

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕΛΙΩΝ  
ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΟΛΥΜΠΟΥ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ GRAM  
ΑΡΝΗΤΙΚΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ PSEUDOMONAS  
AERUGINOSA

Παπαϊκονόμου Σταματία

Λάρισα 2014

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης μελιών της περιοχής του Ολύμπου έναντι  
του Gram αρνητικού *Pseudomonas aeruginosa*



### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

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

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

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

## **Ευχαριστίες**

Θερμά ευχαριστώ τον επιβλέποντα Καθηγητή μου, κ. Μόσιαλο Δημήτριο, για την ευκαιρία που μου έδωσε, συμπεριλαμβάνοντας με στην επιστημονική του ομάδα, να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα διευρύνοντας τους επιστημονικούς μου ορίζοντες. Επίσης θέλω να ευχαριστήσω και τα μέλη της επιτροπής, τον κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη και τον κ. Καρπούζα Δημήτριο.

Επίσης ευχαριστώ, τους συναδέλφους μου και όλη την ομάδα του εργαστηρίου και ιδιαίτερα την κ. Νικολούλη Κατερίνα για την άριστη συνεργασία και βοήθεια. Ευχαριστώ την οικογένεια μου και τους φίλους μου, για την υποστήριξή τους που ήταν πάντα δίπλα μου πρόθυμοι να βοηθήσουν.

## Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη .....	8
Abstract.....	10
Εισαγωγή .....	11
Χρήση του μελιού ως φάρμακο-αντιμικροβιακό σκεύασμα.....	11
1. Μέλι.....	13
1.1. Τι είναι μέλι.....	13
1.2. Σύσταση του μελιού.....	14
1.3. Ιδιότητες.....	14
1.4. Ευεργετικές ιδιότητες.....	15
1.5. Το μέλι ως αντιμικροβιακός παράγοντας.....	16
1.5.1. Ουσίες και παράγοντες που προκαλούν την αντιμικροβιακή δράση .....	17
1.5.1.1. Υπεροξειδίο του υδρογόνου.....	17
1.5.1.2. Χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό(υψηλή συγκέντρωση σακχάρων).....	18
1.5.1.3. Χαμηλό pH .....	18
1.5.1.4. Μεθυλογλυοξάλη.....	18
1.5.1.5. Αμυντοσίνη-1.....	19
1.5.1.6. Άλλες αντιμικροβιακές ουσίες του μελιού.....	20
1.6. Το μέλι Mānuka.....	20
1.6.1. Ταυτοποίηση.....	21
1.6.2. Το μέλι manuka ως τροφή.....	22
1.6.3. Φαρμακευτικές ιδιότητες.....	22
1.6.4. Συστατικά του μελιού Manuka .....	24
1.7. Είδη μελιών .....	24
1.7.1. Κατηγορίες μελιών.....	25
2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Ψευδομονάδα η πνοκυανική ή αεριογόνος).....	30
2.1. Χαρακτηριστικά .....	31
2.2. Αντίσταση στα αντιβιοτικά .....	34
2.3. Ασθένειες που προκαλούνται από <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	34
3. Σκοπός της παρούσας μελέτης .....	37
4. Υλικά και μέθοδοι.....	37
4.1. Υλικά .....	37

4.1.1.	Δείγματα μελιών .....	37
4.1.2.	Θρεπτικά υποστρώματα .....	39
4.2.	Μέθοδοι.....	41
4.2.1.	Εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των μελιών με τη μέθοδο Διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια ( <i>wells diffusion method</i> ).....	42
4.2.2.	Εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των δειγμάτων μελιού μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης ( <i>minimum inhibitory concentration</i> ) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης ( <i>microtiter plates</i> ).....	43
4.2.3.	Εκτίμηση των μηχανισμών της αντιμικροβιακής ικανότητας των μελιών μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης ( <i>minimum inhibitory concentration</i> ) με την χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης ( <i>microtiter plates</i> ) με την προσθήκη α) καταλάσης β) πρωτεΐνάσης K. ....	47
5.	Αποτελέσματα.....	50
5.1.	Εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των μελιών μέσω της <i>Μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (Well diffusion method)</i> .....	50
5.2.	Προσδιορισμός των μηχανισμών δράσης της αντιμικροβιακής ικανότητας των δειγμάτων μελιού με τον καθορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης ( <i>minimum inhibitory concentration</i> ) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης ( <i>microtiter plates</i> ) μετά την προσθήκη α) καταλάσης β) πρωτεΐνάσης K. ....	53
4.	Συζήτηση .....	54
5.	Βιβλιογραφία .....	57



## Περίληψη

Σήμερα πολλοί αντιμικροβιακοί παράγοντες είναι ουσιαστικά σημαντικοί στο να μειώνουν πολλές επιβαρυντικές για τον ανθρώπινο οργανισμό μολυσματικές ασθένειες. Ωστόσο όσο ανθεκτικές μορφές παθογόνων αναπτύσσονται και εξαπλώνονται, η αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών είναι μειωμένη. Αυτό το είδος της βακτηριακής αντοχής στους αντιμικροβιακούς παράγοντες αποτελεί μια πολύ σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία, και για όλα τα είδη των αντιβιοτικών, οι συχνότητες αυξάνονται σε παγκόσμιο επίπεδο. Ως εκ τούτου, εναλλακτικές αντιμικροβιακές στρατηγικές απαιτούνται επείγοντως, και συνεπώς η κατάσταση αυτή έχει οδηγήσει σε μια επαναξιολόγηση της θεραπευτικής χρήσης αρχαίων θεραπειών, όπως φυτών και προϊόντων αυτών, συμπεριλαμβανομένων και το μέλι. Η χρήση της παραδοσιακής ιατρικής για τη θεραπεία των λοιμώξεων έχει ασκηθεί από την αρχαιότητα, και το μέλι που παράγεται από το είδος *Apis mellifera* είναι ένα από τα παλαιότερα παραδοσιακά φάρμακα που θεωρούνται σημαντικά στην θεραπεία πολλών ανθρώπινων παθήσεων (Mandal M et al 2011). Στη παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν δώδεκα δείγματα μελιού από την ευρύτερη περιοχή του Ολύμπου ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν την ανάπτυξη του αρνητικού κατά Gram βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*. Επιπλέον διερευνήθηκαν και οι πιθανοί μηχανισμοί που συμβάλλουν στην αντιβακτηριακή τους δράση. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν και συγκρίθηκαν με το μέλι Manuka 25+, το καλύτερο αντιμικροβιακό μέλι παγκοσμίως και ένα τεχνητό μέλι του εργαστηρίου.

Για την εκτίμηση της αντιβακτηριακής ικανότητας των μελιών έναντι της *Pseudomonas aeruginosa* χρησιμοποιήθηκαν δύο in vitro μέθοδοι: α) η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (well diffusion method) και β) η μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration, M.I.C) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοδότησης (microtiter plates). Για την διερεύνηση των πιθανών μηχανισμών της αντιβακτηριακής δράσης των μελιών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration, M.I.C) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοδότησης (microtiter plates) με τη προσθήκη δύο ενζύμων: α) καταλάσης και β) πρωτεΐνάσης K. Η καταλάση διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), ενώ η πρωτεΐνάση K διασπά ολιγοπεπτίδια ή πρωτεΐνες που εμφανίζουν αντιβακτηριακή δράση.

Από τη πρώτη in vitro μέθοδο παρατηρήσαμε πως όλα τα μέλια εμφάνισαν αντιβακτηριακή δράση εναντίον της *Pseudomonas aeruginosa*. Συγκεκριμένα



3 από τα 12 δείγματα μελιών εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερη ζώνη αναστολής σε σχέση με το μέλι Manuka 25+. Από τη δεύτερη μέθοδο παρατηρήσαμε πως 3 από τα 12 συνολικά δείγματα μελιών εμφάνισαν μικρότερη ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (6,25%v/v) σε σχέση με το μέλι Manuka25+ (12,5% v/v).

Στη τρίτη και τελευταία μέθοδο, για τη διερεύνηση των μηχανισμών της αντιβακτηριακής δράσης των μελιών της περιοχής του Ολύμπου, παρατηρήσαμε πως με τη προσθήκη της καταλάσης όλα τα δείγματα εμφάνισαν αύξηση της ελάχιστης ανασταλτικής του συγκέντρωσης, πράγμα το οποίο σημαίνει πως η αντιβακτηριακή δράση των μελιών έναντι της *Pseudomonas aeruginosa* οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ενώ με τη προσθήκη της πρωτεΐνης K, μόνο 3 από τα 12 δείγματα μελιού εμφάνισαν αύξηση της ελάχιστης ανασταλτικής τους συγκέντρωσης, πράγμα το οποίο σημαίνει πως η αντιβακτηριακή δράση των μελιών αυτών έναντι της *Pseudomonas aeruginosa* οφείλεται τόσο στην ύπαρξη υπεροξειδίου του υδρογόνου όσο και στην παραγωγή ολιγοπεπτιδίων ή αντιβακτηριακών πρωτεϊνών.

## Abstract

Nowadays many antimicrobial agents are important to substantially reduce many aggravating for the human organism infectious diseases. However, as resistant forms of pathogens grow and spread, the effectiveness of antibiotics is reduced. This type of bacterial resistance to antimicrobial agents is a very serious threat to public health, and for all kinds of antibiotics, the frequencies are increased globally. Therefore, alternative antimicrobial strategies are urgently required, and therefore the situation has led to a reassessment of the therapeutic use of ancient treatments, such as plants and their products, including honey. The use of traditional medicine for the treatment of infections is brought by the origin of mankind, and the honey produced by *Apis mellifera* species is one of the oldest traditional medicines that are important in the treatment of many human diseases (Mandal M et al 2011). In the present study, twelve samples of honey from the region of Olympus were tested for their ability to inhibit the growth of Gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. Moreover, there were investigated possible mechanisms that contribute to the antibacterial activity. All samples were tested and compared with honey Manuka 25+, the best antimicrobial honey in the world and an artificial honey of the laboratory.

To evaluate the antibacterial ability of the honeys against *Pseudomonas aeruginosa* there were used two in vitro methods: a) the method of diffusion in agar wells (well diffusion method) and b) the method of determining the minimum inhibitory concentration (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) using microtiter plates (microtiter plates). To investigate the possible mechanisms of the antibacterial activity of the honeys, the method of determining the minimum inhibitory concentration (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) using microtiter plates (microtiter plates) with the addition of two enzymes was used: a) catalase, and b) proteinase K. The catalase breaks down the hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), and proteinase K breaks down oligopeptides or proteins showing antibacterial activity.

From the first in vitro method we observed that all honeys showed antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. In particular, three out of 12 samples of honey showed statistically significantly greater zone of inhibition compared with honey Manuka 25+. From the second method we observed that three out of 12 honey samples showed lower minimum inhibitory concentration (6,25% v/v) in relation to honey Manuka 25+ (12,5% v/v).

In the third and last method, in order to investigate the mechanisms of the antibacterial activity of honeys in the region of Olympus, we observed that with the addition of catalase, all samples showed an increase of the minimum inhibitory

concentration, which means that the antibacterial activity of honeys against *Pseudomonas aeruginosa* is largely caused by the production of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), and by the addition of proteinase K, only 3 of the 12 samples of honey showed increase of the minimum inhibitory concentration, which means that the antibacterial activity of those honeys against *Pseudomonas aeruginosa* is caused by the production of antibacterial proteins or oligopeptides.

## Εισαγωγή

### Χρήση του μελιού ως φάρμακο-αντιμικροβιακό σκεύασμα

Για αρκετά χιλιάδες χρόνια οι πληγές αντιμετωπίζονταν τοπικά με σχετικά μικρή προετοιμασία αντιμικροβιακών παραγόντων που προέρχονταν από ζώα, φυτά και μεταλλικές πηγές (Forrest RD, 1982). Εκτός από το μέλι πολλές από αυτές τις ουσίες ήταν πολύ τοξικές για να χρησιμοποιηθούν για εσωτερική χρήση (Moellering RC, 1995). Κατά την διάρκεια του 19<sup>ου</sup> αιώνα, η βιομηχανία χημικών εδραίωσε μια ποικιλία αντισηπτικών συμπλόκων που χρησιμοποιούνταν για την πρόληψη και την θεραπεία μολύνσεων που εμφανίζονταν σε πληγές (Hugo WB, 1991) αλλά σχετικά πρόσφατα η κυτοτοξικότητα έχει μειώσει την αποδοχή τους (Brennan et al. 1985).

Μια συστηματική στρατηγική η οποία ξεκίνησε από τον Paul Ehrlich στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, η οποία άνοιξε το δρόμο για την έλευση των αντιβιοτικών, το οποίο οδήγησε σε επανάσταση στο τρόπο της θεραπείας των μολύνσεων. Αυτοί οι αντιμικροβιακοί παράγοντες με τους ειδικούς μηχανισμούς για την αναστολή της ανάπτυξης επέδειξαν επιλεκτική τοξικότητα έναντι μικροβιακών ειδών και όχι εναντίων των κυττάρων των ασθενών και αρχικά απεδείχθησαν αποτελεσματικά στον έλεγχο των μολύνσεων. Παρόλο που δεν είναι γενικά ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά, τα περισσότερα μικροβιακά είδη είναι ευαίσθητα σε τουλάχιστον ένα τύπο αντιβιοτικών. Μέχρι σήμερα 17 τάξεις αντιβιοτικών έχουν ανακαλυφθεί αλλά το ποσοστό της ανακάλυψης των νέων αντιβιοτικών έχει μειωθεί μέσα στα τελευταία εικοσι χρόνια (Cooper et al. 2010). Η θεραπευτική αξία αρκετών αντιβιοτικών έχει περιοριστεί από την εμφάνιση ανθεκτικότητας σε ορισμένα είδη που αρχικά ήταν ευαίσθητα στο αντιβιοτικό αυτό, καθώς και την ύπαρξη ειδών που εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε περισσότερα από ένα αντιβιοτικά. Αυτό είναι πραγματικά ανησυχητικό διότι είδη με ανθεκτικότητα σε κάθε γνωστό αντιβιοτικό έχουν εμφανιστεί (Payne et al. 2007), στελέχη ανθεκτικά σε αντισηπτικά έχουν απομονωθεί και καθοριστικοί παράγοντες για την ανθεκτικότητα οργανισμών τόσο στα αντιβιοτικά όσο και στα αντισηπτικά έχει ανακαλυφθεί (Russell AD 2002). Η ταχύτητα εμφάνισης αντιμικροβιακής

ανθεκτικότητας δεν μπορεί να προβλεφθεί (Davies J 1996), αλλά όταν ένας ανασταλτικός παράγοντας εμφανιστεί, ανθεκτικοί οργανισμοί προκύπτουν εν ευθέτω χρόνο. Με λιγότερους αποτελεσματικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες, επιπτώσεις όπως η αυξημένη νοσηρότητα, το αυξημένο κόστος θεραπείας και η αυξημένη θνησιμότητα έχουν προκύψει (Filius et al. 2002). Νέες αντιμικροβιακές θεραπείες είναι απαραίτητες, αλλά υπάρχει πάντα η πιθανότητα ότι θα υπάρξουν οργανισμοί που θα αναπτύξουν ανθεκτικότητα σε αυτούς τους παράγοντες.

