Dec;32(2):345-53. doi: 10.1016/j.fm.2012.07.014. Epub 2012 Aug 7. Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.).
17. Dustmann J.H, 1979 Antibacterial effect of honey. Apiacta 14
18. Efem, S. (1988). Clinical observations on the wound healing dressing with pure natural honey. British Journal of Surgery 75, 679-681.
19. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG (2002), The evolutionary history of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Proc Natl Acad Sci USA;99:7687-7692
20. Fatholahzadeh B, Emaneini M, Feizabadi MM, et al. Characterisation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from two hospitals in Tehran, Iran. Int J Antimicrob Agents. 2009;33:264–5.

21. Feás X, Estevinho ML. (2011) J Med Food. A survey of the in vitro antifungal activity of heather (*Erica* sp.) organic honey, Oct;14(10):1284-8. doi: 10.1089/jmf.2010.0211. Epub 2011 Jun 11.
22. Fito-Boncompte Laurene, Chapalain Annelise, Bouffartigues Emeline, Chaker Hichem, Lesouhaitier Olivier, Gicquel Gwendoline, Bazire Alexis, Madi Amar, Connil Nathalie, Veron Wilfried, Taupin Laure, Toussaint Bertrand, Cornelis Pierre, Wei Qing, Shioya Koki, Deziel Eric, Feuilloley Marc G. J., Orange Nicole, Dufour Alain, Chevalier Sylvie (2011). Full Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Requires OprF. Infect. Immun., 79(3): 1176
23. Fridkin S.K., J.C. Hageman, M. Morrison, L.T. Sanza, K. Como-Sabetti, J.A. Jernigan, K. Harriman, L.H. Harrison, R. Lynfield, M.M. Farley (2005), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities N Engl J Med, 352 pp. 1436–1444
24. Gefen O, Chekol B, Strahilevitz J, Balaban Q (2017), TDtest: easy detection of bacterial tolerance and persistence in clinical isolates by a modified disk-diffusion assay, Nature (Scientific Reports)
25. Herold B.C. , L.C. Immergluck, M.C. Maranan, D.S. Lauderdale, R.E. Gaskin, S. Boyle-Vavra, C.D. Leitch, R.S. Daum (1998), Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk JAMA, 279 pp. 593–598
26. Hiramitsu K. (1995), Molecular evolution of MRSA. Microbiol Immunol; 39:531-543
27. Hiramitsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother. 1997;40:135–136.
28. Jevons MP (1961), 'Celbenin'-resistant *staphylococci*. BMJ. ;1:124–125.
29. Karadzic I., Masui A., Zivkovic L.I., Fujiwara N. (2006). Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil as component of metalworking fluid. J. Biosc. Bioeng. 102: 82 – 89.
30. Kimata N., Nishino T., Suzuki S., Kogure K. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* isolated from marine environments in Tokyo Bay. Microb. Ecol. 47: 41 – 47.
31. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, et al. (2007) Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA. ;298(15):1763–1771. French



32. Kwakman, P., Van Den Akker, J., Güçlü, A., Aslami, H., Binnekade, J., De Boer, L., Boszhard, L. et al. (2008). Medical-grade honey kills antibiotic-resistant bacteria in vitro and eradicates skin colonization. *Clinical Infectious Diseases* 46 (11), 1677-1682.
33. Kwakman, P., te Velde, A., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, C. and Zaat, S. (2010). How honey kills bacteria. *The FASEB Journal* 24 (7), 2576-2582.
34. Larson, Jennifer (2001) *Greek Nymphs : Myth, Cult, Lore*. Oxford University Press pp. 88.
35. Manwar, A., Khandelwal, S., Chaudhari, B., Meyer, J. and Chincholkar, S. (2004). Siderophore production by a Marine *Pseudomonas aeruginosa* and its antagonistic action against phytopathogenic fungi. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 118 (1-3), 243-251.
36. Mavric E, Wittmann S, Barth G, Henle T. (2008), Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Mol Nutr Food Res* 52: 483–489
37. Molan P (1992), The antibacterial nature of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World*, 73(1):5-28
38. Molan, P.C. (1992a), The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World* 73 (1), 5 – 28. Molan, P.C., 1992b. The antibacterial activity of honey: 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. *Bee World* 73 (2), 59– 76.
39. Molan P (1998), A brief review of the use of honey as a clinical dressing. *Australian J of Management*; 6:148–158
40. Molan, P.C. (1999a), The role of honey in the management of wounds. *Journal of Wound Care* 8 (8): 423-426
41. Molan, P.C. (1999b), Why honey is effective as a medicine. 1. Its use in modern medicine. *Bee World* 80 (2): 80-92
42. Mossialos, D. and Amoutzias, G. (2007). Siderophores in fluorescent *pseudomonas*: new tricks from an old dog. *Future Microbiology* 2 (4), 387-395.
43. Mossialos, D. and Amoutzias, G. (2009). Role of siderophores in cystic fibrosis pathogenesis: Foes or friends? *International Journal of Medical Microbiology* 299 (2), 87-98.