Το μέλι είναι χρήσιμο για την επούλωση των μολυσμένων χειρουργικών πληγών, για εγκαύματα και έλκη κατακλίσεων (Cooper et al. 1999). Οι θεραπευτικές του ιδιότητες οφείλονται στην αντιμικροβιακή του δράση και την ικανότητα του να προσομοιάζει την επούλωση των πληγών (Cooper RA 2007). Το μέλι παρέχει στην πληγή ένα υγρό περιβάλλον που προάγει την επούλωση και το υψηλό ιξώδες του βοηθά επειδή παρέχει ένα προστατευτικό σύνορο για να προληφθεί η μόλυνση. Επιπλέον, η ήπια οξύτητα και τα χαμηλά επίπεδα της απελευθέρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου συνεισφέρουν τόσο στην επούλωση του τραυματισμένου ιστού όσο και στην αντιβακτηριδιακή ενεργότητα.

Το μέλι, που η ιατρική του χρήση χρονολογείται από τα αρχαία χρόνια, έχει προσφάτως επανακαλυφθεί ως θεραπεία για πληγές. Αυτή η προσέγγιση πηγάζει εν μέρει από την εμφάνιση των παθογόνων που είναι ανθεκτικά σε αντιβιοτικά. Αρκετές δημοσιεύσεις πιστοποιούν τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες (Molan PC 1992) αλλά οι μηχανισμοί μέσω των οποίων δρα δεν είναι πλήρως μελετημένοι. Ισχυρά διαλύματα μελιού ή ζάχαρης και ζαχαρόπαστες, μειώνουν την μικροβιακή αύξηση εξαιτίας της υψηλής τους οσμωμοριακότητας, αλλά όταν χρησιμοποιείται ως επίδεσμος για μια πληγή διαλύονται μέχρι το σημείο που η δράση τους αυτή παύει να υφίσταται.

Το μέλι παράγεται από πολλές πηγές, και η αντιμικροβιακή του δραστηριότητα ποικίλλει ανάλογα με την προέλευση και την επεξεργασία. Το μέλι μανούκα, έχει υψηλή αντιβακτηριδιακή δραστηριότητα που σχετίζεται με ένα απροσδιόριστο φυτοχημικό συστατικό. Κάποιες κλινικές αναφορές έχουν προσδιορίσει το συγκεκριμένο είδος του μελιού που χρησιμοποιείται σε μολυσμένες πληγές, καψίματα και κατακλίσεις. Μια μελέτη που έγινε από τους Willix, Molan, Harfoot (Willix et al. 1992) προσδιόρισε τον τύπο του μελιού. Καθόρισαν την ευαισθησία των παθογόνων των πληγών στην μη-υπεροξειδική αντιβακτηριαδική δράση του συνηθισμένου μελιού manuka και στο συνηθισμένο μέλι του οποίου η αντιβακτηριδιακή δράση οφείλεται κυρίως στο υπεροξειδίο του υδρογόνου. Παρόλα αυτά, αυτή η μελέτη περιορίστηκε σε

καλλιέργειες που διατηρούνται σε εργαστήριο οπότε έχει περιορισμένη κλινική σημασία.

## 1. Μέλι

### 1.1. Τι είναι μέλι

Σύμφωνα και με την Κοινοτική Νομοθεσία (Οδηγία 2001/110/ΕΚ του Συμβουλίου), μέλι είναι η φυσική γλυκιά ουσία που παράγουν οι μέλισσες του είδους *Apis mellifera* από το νέκταρ των φυτών ή από εκκρίσεις ζώντων μερών φυτών ή εκκρίματα εντόμων απομυζούντων φυτά ευρισκόμενα πάνω στα ζώντα μέρη των φυτών, τα οποία οι μέλισσες συλλέγουν, μετατρέπουν αναμειγνύοντας με ειδικές ύλες του σώματός τους, αποθέτουν, αφυδατώνουν, εναποθηκεύουν και φυλάσσουν στις κηρήθρες της κυψέλης, προκειμένου να ωριμάσουν. Πρόκειται λοιπόν για ένα προϊόν της φύσης που δεν επιδέχεται καμία επεξεργασία. Αποτελείται από τα παρακάτω συστατικά: νερό, φυσικά σάκχαρα, οργανικά οξέα, πρωτεΐνες, ιχνοστοιχεία, ένζυμα, βιταμίνες, αρωματικές και χρωστικές ουσίες καθώς και άλλες θρεπτικές ουσίες.

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

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

Η κυρίαρχη χημική μετατροπή (μεταβολισμός) του φυτικού χυμού όταν αυτός γίνεται μέλι είναι η αποδόμηση του διζαχαρίτη σουκρόζη (της κοινής

ζάχαρης) στα άμεσα αφομοιώσιμα μονοσάκχαρα της γλυκόζης και φρουκτόζης. Η ανασύνθεση δι- και τριζαχαριτών είναι ποσοτικά πολύ περιορισμένη. Οι αρωματικές (διάφορα τερπένια) και οι χρωστικές ουσίες του φυτικού χυμού δεν μεταβολίζονται. Το μέλι απλά εμπλουτίζεται και με το άρωμα των οργανικών οξέων από τη διάσπαση της γλυκόζης. Επίσης το μέλι εμπλουτίζεται με ένζυμα από τους αδένες της εργάτριας μέλισσας, τα οποία μεταβολίζουν τα σάκχαρα. Τέλος, τα διάφορα μεταλλικά στοιχεία του μελιού είναι ακριβώς τα ίδια με αυτά τα οποία περιέχονται και στον πρωτογενή φυτικό χυμό (Zanber & Maurizio 1984, White 1993).

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

## **1.2. Σύσταση του μελιού**

Το μέλι αποτελείται από 70-80% από σάκχαρα, κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη και έχει μεγάλη θρεπτική αξία, αφού απορροφάται άμεσα από τον ανθρώπινο οργανισμό (1 κουταλιά της σούπας μέλι αποδίδει στον οργανισμό 64Kcal). Έχουν αναγνωρισθεί πάνω από 180 διαφορετικές ουσίες στο μέλι που το καθιστούν πολύτιμη τροφή. Περιέχει νερό σε ποσοστό 16%, οργανικά οξέα (δεκαοκτώ τον αριθμό), πρωτεΐνες και αμινοξέα, μεταλλικά στοιχεία σε μικρές ποσότητες (κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο, σίδηρο κ.ά.), ένζυμα, συμπλέγματα πρωτεϊνών, βιταμίνες (B2, B6, C, D, E, παντοθενικό οξύ, φολικό οξύ κ.ά), φυσικές αρωματικές ουσίες κ.ά. 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 δεν είναι τα επιμέρους θρεπτικά συστατικά του μελιού όσο η συνύπαρξη όλων αυτών και ο τρόπος με τον οποίο δρουν στον ανθρώπινο οργανισμό.

## **1.3. Ιδιότητες**

Στην κατανάλωση μελιού αποδίδεται η μακροβιότητα διάσημων μελισσοκόμων, που κυμαίνεται μεταξύ 80 και 90 ετών. Τα μέλια με σκούρο

χρώμα έχουν τις περισσότερες τονωτικές ιδιότητες όπως λ.χ. το πευκόμελο, που είναι πλούσιο σε μεταλλικά ιχνοστοιχεία.

Το μέλι σαν τροφή του ανθρώπου είναι ένα από τα πολυτιμότερα, θρεπτικότερα και υγιεινότερα τρόφιμα. Δίνει ενέργεια στους μυς, διαύγεια στο μυαλό, απολυμαίνει και ρυθμίζει το πεπτικό σύστημα. Η τακτική χρήση του δίνει σφρίγος στον οργανισμό και συντελεί στην παράταση της ζωής. Ο Ιπποκράτης και όλοι οι γιατροί της αρχαιότητας το συνιστούσαν σαν φάρμακο σε πολλές περιπτώσεις. Και σήμερα αναγνωρίζεται η θεραπευτική του αξία στην καθ' ἑξιν δυσκοιλιότητα, στις καρδιοπάθειες, αναιμία, αδενοπάθεια και στις περιπτώσεις κατάπτωσης και αδυναμίας του οργανισμού.

Η άποψη αυτή είναι διαδεδομένη σε ολόκληρο τον κόσμο και το σπουδαιότερο είναι τεκμηριωμένη και από επιστήμονες. Έτσι σε μια προσπάθεια να προσδιοριστεί η δράση του μελιού ως τροφή και φάρμακο σε διάφορες κλινικές περιπτώσεις ο Duisberg (1967) διέκρινε τις παρακάτω περιπτώσεις.

- Το μέλι δρα κατά της κοπώσεως και αυτό πετυχαίνεται με αποθήκευση της φρουκτόζης που περιέχει στο συκώτι ως γλυκογόνο. Εκεί μετατρέπεται σε γλυκόζη, αυξάνοντας έτσι την περιεκτικότητα της στο αίμα. Ευκολύνει την αφομοίωση του ασβεστίου, δραστηριοποιεί την οστεοποίηση.
- Γιατρεύει ή ανακουφίζει τις εσωτερικές διαταραχές, τα έλκη του στομάχου, την αϋπνία, τους πονόλαιμους, μερικές καρδιακές παθήσεις και γενικά έχει ευεργετική επίδραση και στην καρδιά, αυξάνει τις αιμογλοβίνες του αίματος και τη μυϊκή δύναμη, κ.α
- Σε εξωτερική χρήση θεραπεύει τα εγκαύματα, τις πληγές και τις ρινοφαρυγγικές παθήσεις χάρη στην ινχιδίνη (inhidine) που του προσδίδει βακτηριοστατικές ιδιότητες. Το μέλι, λοιπόν, είναι το βασικό προϊόν στην μελισσοκομία αλλά και ένας πολύτιμος σύμμαχος του ανθρώπινου οργανισμού.

#### 1.4. Ευεργετικές ιδιότητες

**Καρδιά- Κυκλοφορικό:** η παρατεταμένη κατανάλωση μελιού από άτομα που πάσχουν από καρδιακές διαταραχές έχει σαν αποτέλεσμα την βελτίωση της κατάστασής τους. Τα σάκχαρα του μελιού, ιδίως η γλυκόζη, είναι απαραίτητα για τις συστολές του καρδιακού μυ και αποτελούν πηγή ενέργειας για την

καρδιά. Ακόμη το μέλι με τη βοήθεια των σακχάρων του και τις ακετυλοχολίνης διαστέλλει τα αγγεία και μειώνει την υπέρταση.

**Αναιμία:** το ποσοστό της αιμοσφαιρίνης, ιδίως σε παιδιά, αυξάνει με την κατανάλωση μελιού κυρίως λόγω του σιδήρου και του χαλκού που περιέχει.

**Στομαχοεντερικές παθήσεις:** το μέλι είναι βασικά αλκαλική τροφή λόγω των μεταλλικών αλάτων που περιέχει. Η αλκαλικότητα αυτή μειώνει την οξύτητα του στομάχου. Το μέλι αποδεικνύεται πολύτιμο μέσο προστασίας κατά των ελκών του στομάχου και δώδεκα- δακτύλου. Τέλος, θεωρείται ένα από τα καλύτερα φυσικά ελαφρά καθαρτικά λόγω της υψηλής ποσότητας χολίνης που περιέχει, καταπολεμώντας έτσι την δυσκοιλιότητα.

**Ήπαρ:** η γλυκόζη του μελιού συμπληρώνει τις εφεδρείες του γλυκογόνου του ήπατος. Το ήπαρ είναι το εργοστάσιο του οργανισμού μας όπου συντίθενται χρήσιμες για τον οργανισμό ουσίες και αποικοδομούνται άλλες που είναι επικίνδυνες όπως οι τοξίνες. Η παρουσία γλυκογόνου ενισχύει αυτή την εργασία και αυξάνει την αντίσταση του οργανισμού στις μολύνσεις.

**Νεφρά:** το μέλι περιέχει πολύ λίγη πρωτεΐνη και σχεδόν καθόλου αλάτι, ουσίες που δεν επιτρέπονται σε άτομα που έχουν παθήσεις νεφρών. Εκτός αυτού, το μέλι, σαν υπερτονικό διάλυμα γλυκόζης, δυναμώνει και ενισχύει τον οργανισμό και είναι διουρητικό.

Βοηθάει επίσης σημαντικά στον ταχύτερο μεταβολισμό του οινοπνεύματος, με αποτέλεσμα να απαλλάσσεται κανείς γρηγορότερα από την κατάσταση μέθης, ιδίως αν συνδυαστεί με χυμό λεμονιού.

### 1.5. Το μέλι ως αντιμικροβιακός παράγοντας

Η αντιβακτηριακή δράση του μελιού, όπως αναφέρθηκε, είναι γνωστή εδώ και πολλά χρόνια. Η δράση του αυτή οφείλεται σε ένα εύρος παραγόντων, όπως τη περιεκτικότητα σε ουσίες με αντιμικροβιακή δράση, την υψηλή συγκέντρωση των σακχάρων του, αλλά και το χαμηλό του pH. Αρκετά είναι τα είδη μικροοργανισμών των οποίων το μέλι εμποδίζει την ανάπτυξη, όπως είδη λυστέριας, στρεπτόκοκκου, σταφυλόκοκκου, ψευδομονάδας, και άλλων μικροβίων (Lusby et al 2005). Σημαντική συνεισφορά στην αντιμικροβιακή δράση του μελιού έχει και η παρουσία οργανικών οξέων με βασικό το γλυκονικό οξύ, τα φλαβονοειδή και τα υπόλοιπα φαινολικά συστατικά αλλά και ουσίες τερπενικής φύσεως (Wahdan 1998). Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού οφείλεται κυρίως στην ενζυμική παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου μέσω του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης. Το υπεροξείδιο του



υδρογόνου παράγεται συνεχώς σε μικρές ποσότητες στο μέλι και δεν χρειάζονται υψηλές συγκεντρώσεις για την αντιμικροβιακή του δράση. Επειδή υπάρχει συνεχής παραγωγή σε μικρές ποσότητες, δεν δημιουργείται ανθεκτικότητα των μικροβίων στη δράση του και ταυτόχρονα δεν προκαλούνται βλάβες στο δέρμα που θα δημιουργούνταν εάν υπήρχε ψηλή συκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου που τοποθετείται στο δέρμα. Υπάρχουν διάφορες ποικιλίες μελιού που έχουν ψηλότερες συγκεντρώσεις υπεροξειδίου. Το μέλι που προέρχεται κυρίως από δέντρα του τύπου *Leptospermum* που υπάρχουν στη Νέα Ζηλανδία και στην Αυστραλία, έχει ιδιαίτερα ισχυρή αντιβακτηριδιακή δράση λόγω των συγκεντρώσεων υπεροξειδίου που παράγονται σε αυτό. Επίσης λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων φαινολών που υπάρχουν στο συγκεκριμένο μέλι, πιθανόν να είναι δυσκολότερο για τα βακτηρίδια να αναπτυχθούν (Cooper et al 1999).

Το μέλι δεν είναι βιομηχανικό προϊόν και ως εκ τούτου η χημική σύστασή του διαφέρει ανάλογα με την πηγή από την οποία προέρχεται. Επιπλέον, επηρεάζεται από τις συνθήκες συλλογής του, την κατάσταση του μελισσιού και άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες.

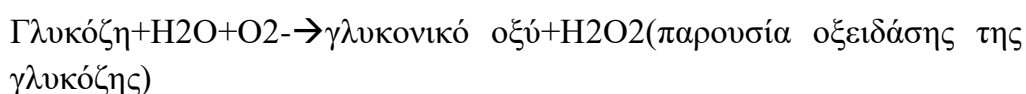
Τα παραπάνω σημαίνουν ότι δεν είναι όλα τα μέλια ίδια σε ό,τι αφορά την αντιμικροβιακή τους δράση. Αυτά που έχουν χαμηλές συγκεντρώσεις σε φαινολικά συστατικά καθυστερούν περισσότερο την ανάπτυξη των μικροβίων, ενώ όσο αυξάνεται η συκέντρωση των συστατικών αυτών τα μικρόβια θανατώνονται.

Πρέπει να επισημανθεί επίσης ότι, λόγω της χαμηλής του περιεκτικότητας σε νερό, το μέλι αναστέλλει την ανάπτυξη βακτηρίων και μυκήτων. Όταν τοποθετείται σε πληγές βοηθά τον μολυσμένο ιστό να αφυδατωθεί αποτρέποντας την ανάπτυξη μολυσματικών παραγόντων (Gomez-Caravaca et al 2006).

### **1.5.1. Ουσίες και παράγοντες που προκαλούν την αντιμικροβιακή δράση**

#### **1.5.1.1. Υπεροξείδιο του υδρογόνου.**

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου για πολλά χρόνια θεωρείτο ως ο κύριος ανασταλτικός παράγοντας του μελιού στην ανάπτυξη των βακτηρίων. Παράγεται κατά την οξείδωση της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ, από την οξειδάση της γλυκόζης



Η δράση αυτού του ενζύμου είναι πιο αποτελεσματική όταν το μέλι αραιώνεται. Σε αδιάλυτο μέλι το παραγόμενο γλυκονικό οξύ μειώνει πολύ το pH, το οποίο τελικά αναστέλλει την ενζυμική δράση και κατ'επέκταση την παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Επιπλέον η ενζυμική δράση μειώνεται όταν το μέλι θερμαίνεται πάνω από τους 50°C. Ωστόσο η παρουσία στο μέλι του ενζύμου καταλάση που διασπά με πολύ μεγάλη ταχύτητα το υπεροξειδίο του υδρογόνου, θέτει σε αμφισβήτηση τη παραπάνω παραδοχή (Molan PC, 1992) (Mandal et al 2011).

#### **1.5.1.2. Χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό (υψηλή συγκέντρωση σακχάρων).**

Ένας δεύτερος παράγοντας που παίζει ρόλο στην αντιμικροβιακή δράση του μελιού είναι η μεγάλη συγκέντρωση των σακχάρων του. Υπάρχουν πολλά σάκχαρα στο μέλι, για την ακρίβεια είναι ένα υπέρκορο υδατικό διάλυμα σακχάρων, που σημαίνει ότι περιέχει σάκχαρα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από εκείνες οι οποίες μπορούν κανονικά να ανευρίσκονται μέσα στην υγρή φάση του. Η χαμηλή περιεκτικότητα του μελιού σε νερό αναστέλλει την ανάπτυξη μιας μεγάλης πληθώρας βακτηρίων και μυκήτων. Όταν εφαρμόζεται τοπικά πάνω σε πληγές, το μέλι απορροφάει το νερό από το τραύμα, λόγω οσμωτικών φαινομένων, βοηθώντας έτσι το μολυσμένο ιστό να αφυδατωθεί αποτρέποντας τη βακτηριακή ανάπτυξη. Ακόμη και αραιωμένο, η εφαρμογή του στις πληγές, δεν επιτρέπει την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηρίων και μυκήτων, παρά τη μεγαλύτερη περιεκτικότητά του σε νερό (Molan PC, 1992).

#### **1.5.1.3. Χαμηλό pH**

Το μέλι είναι ελαφρώς όξινο με pH που κυμαίνεται μεταξύ 3,2 και 4,5 και οφείλεται στην ύπαρξη οργανικών οξέων. Το γλυκονικό οξύ σχηματίζεται όταν οι μέλισσες εκκρίνουν την οξειδάση της γλυκόζης, το ένζυμο το οποίο καταλύει την οξείδωση της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ. Οι χαμηλές τιμές pH αποτελούν ανασταλτικό παράγοντα ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών. Όταν το μέλι εφαρμόζεται τοπικά σε πληγές, το χαμηλό του pH και μόνο, μπορεί να αποτρέψει τη βακτηριακή ανάπτυξη (Molan PC, 1992) (Mandal M et al 2011).

#### **1.5.1.4. Μεθυλογλυοξάλη**

Διάφορα μέλια έχουν σημαντική μη-υπεροξειδιακή αντιβακτηριακή δραστηριότητα. Συγκεκριμένα το μέλι Manuka έχει υποβληθεί σε αναγνώριση μη-υπεροξειδιακών αντιμικροβιακών συστατικών. Το μέλι παράγεται από το νέκταρ του δέντρου manuka (*Leptospermum scoparium*), που είναι γηγενής στη Νέα Ζηλανδία και είναι γνωστή για την μη-υπεροξειδιακή αντιβακτηριακή

δράση του. Πρόσφατα εξαιρετικά υψηλά επίπεδα της αντιμικροβιακής ένωσης μεθυλογλυοξάλη (MGO) έχουν βρεθεί στο μέλι Manuka. Σε γενικές γραμμές MGO σχηματίζεται από σάκχαρα κατά τη διάρκεια θερμικής επεξεργασίας ή παρατεταμένης αποθήκευσης των τροφίμων ή ποτών που περιέχουν υδατάνθρακες. Ωστόσο τα υψηλά επίπεδα της MGO στο μέλι Manuka σχηματίζονται με μετατροπή της διϋδροξυακετόνης (DHA) που υπάρχει σε εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις στο νέκταρ των λουλουδιών του είδους *L.scoparium*. Αυτή η μετατροπή λαμβάνει χώρα μη ενζυματικά με βραδύ ρυθμό κατά την διάρκεια αποθήκευσης του μελιού. Είναι άγνωστο πως η DHA διαμορφώνεται στο νέκταρ και γιατί είναι παρούσα σε τέτοιες μεγάλες ποσότητες στο νέκταρ των δέντρων Manuka. Βασισμένη σε μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων MGO και του δυναμικού του μελιού να αναστέλλουν την ανάπτυξη του *S.aureus*, έχει προταθεί ότι η MGO είναι πλήρως υπεύθυνη για την μη-υπεροξειδιακή αντιμικροβιακή δραστηριότητα του μελιού Manuka (Kwakman et al 2012) .

#### 1.5.1.5. Αμυντοσίνη-1

Πρόσφατα εντοπίστηκε το αντιμικροβιακό πεπτίδιο αμυντοσίνη-1 στις μέλισσες. Το πεπτίδιο (επίσης γνωστό και ως royalisin) είχε προηγουμένως αναγνωριστεί στις μέλισσες του είδους hemolymph, το αντίστοιχο έντομο του αίματος, στο κεφάλι μελισσών και των θωρακικών αδένων και στο βασιλικό πολτό που είναι η κύρια τροφή των προνυμφών της βασίλισσας, χωρίς όμως να έχουν ανιχνευθεί στο μέλι. Η αμυντοσίνη-1 έχει ισχυρή δραστηριότητα αλλά μόνο έναντι των Gram(+) βακτηριδίων, συμπεριλαμβανομένων του *B.subtilis*, *S.aureus* και προνυμφών *Paenibacillus*. Το τελευταίο είδος είναι ο αιτιολογικός παράγοντας για την καταστροφική για τις προνύμφες των μελισσών νόσο της Αμερικανικής σηψιγονίας. Η Αμερικάνικη σηψιγονία είναι μια καταστροφική ασθένεια που πλήττει ειδικά τις προνύμφες των μελισσών. Λοίμωξη με *P. pronύμφες* λαμβάνει χώρα μέσω του πεπτικού σωλήνα και καταλήγει σε σοβαρή θνησιμότητα μεταξύ των νυμφών κατά την διάρκεια του πρώτου 48 ώρου μετά την εκκόλαψη των αυγών. Η παρουσία της αμυντοσίνης-1 στο βασιλικό πολτό που όπως αναφέρθηκε αποτελεί σημαντική τροφή για τις προνύμφες των βασιλισσών συμβάλλει στη προστασία αυτών ενάντια στην νόσο της Αμερικάνικης σηψιγονίας. Η αμυντοσίνη-1 εκκρίνεται από τον υποφαρυγγικό αδένα των μελισσών οι οποίες χρησιμοποιούν τις εκκρίσεις του υποφαρυγγικού αδένα για την παραγωγή του βασιλικού πολτού και μελιού. Η ποσότητα της αμυντοσίνης-1 σε βασιλικό πολτό (αυτό αναφέρεται ως "royalisin") και μελιού ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό , με μερικά δείγματα εντελώς να στερούνται αυτού του πεπτιδίου. Αυτό συνεπάγεται ότι η έκφραση της αμυντοσίνη-1 στους υποφαρυγγικούς αδένες ή / και η ποσότητα των

εκκρίσεων του αδένου που προστίθενται ποικίλουν έντονα. Εφόσον η αμυνοσίτη-1 είναι δραστική έναντι των νυμφών *Raenibacillus*, η αιτία της Αμερικανικής σηψιγονίας θα ήταν δυνατόν να διερευνηθεί αν η διακύμανση των επιπέδων έκφρασης της αμυνοσίτης-1 σχετίζεται με την ευαισθησία των μελισσών σε αυτή την ασθένεια (Kwakman et al 2012).

#### 1.5.1.6. Άλλες αντιμικροβιακές ουσίες του μελιού

Οι φαινολικές ενώσεις που προέρχονται από το νέκταρ των φυτών έχουν προταθεί ως σημαντικοί παράγοντες για την μη-υπεροξειδιακή αντιμικροβιακή δράση του μελιού. Αρκετές αντιβακτηριακές φαινολικές ενώσεις έχουν ταυτοποιηθεί στο μέλι, αλλά η συμβολή τους στη συνολική δραστηριότητα του μελιού παραμένει ασαφής. Η δραστηριότητα των μεμονωμένων φαινολικών ενώσεων που έχουν απομονωθεί από το μέλι είναι πολύ χαμηλή για να συμβάλει ουσιαστικά στην αντιμικροβιακή δράση. Ίσως ο συνδυασμός των διαφόρων φαινολικών αντί των μεμονωμένων ενώσεων θα μπορούσε να συμβάλει ουσιαστικά στην δραστηριότητα του μελιού (Kwakman et al 2012). Σύγχρονα πειραματικά δεδομένα αποδίδουν την αντιμικροβιακή δράση του μελιού κυρίως σε άλλους παράγοντες, όπως π.χ. στους βιοδραστικούς δευτερογενείς μεταβολίτες. Πολλά από τα συστατικά αυτά δεν έχουν ακόμα προσδιορισθεί. Μερικές, όμως, από τις ουσίες που έχουν προσδιορισθεί και στις οποίες οφείλεται η αντιμικροβιακή δράση του μελιού είναι το συριγγικό οξύ (3,5 διμεθόξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ), το 3,4,5 τριμεθοξυβενζοϊκό οξύ, το 2-υδροξυ-3-φαινυλοπροπιονικό οξύ και η πινοσεμπρίνη. Τέλος οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στο μέλι έχουν προταθεί ως μια πιθανή πηγή των αντιμικροβιακών ενώσεων (Molan PC, 1992). Τα βακτήρια που απομονώθηκαν από το μέλι μπορούν να παράγουν πράγματι αντιμικροβιακές ενώσεις, όταν καλλιεργούνται *in vitro*, αλλά παραμένει ασαφές εάν τέτοιες ενώσεις στην πραγματικότητα υπάρχουν στο μέλι (Kwakman et al 2012).

### 1.6. Το μέλι *Mānuka*

Το μέλι *mānuka* παράγεται από ένα μόνο τύπο φυτού στην Νέα Ζηλανδία και Αυστραλία από το νέκταρ του δένδρου *mānuka*. Το μέλι αυτό έχει εμφανίσει αντιβακτηριδιακή δράση *in vitro*, αλλά δεν υπάρχουν πειστικές ενδείξεις οφέλους σε ιατρική χρήση. Κατατάσσεται στα θεραπευτικά προϊόντων στην Αυστραλία. Το μέλι γενικά έλαβε έγκριση στην διαχείριση

τραύματος από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων το 2007.