44. Mundo, M.A., Padilla-Zakour, O.I., Worobo, R.W. (2004), Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *International Journal of Food Microbiology* 97, 1–8
45. Naimi T.S., K.H. LeDell, K. Como-Sabetti, S.M. Borchardt, D.J. Boxrud, J. Etienne, S.K. Johnson, F. Vandenesch, S. Fridkin, C. O’Boyle et al. (2003), Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection *JAMA*, 290 pp. 2976–2984
46. National Honey Board Carbohydrates and the sweetness of honey (2010).
47. Ndayisaba, G., Bazira, L., Habonimana, E., Muteganya, D. (1993), Clinical and bacteriological results in wound treated with honey. *Journal of Orthopedic Surgery* 7 (2): 202-204
48. Olaitan, P., Adeleke, O. and Ola, I. (2007). Honey: A reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences* 7 (3), 159-165.
49. Otto M. (2010), Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* *Annu Rev Microbiol*, 64 pp. 143–162.
50. Pellett S., Bigley D.V., Grimes D.J. (1983). Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in a riverine ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 328 – 332.
51. Ramirez MS, Tolmasky ME. (2010), Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*.;13:151–71.
52. Santas L. (1983), Insects producing honeydew exploited by bees in Greece. *Apidologie* 14(2):93-103.
53. Schindler BD, Jacinto P, Kaatz GW. (2013) Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: current status of potentiating existing antibiotics. *Future Microbiol.* Apr;8(4):491-507.
54. Schwartz T., Volkmann H., Kirchen S., Kohnen W. Schon-Holz K., Jansen B., Obst U. (2006). Real-time PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical and municipal wastewater and genotyping of the ciprofloxacin-resistant isolates. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 57: 158 – 167.
55. Seeley T.D. (1985) Honeybee ecology. Princeton University Press, USA.
56. Serrano-Díaz J, Sánchez AM, Maggi L, Martínez-Tomé M, García-Diz L, Murcia MA, Alonso GL. (2012), Increasing the applications of *Crocus sativus* flowers as natural antioxidants *J Food Sci.* Nov;77(11):C1162-8. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02926.x. Epub 2012 Oct 11.

57. Sherlock, O., Dolan, A., Athman, R., Power, A., Gethin, G., Cowman, S. and Humphreys, H. (2010). Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Complementary and Alternative Medicine* 10 (47), 1-5.
58. Smith, R. and Iglewski, B. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *Journal of Clinical Investigation* 112 (10), 1460–1465.
59. Styers D, Sheehan DJ, Hogan P, Sahm DF. (2006), Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*: 2005 status in the United States. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*;5:2.
60. Taormina, P., Niemira, B. and Beuchat, L. (2001). Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *International Journal of Food Microbiology* 69, 217-225.
61. Thomas Patton, John Barrett, James Brennan, Noel Moran (2005), Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey, Institute of technology Sligo, IT Sligo, Ballinode, Sligo, Ireland 64(1):84-95
62. Wang, R., Starkey, M., Hazan, R. and Rahme, L. (2012). Honey's ability to counter bacterial infections arises from both bactericidal compounds and QS inhibition. *Frontiers in Microbiology* 3 (144), 1-8.
63. Weston, R. (2000). The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chemistry* 71 (2), 235-239.
64. White J.W. Jr, Subers MH, Schepartz AI. (1963), The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochim Biophys Acta*, 73:57-70.
65. White J.W. Jr. (1993), Honey, in the hive and the honey bee, Dadant and Sons Publication Hamilton- Illinois p.p. 869-895
66. Wilkins A.L., Yinrong L. (1993) Extractable organic substances from New Zeland Unifloral Manuka (*Leptospermum Scoparium*) Honey *Journal of Apicultural Research* 32(1) : 3-9.
67. Winston L Mark (1987), *The Biology of the honey bee*, Harvard University Press Cambridge Massachusetts London England p.p.281

68. Wolfgang M.C., Kulasekara B.R., Liang X., Boyd D., Wu K., Yang Q. (2003). Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci., U S A, 100: 8484 – 8489.
69. Yeterian, E., Martin, L., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I. and Schalk, I. (2010). Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. Amino Acids 38 (5), 1447-1459.
70. Zumla and Lulat (1989), Honey- a remedy rediscovered, Journal of the Royal Society of Medicine 82, 384-385