### 1.6.1. Ταυτοποίηση

Το μέλι manuka παράγεται από εισαγόμενες ευρωπαϊκές μέλισσες (*Apis mellifera*) που τρέφονται από το δένδρο Manuka (*Leptospermum scoparium* και / ή *Leptospermum polygalifolium*), η οποία αναπτύσσονται ακαλλιέργητα σε όλη τη Νέα Ζηλανδία και την νοτιοανατολική Αυστραλία. Το μέλι manuka είναι σημαντικά θιξοτροπικό και έδειξε το υψηλότερο ιξώδες ανάμεσα σε μια σειρά από μελετηθέντα μέλια. Αυτή η ιδιότητα οφείλεται στην παρουσία μιας πρωτεΐνης ή κολλοειδούς και είναι ο κύριος χαρακτήρας οπτικά για τον καθορισμό της, μαζί με το χαρακτηριστικό σκούρο κρέμ του έως σκούρο καφέ χρώμα. Για να επισημανθεί ως μέλι Manuka, τουλάχιστον το 70% της γύρης θα πρέπει να προέρχεται από *Leptospermum scoparium*. Τα λουλούδια του δέντρου Manuka ανθίζουν την ίδια περίπου στιγμή με το *Kunzea ericoides*, ένα άλλο είδος *Myrtaceae* που ονομάζεται επίσης Kānuka, τα οποία συχνά μοιράζονται τις ίδιες περιοχές για να αναπτυχθούν με τα Kānuka. Μερικοί μελισσοκόμοι δεν μπορούν εύκολα να διακρίνουν αυτά τα δύο είδη το ένα από το άλλο. Αμφότερα τα λουλούδια έχουν παρόμοια μορφολογία και η διαφοροποίηση της γύρης μεταξύ των δύο ειδών είναι πολύ δύσκολη. Ως εκ τούτου, η μελισσοπαλιнологία ως αναγνώριση για το είδος του μελιού είναι έγκυρη μόνο σε συνδυασμό με άλλες εξετάσεις ταυτοποίησης. Ειδικότερα, το μέλι από το *L. scoparium* είναι σκουρόχρωμο, ενώ το μέλι από το *K. ericoides* είναι ανοιχτό κίτρινο και διάφανο, με ένα «ντελικάτο, γλυκό, ελαφρώς αρωματικό» άρωμα και μια «γλυκιά, ελαφρώς αρωματική» γεύση, και δεν είναι θιξοτροπικό. Το μέλι του ρεικιού (*Calluna vulgaris*) είναι επίσης θιξοτροπικό, αλλά τα άνθη των φυτών στο τέλος του καλοκαιριού και η ορεινή περιοχή αναπτυξής του δεν αντιστοιχεί με εκείνη του *Leptospermum scoparium*. Ως εκ τούτου, η συγκομιδή του δεν μπορεί να συγχέεται με αυτήν του μελιού Manuka.



**Εικόνα 1: Φωτογραφία του μελιού manuka. Παρατηρείται το σκούρο καφέ χαρακτηριστικό του χρώμα.**



**Εικόνα 2: Φωτογραφία των λουλουδιών του δένδρου manuka.**

### **1.6.2. Το μέλι manuka ως τροφή**

Το μέλι manuka έχει έντονη γεύση, η οποία έχει χαρακτηριστεί ως «γιήνη, ελαιώδης και βοτανώδης» και «ανθώδης, πλούσια και πολυδιάστατη». Έχει περιγραφεί από την εταιρία μελιού της Νέας Ζηλανδίας με τον χαρακτηρισμό: για το άρωμα «υγρού χόματος, ρεικιού και αρωματικό» και για την γεύση «μεταλλική, ελαφρώς πικρή».

### **1.6.3. Φαρμακευτικές ιδιότητες**

Μια ανασκόπηση του 2002 διαπίστωσε ότι αν και η αντιβακτηριακή δράση του μελιού (συμπεριλαμβανομένου του μελιού Manuka) είχε αποδειχθεί in vitro, ο αριθμός της χρήσης τους σε κλινικών περιστατικών ήταν μικρός. Η

ανασκόπηση κατέληξε στο συμπέρασμα ότι υπήρχε μια δυνατότητα για τη χρήση του στην "διαχείριση ενός μεγάλου αριθμού των τύπων των πληγών». Μια αναθεώρηση του 2008 από τον Cochrane διαπίστωσε ότι το μέλι μπορεί να βοηθήσει στη βελτίωση των επιφανειακών εγκαυμάτων σε σύγκριση με την κλασική επίδεσή τους, αλλά δεν υπήρχαν επαρκή στοιχεία από μελέτες, πολλές από τις οποίες ήταν για το μέλι Manuka, για να είναι πειστική. Στην ίδια αναθεώρηση διαπιστώθηκε ότι η χρήση του μελιού για έλκη ποδιών δεν παρέχει κανένα όφελος. Η αναθεώρηση διαπίστωσε ότι δεν υπήρχαν επαρκείς αποδείξεις για οποιοδήποτε όφελος σε άλλους τύπους χρόνιων τραυμάτων, καθώς όλα τα δεδομένα προέρχονται από ένα ενιαίο κέντρο έρευνας, και από το ότι "δεδομένα από δοκιμές υψηλότερης ποιότητας βρήκαν ότι το μέλι δεν είχε σημαντική επίδραση στο ρυθμό επούλωσης ή είχαν σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά ίασης». Η μεθυλογλυοξάλη (methylglyoxal) είναι το κύριο αντιβακτηριακό συστατικό στο μέλι Manuka. Άλλες μικρότερες αντιβακτηριακές δράσεις αναμένεται να προκύψουν από την ωσμωτικότητα και το pH του μελιού Manuka. In vitro μελέτες δείχνουν ότι η μεθυλογλυοξάλη είναι ένας αποτελεσματικός αντιμικροβιακός παράγοντας εναντίον μορφών ανθεκτικών στη μεθικιλίνη χρυσίζοντος σταφυλόκοκκου (*MRSA-Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), αν και οι μελέτες δεν έχουν γίνει σε ανθρώπους. Το μέλι Manuka, μαζί με άλλα αντιβακτηριακά προϊόντα, δεν μειώνουν τον κίνδυνο λοίμωξης μετά τη θεραπεία για την ανώμαλη ανάπτυξη των νυχιών.

Το μέλι manuka έχει επίσης διαφημιστεί για χρήση σε πληθώρα περιπτώσεων. Αυτές περιλαμβάνουν:

- Πρόληψη και θεραπεία καρκίνου
- Μείωση υψηλής χοληστερόλης
- Μείωση συστηματικής φλεγμονής
- Θεραπεία σακχαρώδους διαβήτη
- Θεραπεία μολύνσεων του ματιού, αυτιού και κόλπου
- Θεραπεία γαστροεντερικών προβλημάτων

Αλλά οι αποδείξεις είναι περιορισμένες αν το μέλι manuka είναι αποτελεσματικό σε αυτές τις περιπτώσεις ή όχι. Εδώ πρέπει να τονιστεί ότι το μέλι που χρησιμοποιείται για την θεραπεία πληγών είναι ιατρικής ποιότητας μέλι. Είναι αποστειρωμένο ειδικά για αυτήν την περίπτωση και παρασκευασμένο ως επίδεσμος. Έτσι ένα βάζο μέλι manuka στο ντουλάπι, δεν θα πρέπει να θεωρείται ως μέρος ενός κιτ πρώτων βοηθειών. Οι πληγές και οι μολύνσεις θα πρέπει να εξετάζονται και να θεραπεύονται από εξειδικευμένο ιατρικό προσωπικό.

#### 1.6.4. Συστατικά του μελιού Manuka

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι ένα συστατικό του μελιού. Δίνει στο μέλι την περισσότερη αντιβιοτική ποιότητά του. Ωστόσο, ορισμένα είδη του μελιού, συμπεριλαμβανομένου του μελιού Manuka, έχουν επίσης άλλα συστατικά με αντιβακτηριακές ιδιότητες. Ένα σημαντικό αντιβακτηριακό συστατικό στο μέλι Manuka είναι μεθυλογλυοξάλη (MG). Η MG είναι μια ένωση που βρίσκεται στα περισσότερα είδη μελιού, αλλά συνήθως μόνο σε μικρές ποσότητες. Στο μέλι Manuka, η MG προέρχεται από την μετατροπή μιας άλλης ένωσης, της διυδροξυακετόνης, που βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση στο νέκταρ των λουλουδιών του δένδρου manuka. Η MG δίδει στο μέλι Manuka αντιβακτηριακή δύναμη. Όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του MG, τόσο ισχυρότερη είναι η αντιβιοτική επίδραση. Οι παραγωγοί μελιού έχουν αναπτύξει μια κλίμακα για την βαθμολογία της δραστηριότητας της manuka μέλι. Η βαθμολογία καλείται UMF, η οποία αντιπροσωπεύει το μοναδικό παράγοντα Manuka (unique manuka factor). Η βαθμολογία UMF αντιστοιχεί με τη συγκέντρωση της MG. Όλα τα μέλια χαρακτηριζόμενα ως μέλι Manuka δεν περιέχουν σημαντικά επίπεδα της MG. Για να θεωρηθεί αρκετά ισχυρό για να είναι θεραπευτικό, το μέλι Manuka χρειάζεται μια ελάχιστη βαθμολογία 10 UMF. Μέλια σε ή πάνω από αυτό το επίπεδο πωλούνται ως "UMF Manuka Honey" ή "Active Manuka Honey"

#### 1.7. Είδη μελιών

Υπάρχουν 2 κατηγορίες μελιού. Το *ανθόμελο*, που παράγεται από το νέκταρ των λουλουδιών, και το *μέλι των μελιτωμάτων* που παράγεται από το χυμό του πεύκου, της ελάτης και άλλων δασικών φυτών.

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

Το ακμαίο θηλυκό του εργάτη γεννά 200-300 περίπου αυγά σε διάστημα 3-4 ημερών, τον Απρίλιο (Νικολόπουλος 1965). Από τα αυγά αυτά εκκολάπτονται μετά από 15-20 ημέρες οι προνύμφες πρώτου σταδίου, οι οποίες ψάχνουν αμέσως και βρίσκουν θέσεις προσήλωσης στο φλοιό του πεύκου. Στις θέσεις



αυτές το έντομο εκκρίνει μια βαμβακώδη, κηρώδη ουσία, με την οποία καλύπτεται, έτσι ώστε να προστατευτεί από τους φυσικούς του εχθρούς και τις δυσμενείς συνθήκες του περιβάλλοντος.

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

Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή μελιτωμάτων: Η παραγωγή μελιτωμάτων γνωστή ως «βάρεμα του εργάτη» επηρεάζεται από το μέγεθος (ηλικία) του εντόμου, τη ζωτικότητα του δέντρου, τις κλιματολογικές συνθήκες και το είδος του πεύκου στο οποίο παρασιτεί το έντομο (Καϊλίδης, 1965).

Όσο ο εργάτης είναι μικρότερος σε μέγεθος τόσο μικρότερη ποσότητα τροφών λαμβάνει και τόσο λιγότερα μελιτώματα παράγει. Στην περίοδο των αλλαγών του δέρματος (εκδύσεων) καθώς επίσης και όταν ενηλικιωθεί, το έντομο δεν τρέφεται και δεν παράγει μελίτωμα.

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

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

### 1.7.1. Κατηγορίες μελιών

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

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

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

- **Μέλι από πεύκο:**



Το πευκόμελο είναι η σημαντικότερη κατηγορία ελληνικού μελιού καθώς αντιπροσωπεύει το 65% της συνολικής παραγωγής μελιού στη χώρα μας. Προέρχεται από τις μελιτώδεις εκκρίσεις ενός εντόμου που παρασιτεί στο πεύκο, γνωστό ως «βαμβακάδα» ή «εργάτης» (*Marchalina hellenica*). Οι κυριότερες περιοχές που παράγεται το πευκόμελο είναι η Θάσος, η Χαλκιδική, η Εύβοια, η Ζάκυνθος, η Κρήτη και οι Σποράδες.

Το πευκόμελο, όπως και όλα τα μέλια που προέρχονται από μελίτωμα, έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα. Γι' αυτό το λόγο η ταχύτητα κρυστάλλωσης του είναι μικρή. Συνήθως αμιγή πευκόμελα, χωρίς αναμίξεις διατηρούνται ρευστά για περισσότερο από ένα χρόνο. Η ιδιαίτερη θρεπτική αξία του οφείλεται στο μεγάλο αριθμό θρεπτικών στοιχείων και κυρίως των ιχνοστοιχείων που περιέχει. Το χρώμα του ποικίλει από ανοιχτό, όταν παράγεται την άνοιξη έως πιο σκούρο όταν παράγεται το φθινόπωρο.

- **Μέλι Ελάτης:**



Αποτελεί το 5-10% της συνολικής παραγωγής μελιού στην Ελλάδα. Ανήκει και αυτό στην κατηγορία των μελιών μελιτώματος και προέρχεται από τις εκκρίσεις κοκκοειδών και αφίδων που παρασιτούν στα έλατα. Είναι μία από τις καλύτερες και τις ακριβότερες κατηγορίες μελιού.

Έχει χαρακτηριστική γεύση και εμφάνιση, είναι ιδιαίτερα πυκνόρρευστο και λόγω του χαμηλού ποσοστού σε σάκχαρα δεν κρυσταλλώνει. Έχει ουδέτερο άρωμα και ιδιαίτερα καλή γεύση, για όσους θέλουν ένα μέλι που να μην είναι πολύ γλυκό.

Παράγεται σε ορεινές περιοχές και κυρίως στον Όλυμπο, την Πίνδο, το Μάιναλο, το Χελμό και την Πάρνηθα. Χαρακτηριστική είναι περίπτωση του μελιού Ελάτης που προέρχεται από την περιοχή της Βυτίνας, το οποίο λόγω της ιδιαίτερης εμφάνισης του και των χρυσών-μεταλλικών ανταυγείων στο χρώμα του φέρει το όνομα «έλατο βανίλια», που από το 1994 αποτελεί Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης.

- **Μέλι Καστανιάς:**



Είναι μια ιδιαίτερη περίπτωση κατηγορίας μελιού, γιατί αν και θεωρείται ανθόμελο, έχει χαρακτηριστικά μελιού μελιτώματος καθώς προέρχεται τόσο από το νέκταρ της καστανιάς όσο και από τις μελιτώδεις εκκρίσεις ενός είδους αφίδας που παρασιτεί στα φύλλα της καστανιάς. Έχει ιδιαίτερα σκούρο καφέ έως μαύρο χρώμα, χαρακτηριστικό άρωμα και έντονη έως πικρή γεύση. Παρόλα αυτά έχει υψηλή διατροφική αξία, καθώς είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία. Όταν προέρχεται από τις εκκρίσεις του φυτού διατηρείται ρευστό για περισσότερο από 1 χρόνο και είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία. Παράγεται κυρίως στη Μακεδονία και στο Άγιο Όρος.

- **Μέλι από θυμάρι:**



Μία από τις κυριότερες κατηγορίες ελληνικού μελιού, που αποτελεί το 10% της ετήσιας παραγωγής. Παράγεται κυρίως στα ελληνικά νησιά όπου το θυμάρι απαντάται σε αφθονία. Έχει ιδιαίτερο κεχριμπαρένιο χρώμα, χαρακτηριστική γεύση και κρυσταλλώνει σε 6 έως 18 μήνες, ανάλογα με το ποσοστό των σακχάρων. Φημίζεται για τις τονωτικές και αντισηπτικές του ιδιότητες.

- **Μέλι από ερείκη:**



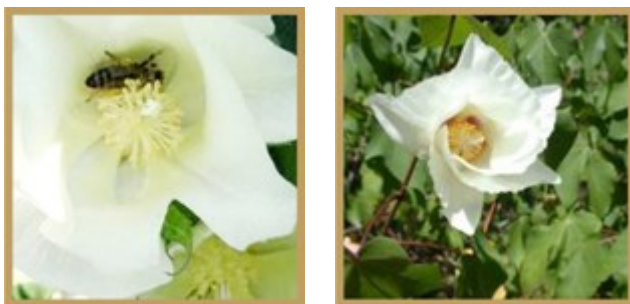
Παράγεται από διάφορα είδη ερείκης, γνωστή και ως «σουσούρα», που ευδοκιμούν στη χώρα μας. Το μέλι ερείκης που συλλέγεται το φθινόπωρο έχει χαρακτηριστικό κοκκινωπό του χρώμα, έντονη οσμή και η γεύση, καθώς και υψηλή θρεπτική αξία που το καθιστούν ιδιαίτερο. Όταν προέρχεται από ανοιξιάτικη ερείκη έχει τελείως διαφορετικό χρώμα που μοιάζει με αυτό του κεριού και ιδιαίτερη υφή. Παρόλα αυτά λόγω της υψηλής ταχύτητας κρυστάλλωσης του δεν ενδείκνυται για αναμίξεις. Λόγω του υψηλού ποσοστού σε υγρασία υπάρχει μεγαλύτερος κίνδυνος να ξινίσει σε σύγκριση με άλλα μέλια.

- **Μέλι από ηλίανθο:**



Λόγω της εκτεταμένης καλλιέργειας του σε αρκετές περιοχές της χώρας μας και κυρίως στη Μακεδονία, το μέλι από ηλίανθο απαντάται συχνά. Είναι ανοιχτού κίτρινου χρώματος και έχει γλυκιά γεύση. Το υψηλό ποσοστό υγρασίας και η χαμηλή περιεκτικότητα σε διαστάση, το καθιστούν ιδιαίτερα ευπαθές. Επειδή όμως κρυσταλλώνει με μεγάλη ταχύτητα και αποκτά βουτυρώδη υφή είναι κατάλληλο για λεπτοκρυστάλλωση.

- **Μέλι από βαμβάκι:**



Όπως και στη περίπτωση της καστανιάς, το μέλι από βαμβάκι προέρχεται τόσο από το νέκταρ του φυτού όσο και από τις μελιτώδεις εκκρίσεις εντόμων που παρασιτούν σε αυτό. Η παραγωγή του βαμβακόμελου έχει μειωθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια εξαιτίας της αυξημένης χρήσης φυτοφαρμάκων στις καλλιέργειες βαμβακιού. Λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα κρυσταλλώνει γρήγορα. Είναι πολύ ανοιχτόχρωμο και όταν κρυσταλλώσει παίρνει ένα χαρακτηριστικό υπόλευκο χρώμα και έχει χαρακτηριστική βουτυρώδη υφή, γλυκιά γεύση και ουδέτερο άρωμα.

- **Μέλι από εσπεριδοειδή:**



Παράγεται σε ορισμένες περιοχές της χώρας μας και κυρίως στην Πελοπόννησο. Είναι ανοιχτόχρωμο, με πολύ χαρακτηριστικό άρωμα, ανάλογο του είδους από το οποίο προέρχεται, και γλυκιά γεύση. Έχει υψηλή ταχύτητα κρυστάλλωσης και μέση θρεπτική αξία.

- **Μέλι Ακακίας:**



Το πιο γνωστό είδος ακακίας που αυτοφύεται στην Ελλάδα είναι η ακακία η κοινή ή αλλιώς *Robinia pseudacacia*. Το μέλι που προέρχεται από τα άνθη της ακακίας έχει υπερβολικά ανοιχτό χρώμα, ιδιαίτερα λεπτή υφή, πλούσιο άρωμα και αρκετά γλυκιά αλλά ελαφριά γεύση. Έχει υψηλό ποσοστό φρουκτόζης και αυξημένη αναλογία φρουκτόζης/γλυκόζης. Γι' αυτό το λόγο διατηρείται ρευστό για μεγάλο χρονικό διάστημα και μπορεί να καταναλωθεί ακόμα και από άτομα που πάσχουν από διαβήτη.

## **2. *Pseudomonas aeruginosa* (Ψευδομονάδα η πυοκυανική ή αεριογόνος)**

Η ψευδομονάδα η πυοκυανική ή αεριογόνος είναι μέλος της τάξης των γ-πρωτεοβακτηρίων. Είναι ένα Gram αρνητικό, αερόβιο ραβδοειδές βακτήριο που ανήκει στη βακτηριακή οικογένεια *Pseudomonadaceae*. Από την ρεβιζιονιστική ταξινόμηση η οποία βασίζεται στα διατηρούμενα μακρομόρια (πχ. 16S ριβοσωμικό RNA) η οικογένεια περιλαμβάνει μόνο τα μέλη του γένους *Pseudomonas* τα οποία διασπώνται σε 8 ομάδες. Η *Pseudomonas aeru-*

*ginosa* είναι χαρακτηριστικός αντιπρόσωπος της ομάδας του, η οποία περιλαμβάνει 12 άλλα μέλη.

Όπως και άλλα μέλη του γένους, η *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένα ελεύθερα διαβιούμενο βακτήριο, που βρίσκεται συνήθως στο έδαφος και το νερό. Ωστόσο, ζεί συνήθως σε επιφάνειες των φυτών και περιστασιακά στις επιφάνειες των ζώων. Τα μέλη του γένους είναι γνωστά στους μικροβιολόγους φυτών, επειδή είναι μία από τις λίγες ομάδες που είναι παθογόνα των φυτών. Στην πραγματικότητα, η ψευδομονάδα είναι ένα περιστασιακό παθογόνο των φυτών. Ωστόσο, η ψευδομονάδα έχει γίνει όλο και περισσότερο αναγνωρίσιμη ως ένα ευκαιριακά παθογόνο κλινικής σημασίας. Πολλές διαφορετικές επιδημιολογικές μελέτες παρακολουθούν την εμφανισή του ως νοσοκομειακό παθογόνο και δείχνουν ότι η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά αυξάνεται σε κλινικά απομονωμένα στελέχη.

Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο, που σημαίνει ότι εκμεταλλεύεται κάποιο διάλειμμα στις άμυνες του ξενιστή για να ξεκινήσει μια μόλυνση. Στην πραγματικότητα, η *Pseudomonas aeruginosa* είναι η επιτομή του ευκαιριακού παθογόνου του ανθρώπου. Το βακτήριο δεν μολύνει σχεδόν ποτέ μη τραυματισμένους ιστούς, αλλά δεν υπάρχει σχεδόν κανένας ιστός που δεν μπορεί να μολύνει αν οι άμυνες του ιστού παραβιαστούν με κάποιο τρόπο. Προκαλεί λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος, δερματίτιδα, λοιμώξεις των μαλακών ιστών, βακτηριαιμία, μολύνσεις οστών και αρθρώσεων, γαστρεντερικές λοιμώξεις και μια ποικιλία συστηματικών λοιμώξεων, ιδιαίτερα σε ασθενείς με σοβαρά εγκαύματα και καρκίνο και ασθενείς με AIDS που είναι σε ανοσοκαταστολή. Λοίμωξη από *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένα σοβαρό πρόβλημα σε ασθενείς που νοσηλεύονται με καρκίνο, κυστική ίνωση, και εγκαύματα. Το ποσοστό θνησιμότητας σε αυτούς τους ασθενείς είναι κοντά στο 50 τοις εκατό.

Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι πρωτίστως ένα νοσοκομειακό παθογόνο. Σύμφωνα με το CDC, η συνολική συχνότητα των μολύνσεων από *P. aeruginosa* σε νοσοκομεία των ΗΠΑ κατά μέσο όρο περίπου 0,4 τοις εκατό, και το βακτήριο είναι το τέταρτο πιο συχνά απομονωμένο νοσοκομειακό παθογόνο αντιπροσωπεύοντας το 10,1 τοις εκατό του συνόλου των νοσοκομειακών λοιμώξεων.

### 2.1. Χαρακτηριστικά

Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένα Gram-αρνητικό βακτήριο με ραβδοειδή μορφή με μήκος από 0,5-0,8 μm έως 1,5-3,0 μm. Σχεδόν όλα τα

στελέχη είναι κινητικά μέσω ενός ενιαίου πολικού μαστιγίου. Το βακτήριο είναι πανταχού παρόν σε χώμα και νερό, και σε επιφάνειες σε επαφή με το έδαφος ή το νερό. Ο μεταβολισμός της είναι αερόβιος και ποτέ αναερόβιος, αλλά θα αυξηθεί απουσία  $O_2$  αν το  $NO_3$  είναι διαθέσιμο ως δέκτης ηλεκτρονίων. Το τυπικό βακτήριο *Pseudomonas* στη φύση μπορεί να βρεθεί σε ένα βιοφίλμ, που συνδέονται με κάποια επιφάνεια ή υπόστρωμα, ή σε μια πλαγκτονική μορφή, ως ένας μονοκύτταρος οργανισμός, που κολυμπά ενεργά μέσω του μαστιγίου του. Η ψευδομονάδα είναι μια από τους πιο έντονους, γρήγορους κολύμβητες που εμφανίζονται σε εγχύσεις σανό και σε δείγματα νερού λίμνης. Στο φυσικό της περιβάλλον η *Pseudomonas aeruginosa* δεν έχει ιδιαίτερα διακριτικά ως ψευδομονάδα, αλλά έχει ένα συνδυασμό από φυσιολογικά χαρακτηριστικά που είναι αξιοσημείωτα και μπορεί να σχετίζονται με την παθογένεια της.

Η *Pseudomonas aeruginosa* έχει πολύ απλές διατροφικές απαιτήσεις. Συχνά παρατηρείται «καλλιέργεια σε απεσταγμένο νερό», το οποίο είναι απόδειξη των ελάχιστων διατροφικών αναγκών της. Στο εργαστήριο, το πιο απλό μέσο για την ανάπτυξη της *Pseudomonas aeruginosa* αποτελείται από οξικό οξύ ως πηγή άνθρακα και θειικό αμμώνιο ως πηγή αζώτου. Η *P. aeruginosa* κατέχει μεταβολική ευελιξία για την οποία οι ψευδομονάδες είναι τόσο διάσημες. Παράγοντες οργανικής ανάπτυξης δεν είναι απαραίτητοι, και μπορεί να χρησιμοποιήσει περισσότερα από εβδομήντα πέντε οργανικές ενώσεις για την ανάπτυξη της. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη της είναι 37 °C, αλλά είναι σε θέση να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες τόσο υψηλές όσο οι 42 °C. Είναι ανεκτική σε μια ευρεία ποικιλία φυσικών συνθηκών, συμπεριλαμβανομένης της θερμοκρασίας. Είναι ανθεκτικό σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων και βαφές, αδύναμα αντισηπτικά, και πολλά κοινώς χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά. Η *Pseudomonas aeruginosa* έχει μια προτίμηση για την ανάπτυξη σε υγρό περιβάλλον, το οποίο είναι πιθανώς μια αντανάκλαση της φυσικής ύπαρξής της στο έδαφος και το νερό. Αυτές οι φυσικές ιδιότητες του βακτηρίου αναμφίβολα συμβάλλουν στην οικολογική επιτυχία του ως ευκαιριακό παθογόνο. Μπορούν επίσης να βοηθήσουν να εξηγήσει την πανταχού παρούσα φύση του οργανισμού και τη σημασία της ως νοσοκομειακό παθογόνο. Απομονωμένα στελέχη *P. aeruginosa* μπορούν να παράγουν τρία είδη αποικιών. Αυτά που έχουν απομονωθεί φυσικά από το έδαφος ή το νερό παράγουν συνήθως μια μικρή, τραχιά αποικία. Κλινικά δείγματα, σε γενικές γραμμές, αποδίδουν ένα ή δύο είδη λείων αποικιών. Ένας τύπος έχει μια εμφάνιση σαν τηγανητό αυγό η οποία είναι μεγάλη, λεία, με επίπεδες ακμές και μία ανυψωμένη εμφάνιση. Ένας άλλος τύπος, συχνά λαμβάνεται από εκκρίσεις της αναπνοής και τροφής, έχει μια βλενώδης

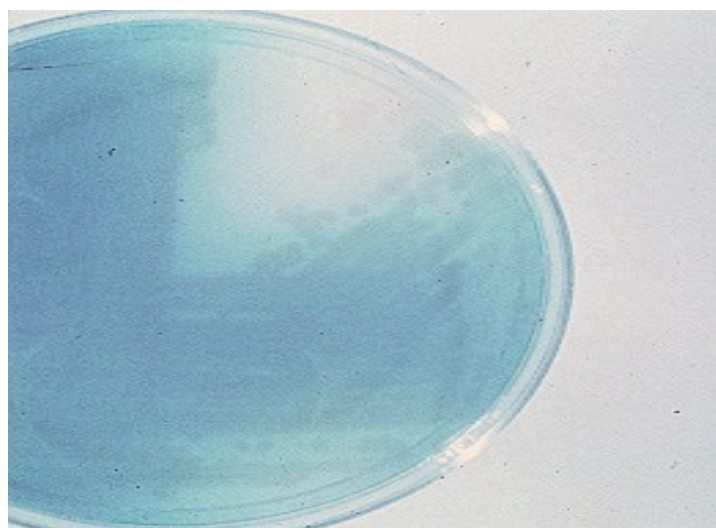


εμφάνιση, η οποία αποδίδεται στην παραγωγή του αλγινικής βλέννης. Οι ομαλές και βλενώδεις αποικίες εικάζεται ότι παίζουν ένα ρόλο στον αποικισμό και την λοιμογόνο δράση.



**Εικόνα 3: Αποικίες *Pseudomonas aeruginosa* σε άγαρ**

Στελέχη *P. aeruginosa* παράγουν δύο τύπους διαλυτών χρωστικών, την φθορίζουσα pyoverdipin χρωστική και την μπλε χρωστική πυοκυανίνη. Η τελευταία παράγεται σε αφθονία σε μέσα με χαμηλή περιεκτικότητα σε σίδηρο και λειτουργίες στο μεταβολισμό του σιδήρου στο βακτήριο. Πυοκυανίνη (από το "pyocyanus") αναφέρεται σε «μπλε πύον», η οποία είναι ένα χαρακτηριστικό της πυώδης λοιμώξεως που προκαλείται από την *Pseudomonas aeruginosa*.



**Εικόνα 4: Η διαλυτή μπλε χρωστική πυοκυανίνη παράγεται από πολλά, αλλά όχι από όλα τα στελέχη της *Pseudomonas aeruginosa*.**

## 2.2. Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά

Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι διαβόητη για την ανθεκτικότητα της στα αντιβιοτικά και είναι, ως εκ τούτου, ένα ιδιαίτερα επικίνδυνο και επίφοβο παθογόνο. Το βακτήριο είναι φυσικά ανθεκτικό σε πολλά αντιβιοτικά λόγω της φραγής permeability παρέχεται από την Gram-αρνητική εξωτερική μεμβράνη του. Επίσης, η τάση του να αποικίζει τις επιφάνειες σε μορφή βιοφίλμ καθιστά τα κύτταρα αδιαπέραστα σε θεραπευτικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών. Δεδομένου ότι το φυσικό του περιβάλλον είναι το έδαφος, που ζουν σε συνδυασμό με τους βακίλους, ακτινομύκητες και μύκητες μούχλας, έχει αναπτύξει αντίσταση σε μια ποικιλία φυσικώς-απαντώμενων αντιβιοτικών τους. Επιπλέον, η *Pseudomonas* διατηρεί πλασμίδια που φέρουν γονίδια αντίστασης στα αντιβιοτικά, αμφότερα τα R-παραγόντων και RTF, και είναι σε θέση να μεταφέρει αυτά τα γονίδια μέσω των βακτηριακών μηχανισμών της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (horizontal gene transfer-HGT), κυρίως μέσω μεταγωγής και σύζευξης.

Μόνο λίγα αντιβιοτικά είναι αποτελεσματικά εναντίον της *Pseudomonas aeruginosa*, συμπεριλαμβανομένων των φθοροκινολονών, γενταμικίνης και ιμιπενέμης, αλλά ακόμη και αυτά τα αντιβιοτικά δεν είναι αποτελεσματικά έναντι όλων των στελεχών. Η ματαιότητα της θεραπείας των λοιμώξεων της *Pseudomonas* με αντιβιοτικά παρουσιάζεται πιο δραματικά σε ασθενείς με κυστική ίνωση, το σύνολο σχεδόν των οποίων ενδεχομένως να μολυνθούν με ένα στέλεχος που είναι τόσο ανθεκτικό ώστε να μην μπορεί να αντιμετωπιστεί.

## 2.3. Ασθένειες που προκαλούνται από *Pseudomonas aeruginosa*

- **Ενδοκαρδίτιδα.** Η *Pseudomonas aeruginosa* μολύνει τις καρδιακές βαλβίδες των χρηστών ναρκωτικών IV (ενδοφλεβίως) και τις προσθετικές βαλβίδες της καρδιάς. Ο οργανισμός καθιερώνεται στο ενδοκάριο με άμεση εισβολή από το ρεύμα του αίματος.
- **Λοιμώξεις του αναπνευστικού.** Αναπνευστικές λοιμώξεις που προκαλούνται από την *Pseudomonas aeruginosa* συμβαίνουν σχεδόν αποκλειστικά σε άτομα με κίνδυνο κατώτερη αναπνευστική οδό ή κατεσταλμένο συστηματικό μηχανισμό άμυνας. Πρωτογενής πνευμονία εμφανίζεται σε ασθενείς με χρόνια πνευμονοπάθεια και συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια. Βακτηριαμική πνευμονία εμφανίζεται συνήθως σε ουδετεροπενικούς ασθενείς με καρκίνο που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία. Αποικισμός της κατώτερης αναπνευστικής οδού από ασθενείς με κυστική ίνωση με βλενώδη στελέχη του *Pseudomonas aeruginosa* είναι κοινό και δύσκολο, αν όχι αδύνατο, να εξαλειφθεί.

- *Βακτηριαμία και σηψαιμία.* Η *Pseudomonas aeruginosa* προκαλεί βακτηριαμία κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Προδιαθετημένες συνθήκες περιλαμβάνουν αιματολογικές κακοήθειες, ανοσοανεπάρκεια που σχετίζεται με το AIDS, ουδετεροπενία, σακχαρώδης διαβήτης, και σοβαρά εγκαύματα. Οι περισσότερες βακτηριαμίες από *Pseudomonas* αποκτάται σε νοσοκομεία και γηροκομεία. Στην *Pseudomonas* οφείλεται περίπου το 25 τοις εκατό του συνόλου των απεκτηθέντων Gram-αρνητικών βακτηριαμιών (Grogan JB, 1996).
- *Λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος.* Η *Pseudomonas aeruginosa* προκαλεί μηνιγγίτιδα και αποστήματα στον εγκέφαλο. Ο οργανισμός εισβάλλει στο ΚΝΣ από μία παρακείμενη δομή όπως το εσωτερικό αυτί ή τους παραρρινικούς κόλπους, ή εμβολιάζεται απ' ευθείας μέσω τραύματος της κεφαλής, χειρουργείου ή επεμβατικών διαγνωστικών διαδικασιών, ή εξαπλώνεται από ένα μακρινό σημείο της λοίμωξης, όπως το ουροποιητικό σύστημα.
- *Μολύνσεις αυτιών,* συμπεριλαμβανομένων εξωτερική ωτίτιδα. Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι το κυρίαρχο παθογόνο βακτήριο σε ορισμένες περιπτώσεις εξωτερικής ωτίτιδας, συμπεριλαμβανομένων του «αυτιού του κολυμβητή». Το βακτήριο σπάνια βρίσκεται στο υγιές αυτί, αλλά συχνά κατοικεί στον εξωτερικό ακουστικό πόρο σε συνδυασμό με τον τραυματισμό, διαβροχή, φλεγμονή, ή απλά υγρές συνθήκες.
- *Μολύνσεις των ματιών.* Η *Pseudomonas aeruginosa* μπορεί να προκαλέσει καταστροφικές μολύνσεις στο ανθρώπινο μάτι. Είναι μια από τις πιο κοινές αιτίες βακτηριακής κερατίτιδας, και έχει απομονωθεί ως αιτιολογικός παράγοντας της νεογνικής οφθαλμίας. Η *Pseudomonas* μπορεί να αποικίσει το οφθαλμικό επιθήλιο μέσω μιας κροσσωτού προσκόλλησης σε υποδοχείς σιαλικού οξέος. Εάν οι άμυνες του περιβάλλοντος είναι σε κίνδυνο με οποιονδήποτε τρόπο, το βακτήριο μπορεί να πολλαπλασιαστεί ταχέως μέσω της παραγωγής ενζύμων όπως η ελαστάση, αλκαλική πρωτεάση και εξωτοξίνη A, και να προκαλέσει μία ταχέως καταστροφική λοίμωξη που μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια ολόκληρου του ματιού.
- *Οστών και των αρθρώσεων λοιμώξεις.* Οι λοιμώξεις των οστών και των αρθρώσεων από *Pseudomonas* προκύπτουν από άμεσο ενοφθαλμισμό των βακτηριδίων ή την αιματογενή διασπορά των βακτηρίων από άλλες πρωτογενείς θέσεις μόλυνσης. Οι λοιμώξεις που μεταδίδονται με το αίμα πιο συχνά σε χρήστες ναρκωτικών IV και σε συνδυασμό με λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος ή της πυέλου. Η *Pseudomonas aeruginosa* έχει ένα ιδιαίτερο τροπισμό για αρθρώσεις του αξονικού σκελετού. Η *Pseudomonas aeruginosa* προκαλεί χρόνια οστεομυελίτιδα, που συνήθως

προκύπτουν από άμεσο ενοφθαλμισμό των οστών και είναι το πλέον κοινό παθογόνο που εμπλέκεται στην οστεοχονδρίτιδα μετά από πληγές λόγω παρακέντησης του ποδιού.

- *Λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος.* Λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος (ουρολοιμώξεις), που προκαλούνται από την *Pseudomonas aeruginosa* είναι συνήθως ενδονοσοκομειακές και σχετίζονται με καθετηριασμό, όργανα ή χειρουργική επέμβαση του ουροποιητικού. Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι η τρίτη κύρια αιτία των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων του ουροποιητικού, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 12 τοις εκατό όλων των μολύνσεων από αυτού του τύπου. Το βακτήριο φαίνεται να είναι μεταξύ των πιο προσκολλημένων κοινών ουροπαθογόνων στο επιθήλιο της ουροδόχου κύστης. Όπως και στην περίπτωση του *E. coli*, λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος μπορεί να συμβεί μέσω μιας αύξουσας ή φθίνουσας διαδρομής. Επιπλέον, η *Pseudomonas* μπορεί να εισβάλει στην κυκλοφορία του αίματος από το ουροποιητικό σύστημα, και αυτή είναι η πηγή του σχεδόν 40 τοις εκατό της βακτηραιμίας από *Pseudomonas*. (Khan et al., 2000).
- *Λοιμώξεις του γαστρεντερικού συστήματος.* Η *Pseudomonas aeruginosa* μπορεί να παράγει ασθένεια σε οποιοδήποτε μέρος του γαστρεντερικού σωλήνα από το στοματοφάρυγγα έως το ορθό. Όπως και σε άλλες μορφές νόσων από *Pseudomonas*, εκείνες που αφορούν την γαστρεντερική οδό συμβαίνουν κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Ο οργανισμός έχει ενοχοποιηθεί σε perirectal λοιμώξεις, παιδιατρική διάρροια, γαστρεντερίτιδα, και νεκρωτική εντεροκολίτιδα. Το γαστρεντερικό σύστημα είναι επίσης ένα σημαντικό πύλης εισόδου της *Pseudomonas* στην σηψαιμία και βακτηραιμία.
- *Λοιμώξεις δέρματος και μαλακών ιστών,* συμπεριλαμβανομένων των λοιμώξεων του τραύματος, πυώδεις δερματίτιδες και δερματίτιδα. Η *Pseudomonas aeruginosa* μπορεί να προκαλέσει μια ποικιλία λοιμώξεων του δέρματος, τόσο εντοπισμένες όσο και διάχυτες. Οι κοινοί παράγοντες που προδιαθέτουν την λοίμωξη είναι η λύση της συνέχειας του δέρματος που μπορεί να προκύψει από εγκαύματα, τραύμα ή δερματίτιδα. Επίσης ενοχοποιούνται συνθήκες υψηλής υγρασίας, όπως αυτές που βρέθηκαν στο αντί των κολυμβητών και στα δάκτυλα των ποδιών αθλητών, πεζοπόρων και μάχιμων στρατευμάτων, στην περιοχή του περινέου και κάτω από τις πάνες βρεφών, και στο δέρμα των χρηστών τζακούζι και υδρομασάζ. Τα άτομα με AIDS έχουν μολυνθεί εύκολα. Η *Pseudomonas* έχει επίσης ενοχοποιηθεί για θυλακίτιδα.

### 3. Σκοπός της παρούσας μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης μελιού της περιοχής του Ολύμπου καθώς και η μελέτη των μηχανισμών της αντιμικροβιακής τους δράσης. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν 12 δείγματα μελιών όσον αφορά την αντιμικροβιακή δράση τους έναντι του Gram αρνητικού βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* που εμφανίζει ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά καρβαπενέμες. Για να μελετηθεί η αντιμικροβιακή ικανότητα των μελιών χρησιμοποιήθηκαν δύο *in vitro* μέθοδοι :α)η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ (*well diffusion method*) και β)η μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*Minimum Inhibitory Concentration, MIC*) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοδότησης (*microtiter plates*). Για την εκτίμηση των μηχανισμών της αντιβακτηριακής δράσης των μελιών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσδιορισμού MIC με τη προσθήκη α) καταλάσης, ένζυμο που διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου και β) πρωτεΐνάσης K, ένζυμο που διασπά πρωτεΐνες ή ολιγοπεπτίδια που υπάρχουν στο μέλι και συμβάλλουν στην αντιβακτηριακή του δραστηριότητα. Όλες οι μέθοδοι στηρίζονται στην ικανότητα των συστατικών του μελιού να αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων.

### 4. Υλικά και μέθοδοι

#### 4.1. Υλικά

- Τρυβλία Petri (100mm)
- Μικροπλάκες 96-θέσεων (96-wells microplates)
- Θρεπτικό υλικό Mueller-Hinton Broth
- Θρεπτικό υλικό Mueller-Hinton agar
- Θρεπτικό υλικό Luria-Bertani Broth
- Γυάλινες πιπέτες paster
- Eppendorfs
- Γυάλινα φιαλίδια (vials)
- Χάρακας

#### ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ

- *Pseudomonas aeruginosa* 1773 (Ανθεκτική στις καρβαπενέμες)

#### 4.1.1. Δείγματα μελιών

Τα μέλια, που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από διάφορες περιοχές του Ολύμπου. Εξετάστηκαν τα παρακάτω 12 δείγματα μελιών (Πίνακας 1):

Α/Α	ΤΥΠΟΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΠΑΡΑΓΩΓΟΣ
1		Τρύγος Ιουλίου	Καρυά Ολύμπου	Σαμαράς Γεώργιος
2	Αγριοτριφύλλι, πολλά μικρά ετήσια λουλούδια		Ελασσόνα Ολύμπου	Γκρέγκα Ιωάννα
3	Μέλι άνθεων		Συμεά Ελασσόνας	Σδάνης Νικόλαος
4	Τριφύλλι, γκορτσιά, κοντορίγανη, λαδανιά, δρυς- μελιτώματα	30/7/2013	Παλιάμπελα Βερδικούσας Λάρισας	Καρματσέλης Χαράλαμπος
5	Λυγαριά, Φουκαλιά, Ακακία, Αγριοδυόσμος, Αγριοβαμβακιά, Αγκάθια	Τρύγος Ιουλίου	Δομένικο	Τσιμπλακιάρης Κωνσταντίνος
6	Ακακία, Ζαρμπούνι, Γαϊδουροάγκαθο, Ροζ αγκάθι	Τρύγος Ιουλίου	Σκαμινιά	Σολκόβσκι Γιούρι
7	Ακακία, Παλιούρι, Βίκος, Φακές, Μηλιά, Αγριολούλουδα		Σαραντάπορο	Χατζή Μαρία
8	Αγριοτριαντάφυλλο, ακακία, θρούμπη, μέντα, βελανιδιά, μελούρας	Ιούνιος-Ιούλιος	Κρανιά Ελασσόνας	Καραλής Νικόλαος
9			Άζωρο Ελασσόνας	Νταλέπη Χρυσούλα – Μπουρονίκος Δημήτριος
10	Μέλι άνθεων		Βερδικούσα Λάρισας	Σβαρνάς Αθανάσιος
11			Καλλιθέα Ελασσόνας	Κουρδή Ουρανία – Πουρσανίδης
12		Ιούνιος 2012	Καρυά Ολύμπου	Σαμαράς Γεώργιος

**Μέλι Manuka:** Το μέλι Manuka είναι της εταιρίας Manuka Health New Zealand, με UMF 25+ και MGO 550.

### **Τεχνητό μέλι:**

Το τεχνητό μέλι φτιάχτηκε στο εργαστήριο και χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικό control. Ζυγίστηκαν και διαλύθηκαν 3.0g σουκρόζης, 15g μαλτόζης, 80.1g φρουκτόζης και 67g γλυκόζης σε 34 ml απιονισμένο νερό (Sherlock et al. 2010). Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 56° C μέχρι να διαλυθεί. Αυτό το διάλυμα αντιπροσωπεύει τα τέσσερα κυρίαρχα σάκχαρα που βρίσκονται στο μέλι.

#### **4.1.2. Θρεπτικά υποστρώματα**

##### **4.1.2.1. LB θρεπτικό υλικό**

Ο ζωμός λυσιγονίας (**LB**), ένα εξαιρετικά πλούσιο θρεπτικό μέσο, χρησιμοποιείται κυρίως για την ανάπτυξη των βακτηρίων . Το αρκτικόλεξο είναι επίσης συχνά, αν και εσφαλμένα, νοούμενο ως ζωμός **Luria (Luria broth)**, ζωμός **Lennox (Lennox broth)**, ή μέσο **Luria-Bertani**. Σύμφωνα με τον δημιουργό του Giuseppe Bertani , η συντομογραφία **LB** αρχικά είχε ως σκοπό να χρησιμοποιείται για το ζωμο λυσιγονίας (lysogeny broth)( Bertani, G. 2004). Η συνταγή για το μέσο **LB** δημοσιεύθηκε το 1951 στο πρώτο έγγραφο του Bertani για την λυσιγονία . Σε αυτό το άρθρο περιέγραψε το τροποποιημένο απλής ριπής πείραμα και την απομόνωση των φάγων P1 , P2 , και P3 . Είχε αναπτύξει το μέσο **LB** για τη βελτιστοποίηση της ανάπτυξης και του σχηματισμού πλάκας της *Shigella* . (Bertani, G. 1951)

Υπάρχουν πολλά κοινά είδη LB. Αν και είναι διαφορετικά, έχουν γενικά μια κάπως παρόμοια σύνθεση των συστατικών που χρησιμοποιούνται για την προώθηση της ανάπτυξης, συμπεριλαμβανομένων των εξής:

- Πεπτίδια και καζεΐνη πεπτονών
- Βιταμίνες (συμπεριλαμβανομένων των βιταμινών B)
- Ιχνοστοιχεία (π.χ. άζωτο, θείο, μαγνήσιο)
- Ορυκτά

Πεπτίδια και πεπτόνες παρέχονται από την θρυπτόνης . Οι βιταμίνες και ορισμένα ιχνοστοιχεία παρέχονται από εκχύλισμα ζύμης. Τα ιόντα νατρίου για τη μεταφορά και την ωσμωτική ισορροπία παρέχονται από το χλωριούχο νάτριο . Η τρυπτόνη χρησιμοποιείται για να παρέχει ουσιώδη αμινοξέα στά αυξανόμενα βακτήρια, ενώ το εκχύλισμα ζύμης χρησιμοποιείται για να παρέχει μια πληθώρα από οργανικές ενώσεις χρήσιμες για τη βακτηριακή ανάπτυξη.

## Τύποι

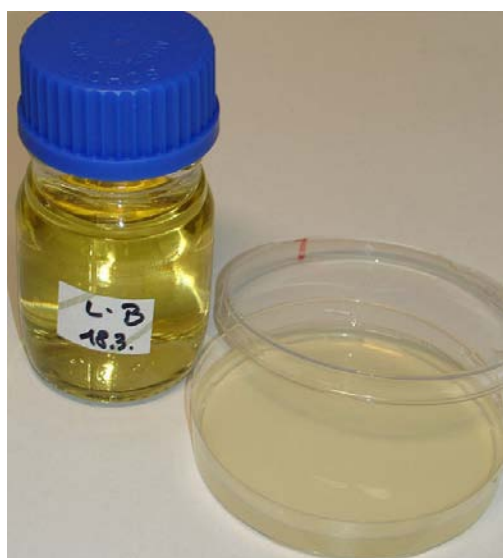
Τα σκευάσματα γενικά διαφέρουν στην ποσότητα του χλωριούχου νατρίου, παρέχοντας έτσι την επιλογή των κατάλληλων οσμωτικών συνθηκών για το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος και επιθυμητές συνθήκες καλλιέργειας. Τα χαμηλά σε αλάτι σκευάσματα, Lennox και Luria, είναι ιδανικά για καλλιέργειες που απαιτούν ευαίσθητα σε αλάτι αντιβιοτικά.

- LB-Miller (10 g / L NaCl)
- LB-Lennox (5 g / L NaCl)
- LB-Luria (0,5 g / L NaCl)

## Προετοιμασία

Το ακόλουθο είναι μία κοινή μέθοδος για την παρασκευή του 1 λίτρου LB:

- Μέτρηση των ακολούθων:
  - 10 g τρυπτόνης
  - 5 g εκχύλισμα ζύμης
  - 10 g NaCl
- Αιώρηση των στερεών σε ~ 800 ml απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού.
- Πρόσθεση επιπλέον απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού , σε ογκομετρικό κύλινδρο για να εξασφαλιστεί η ακρίβεια.
- Αποστείρωση στους 121 ° C για 20 λεπτά.
- Μετά την ψύξη, η φιάλη στροβιλίζεται για να εξασφαλισθεί η ανάμιξη και το LB είναι έτοιμο για χρήση.



**Εικόνα 5:** Χαρακτηριστική εικόνα LB υγρού υποστρώματος και LB στερεού υποστρώματος.



#### 4.1.2.2. *Mueller-Hinton* θρεπτικό υλικό

Το *Mueller-Hinton* άγαρ είναι ένα μικροβιολογικό μέσο ανάπτυξης που χρησιμοποιείται συνήθως για την δοκιμή της αντιβιοτικής ευαισθησίας. Έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση και διατήρηση των ειδών *Neisseria* και *Moraxella*.

Τυπικά περιέχει: (Atlas, R.M. 2004).

- 30% έγχυμα από βόειο κρέας
- 1,75% υδρολάση της καζεΐνης
- 0,15% άμυλο
- 1,7% άγαρ

Το pH ρυθμίζεται ουδέτερο στους 25 °C.

Πέντε τοις εκατό αίμα προβάτου και διουκλεοτίδιο νικοτιναμιδίου αδενίνης μπορεί να προστεθεί όταν δοκιμές ευαισθησίας γίνονται σε *Streptococcus*. Αυτός ο τύπος μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την δοκιμή ευαισθησίας του *Campylobacter*.

Έχει μερικές ιδιότητες που το καθιστούν εξαιρετικό για την χρήση του σε δοκιμές αντιβιοτικών. Πρώτα από όλα, είναι ένα μη-εκλεκτικό, μη-διαφορικό μέσο. Αυτό σημαίνει ότι σχεδόν όλοι οι οργανισμοί που απλώνονται σε αυτό αναπτύσσονται. Επιπλέον, περιέχει άμυλο. Το άμυλο είναι γνωστό ότι θα απορροφήσει τις τοξίνες που απελευθερώνονται από τα βακτήρια, έτσι ώστε να μην αντιδράσουν με τα αντιβιοτικά. Αυτό επιτρέπει την καλύτερη διάχυση των αντιβιοτικών από τις άλλες πλάκες.

#### 4.2. Μέθοδοι

Για την εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των μελιών, χρησιμοποιήθηκαν 2 *in vitro* μέθοδοι:

- i) Η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ (*wells diffusion method*)
- ii) Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*minimum inhibitory concentration*) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (*microtiter plates*).

Η πρώτη μέθοδος στηρίζεται στην αναστολή της ανάπτυξης των βακτηρίων και είναι κατά βάση ποιοτική. Η δεύτερη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της αντιμικροβιακής δράσης των μελιών.

Για την εκτίμηση των μηχανισμών της αντιμικροβιακής δράσης του μελιού χρησιμοποιήθηκε μία *in vitro* μέθοδος:

προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*minimum inhibitory concentration*) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (*microtiter plates*)

- α) με την προσθήκη καταλάσης
- β) με την προσθήκη πρωτεΐνάσης K

#### 4.2.1. Εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των μελιών με τη μέθοδο Διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (*wells diffusion method*)

##### 4.2.1.1. Αρχή της μεθόδου – Πειραματική διαδικασία

Η δοκιμή ευαισθησίας των μελιών με την πρώτη μέθοδο εξετάστηκε με βάση τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (Ahn and Stiles 1990).

Αρχικά προετοιμάζεται η καλλιέργεια των βακτηρίων χρησιμοποιώντας καλλιέργειες (glycerol stock) που διατηρούνται στους  $-80^{\circ}$  C. Με μικροβιολογικό κρίκο και σε ασηπτικό περιβάλλον παίρνεται μια μικρή ποσότητα βακτηρίων από την καλλιέργεια stock και τοποθετείται σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα Mueller-Hinton άγαρ. Το τρυβλίο τοποθετείται σε επωαστήρα για 16 ώρες στους  $37^{\circ}$  C. Στην συνέχεια ακολουθεί υγρή καλλιέργεια με την απομόνωση από το τρυβλίο μιας αποικίας με την βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου και σε ασηπτικό περιβάλλον. Η ποσότητα αυτή των βακτηρίων τοποθετείται σε vial με θρεπτικό υπόστρωμα Luria-Bertani. Το vial τοποθετείται σε επωαστήρα υπό ανάδευση (*incubator shaker*) για 16 ώρες στους  $37^{\circ}$  C στις 210 στροφές.

Στη συνέχεια η καλλιέργεια αραιώνεται μέχρι την παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος (inoculum) θολερότητας ίση με 0,5 McFarland (περίπου  $1,5 \times 10^8$  cfu/ml). Η μέτρηση οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm έγινε με φασματοφωτόμετρο μέχρι να πετύχουμε τελική τιμή 0,132 που αντιστοιχεί σε 0,5 McFarland (περίπου  $1,5 \times 10^8$  cfu/ml).

Αφού γίνει η προετοιμασία των τρυβλίων με Muller Hinton agar, στη συνέχεια με την ανάποδη μεριά αποστειρωμένης γυάλινης πιπέτας Pasteur δημιουργούμε 3 κοιλότητες (wells) διαμέτρου 6 mm.

- στην πρώτη κοιλότητα βάζουμε περίπου 100 mg manuka 25+ (θετικό control),
- στη δεύτερη κοιλότητα βάζουμε περίπου 100 mg τεχνητό μέλι (αρνητικό control)

- και στην τρίτη κοιλότητα περίπου 100 mg του υπό εξέταση μελιού.

Μετά από 30 λεπτά επιστρώνουμε τα βακτήρια στο τρυβλίο (για την *P. aeuruginosa* επιστρώνουμε  $10^6$  CFUs).

Τοποθετούμε τα τρυβλία σε επωαστήρα στους  $37^{\circ}$  C για 16 ώρες ώστε να σχηματιστεί στρώμα βακτηρίων σε όλο το τρυβλίο.

Μετά την επώαση εξετάζουμε κάθε τρυβλίο Petri και μετράμε με χάρακα τις διαμέτρους (mm) των ζωνών πλήρους αναστολής της ανάπτυξης των βακτηρίων. Στις μετρήσεις συμπεριλαμβάνονται και τα 6mm από το πηγαδάκι. Όλα τα δείγματα εξετάζονται τουλάχιστον εις τριπλούν για κάθε μέλι και για το κάθε βακτήριο.

#### 4.2.2. Εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των δειγμάτων μελιού μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (minimum inhibitory concentration) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (microtiter plates).

##### 4.2.2.1. Αρχή της μεθόδου

Η δεύτερη *in vitro* μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) έγινε σε αποστειρωμένες μικροπλάκες (*microplates*) πολυστερίνης 96 θέσεων (*96-wells*) η καθεμία. Για τη δοκιμασία της μεθόδου ακολουθήθηκε η διαδικασία που αναφέρεται στη βιβλιογραφία (Patton et al.2005, Sherlock et al 2010).

Για τις υγρές καλλιέργειες, το MIC ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα, στην οποία δεν ανιχνεύεται καμιά αύξηση, δηλαδή έχουμε 100% αναστολή της ανάπτυξης του υπό εξέταση οργανισμού. (Sherlock et al 2010 ).

Για την μέτρηση της βακτηριακής ανάπτυξης οι μικροπλάκες τοποθετήθηκαν σε *microplate reader* (*ELx808 Absorbance Microplate Reader, BioTek*), συνδεδεμένο με έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η μέτρηση έγινε στα 630 nm. Η ανάλυση των οπτικών απορροφήσεων των καλλιεργειών έγινε με το λογισμικό *Gen5™ Data Analysis Software* (BioTek).

##### 4.2.2.2. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται η καλλιέργεια των βακτηρίων χρησιμοποιώντας καλλιέργειες (*glycerol stock*) που διατηρούνται στους  $-80^{\circ}$ C. Με μικροβιολογικό κρίκο και σε ασηπτικό περιβάλλον παίρνεται μια μικρή ποσότητα βακτηρίων από την καλλιέργεια *stock* και τοποθετείται σε τρυβλίο

με θρεπτικό υπόστρωμα Mueller-Hinton άγαρ. Το τρυβλίο τοποθετείται σε επωαστήρα για 16 ώρες στους 37°C . Στην συνέχεια ακολουθεί υγρή καλλιέργεια με την απομόνωση από το τρυβλίο μιας αποικίας με την βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου και σε ασηπτικό περιβάλλον. Η ποσότητα αυτή των βακτηρίων τοποθετείται σε vial με θρεπτικό υπόστρωμα Luria-Bertani. Το vial τοποθετείται σε επωαστήρα υπό ανάδευση (*incubator shaker*) για 16 ώρες στους 37°C στις 210 στροφές.

Στη συνέχεια η καλλιέργεια αραιώνεται μέχρι την παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος (inoculum) θολερότητας ίση με 0,5 McFarland (περίπου  $10^8$  cfu/ml). Η μέτρηση οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm έγινε σε φασματοφωτόμετρο μέχρι να πετύχουμε τελική τιμή 0,132 που αντιστοιχεί σε 0,5 McFarland (περίπου  $1,5 \times 10^8$  cfu/ml).

Για κάθε ένα από τα 12 μέλια δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις (50% v/v, 25% v/v, 12,5% v/v, 6,25% v/v, 3,125% v/v, 1,5% v/v) για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης.

Για κάθε μέλι χρησιμοποιήθηκαν εις τριπλούν

6 πηγαδάκια (wells), στο καθένα από τα οποία προστέθηκε

- 190 μl από την κάθε αραιώση του εκάστοτε υπό εξέταση μελιού.(διαδοχικά)
- $5 \times 10^4$  CFUs καλλιέργειας

3 σειρές με 6 πηγαδάκια η κάθε μία (θετικό control) στα οποία προστέθηκαν

- 190μl από την κάθε αραιώση του μελιού manuka 25+
- $5 \times 10^4$  CFUs καλλιέργειας,

2 σειρές με 6 πηγαδάκια (αρνητικό control) στα οποία προστέθηκαν

- 190 μl θρεπτικού υλικού Muller Hinton Broth
- $5 \times 10^4$  CFUs καλλιέργειας

Αρχικά η μικροπλακέτα τοποθετήθηκε στο *ELx808 Absorbance Microplate Reader* (Εικόνα 6) και έγινε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 630 nm (t=0.) Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν και καταγράφηκαν από το λογισμικό *Gen5™ Data Analysis Software*. Στη συνέχεια η μικροπλακέτα τοποθετήθηκε σε επωαστήρα (*incubator*) στους 37° C για 24 ώρες. Μετά από την επώαση των 24 ωρών έγινε ανάδευση με την πιπέτα και ακολούθησε μια δεύτερη ανάγνωση από το *Absorbance Microplate Reader*.(t=24)

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

Η OD για το κάθε πηγαδάκι προκύπτει από την αφαίρεση της μέτρησης για  $t=24$  μείον τη μέτρηση για  $t=0$ . (δηλ.  $OD_{\text{testwell}} = T_{24 \text{ test}} - T_{0 \text{ test}}$  και  $OD_{\text{of corresponding control well}} = T_{24 \text{ control}} - T_{0 \text{ control}}$ )

Η αναστολή της ανάπτυξης για το κάθε μέλι στο κάθε πηγαδάκι στην κάθε αραίωση υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τον τύπο

**100%ΑΝΑΣΤΟΛΗ =  $1 - (OD_{\text{testwell}} / OD_{\text{of corresponding control well}}) \times 100$**  (Thomas Patton και συν. 2005) για κάθε σειρά από το πιατάκι με τα 96 πηγαδάκια (π.χ. η OD τιμή της σειράς 1, στήλης 1, πηγαδάκι 1 (test) διαιρέθηκε με την OD τιμή της σειράς 1, στήλης 8, πηγαδάκι 8 (control)).

Από αυτό προέκυψαν 6 τιμές αναστολής για την κάθε αραίωση του μελιού.

Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν τουλάχιστον για το κάθε μέλι και για την κάθε συγκέντρωση.



**Εικόνα 6: ELx808 Absorbance Microplate Reader**

**Πίνακας 1: Περιγραφή ενός microtiter plate.**

	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<i>H</i>
	<i>Μέλι προς εξέτασ η</i>	<i>Μέλι προς εξέτασ η</i>	<i>Μέλι προς εξέτασ η</i>	<i>Manuka  (θετικό control)</i>	<i>Manuka  (θετικό control)</i>	<i>Manuka  (θετικό control)</i>	<i>Αρνητικ ό con- trol</i>	<i>Αρνητικ ό con- trol</i>
<i>1 Αραίωση 50%</i>								
<i>2 Αραίωση 25%</i>								
<i>3 Αραίωση 12,5%</i>								
<i>4 Αραίωση 6,25%</i>								
<i>5 Αραίωση 3,125%</i>								
<i>6 Αραίωση 1,56%</i>								
<i>7 Αραίωση 50%</i>								
<i>8 Αραίωση 25%</i>								
<i>9 Αραίωση 12,5%</i>								
<i>10 Αραίωση 6,25%</i>								
<i>11 Αραίωση 3,125%</i>								
<i>12 Αραίωση 1,56%</i>								

#### 4.2.3. Εκτίμηση των μηχανισμών της αντιμικροβιακής ικανότητας των μελιών μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*minimum inhibitory concentration*) με την χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (*microtiter plates*) με την προσθήκη α) καταλάσης β) πρωτεΐνάσης K.

Με αυτή τη μέθοδο δοκιμάστηκαν 12 μέλια τα οποία έδωσαν ίδια ή καλύτερα αποτελέσματα από το μέλι Manuka 25+ (θετικό control) με τη μέθοδο Διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (*Wells-diffusion method*) και με τη μέθοδο του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*minimum inhibitory concentration*) με την χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (*microtiter plates*).

##### 4.2.3.1. Αρχή της μεθόδου

Χρησιμοποιήθηκε η *in vitro* μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) σε αποστειρωμένες μικροπλάκες (*microplates*) πολυστερίνης 96 θέσεων (*96-wells*) η καθεμία μετά την προσθήκη α) καταλάσης, β) πρωτεΐνάσης K.

α) Με την προσθήκη καταλάσης στο μέλι μπορεί να προσδιοριστεί αν η αντιβακτηριακή δράση οφείλεται στο υπεροξείδιο του υδρογόνου (Kwakman et al 2010).

β) Με την προσθήκη πρωτεΐνάσης K μπορεί να προσδιοριστεί αν η αντιβακτηριακή δράση οφείλετε σε αντιβακτηριακές πρωτεΐνες ή ολιγοπεπτίδια του μελιού (Mundo et al 2004).

Ο προσδιορισμός του MIC έγινε όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη μέθοδο.

Για τις υγρές καλλιέργειες, το MIC ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα, στην οποία δεν ανιχνεύεται καμιά αύξηση, δηλαδή έχουμε 100% αναστολή της ανάπτυξης του υπό εξέταση οργανισμού (Sherlock et al 2010 ).

Για το ScanMIC, οι μικροπλάκες τοποθετήθηκαν σε *microplate reader* (*ELx808 Absorbance Microplate Reader, BioTek*), συνδεδεμένο με έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η μέτρηση έγινε στα 630 nm. Η ανάλυση των οπτικών απορροφήσεων των καλλιεργειών έγινε με το λογισμικό *Gen5™ Data Analysis Software* (Biotek).

#### 4.2.3.2. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται η καλλιέργεια των βακτηρίων χρησιμοποιώντας καλλιέργειες (glycerol stock) που διατηρούνται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Με μικροβιολογικό κρίκο και σε ασηπτικό περιβάλλον παίρνεται μια μικρή ποσότητα βακτηρίων από την καλλιέργεια stock και τοποθετείται σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα Mueller-Hinton άγαρ. Το τρυβλίο τοποθετείται σε επωαστήρα για 16 ώρες στους  $37^{\circ}\text{C}$ . Στην συνέχεια ακολουθεί υγρή καλλιέργεια με την απομόνωση από το τρυβλίο μιας αποικίας με την βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου και σε ασηπτικό περιβάλλον. Η ποσότητα αυτή των βακτηρίων τοποθετείται σε vial με θρεπτικό υπόστρωμα Luria-Bertani. Το vial τοποθετείται σε επωαστήρα υπό ανάδευση (*incubator shaker*) για 16 ώρες στους  $37^{\circ}\text{C}$  στις 210 στροφές.

Στη συνέχεια η καλλιέργεια αραιώνεται μέχρι την παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος (inoculum) θολερότητας ίση με 0,5 McFarland (περίπου  $10^8$  cfu/ml). Η μέτρηση οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm έγινε σε φασματοφωτόμετρο μέχρι να πετύχουμε τελική τιμή 0,132 που αντιστοιχεί σε 0,5 McFarland (περίπου  $1,5 \times 10^8$  cfu/ml).

Για κάθε ένα από τα 12 μέλια δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις (50% v/v, 25% v/v, 12,5% v/v, 6,25% v/v, 3,125% v/v, 1,5% v/v) για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης.

α) Καταλάση: Το stock καταλάσης (Paulus H.S. Kwakman et al 2010), (33.000 U/ml) έγινε με διάλυση 30mg σκόνη καταλάσης από συκώτι βοοειδούς (SERNA) σε 10 ml Phosphate buffer (pH 7.4). Στη συνέχεια, σε 1.5 ml μελιού αραιώσης 50% v/v (750 μl μέλι + 750 μl Muller Hinton Broth) προστέθηκαν 28 μl από το stock ώστε η τελική συγκέντρωση καταλάσης να είναι 600 U/ml. Τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα υπό ανάδευση (*incubator shaker*) για 16 ώρες στους  $37^{\circ}\text{C}$  στις 210 στροφές και στη συνέχεια έγιναν οι υπόλοιπες 6 διαδοχικές αραιώσεις.

β) Πρωτεΐνάση K: Για το stock πρωτεΐνάσης K συγκέντρωσης 10 mg/ml, έγινε διάλυση 10 mg από την πρωτεΐνάση K σε σκόνη (HT Biotechnology LTD) σε 1 ml απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την καταλάση. Σε 1.5 ml μελιού αραιώσης 50% v/v (750 μl μέλι + 750 μl Muller Hinton Broth) προστέθηκαν 15 μl πρωτεΐνάσης K σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml. Τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα υπό ανάδευση (*incubator shaker*) για 16 ώρες στους  $37^{\circ}\text{C}$  στις 210 στροφές και στη συνέχεια έγιναν οι 6 διαδοχικές αραιώσεις.



Η μικροπλακέτα τοποθετήθηκε στο *ELx808 Absorbance Microplate Reader* και έγινε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (*OD*) στα 630 nm ( $t=0$ ). Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν και καταγράφηκαν από το λογισμικό *Gen5™ Data Analysis Software*. Στη συνέχεια η μικροπλακέτα τοποθετήθηκε σε επωαστήρα (*incubator*) στους 37° C για 24hrs. Μετά από την επώαση των 24 ωρών έγινε ανάδευση με την πιπέτα και ακολούθησε μια δεύτερη ανάγνωση από το *Absorbance Microplate Reader* ( $t=24$ ).

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

Η *OD* για το κάθε πηγαδάκι προκύπτει από την αφαίρεση της μέτρησης για  $t=24$  μείον τη μέτρηση για  $t=0$ . (δηλ.  $OD_{\text{testwell}} = T_{24 \text{ test}} - T_{0 \text{ test}}$  και  $OD_{\text{of corresponding control well}} = T_{24 \text{ control}} - T_{0 \text{ control}}$ )

Η αναστολή της ανάπτυξης για το κάθε μέλι στο κάθε πηγαδάκι στην κάθε αραιώση υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τον τύπο

**100%ΑΝΑΣΤΟΛΗ =  $1 - (OD_{\text{testwell}} / OD_{\text{of corresponding control well}}) \times 100$**  (Thomas Patton και συν. 2005) για κάθε σειρά από το πιατάκι με τα 96 πηγαδάκια (π.χ. η *OD* τιμή της σειράς 1, στήλης 1, πηγαδάκι 1 (test) διαιρέθηκε με την *OD* τιμή της σειράς 1, στήλης 8, πηγαδάκι 8 (control)).

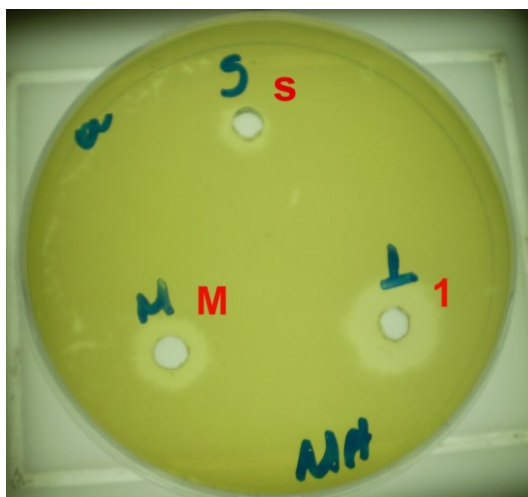
Από αυτό προέκυψαν 6 τιμές αναστολής για την κάθε αραιώση του μελιού.

Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν τουλάχιστον για το κάθε μέλι και για την κάθε συγκέντρωση.

## 5. Αποτελέσματα

### 5.1. Εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των μελιών μέσω της Μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (Well diffusion method)

Όλα τα δείγματα μελιών (12) εξετάστηκαν με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια.



Εικόνα 7: Φωτογραφία της μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (well diffusion method). M: το μέλι manuka (θετικό control), S: το συνθετικό μέλι (αρνητικό control), 1: το μέλι προς εξέταση (στην συγκεκριμένη φωτογραφία το μέλι 1)



Εικόνα 8: Φωτογραφία της μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (well diffusion method). M: το μέλι manuka (θετικό control), S: το συνθετικό

μέλι (αρνητικό control), 2: το μέλι προς εξέταση (στην συγκεκριμένη φωτογραφία το μέλι 10)

<i>Μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (Well diffusion method)</i>		
<b>ΜΕΛΙ</b>	Διάμετρος ζώνης αναστολής (mm)	Διάμετρος ζώνης αναστολής (mm) Manuka 25+
<b>1</b>	<b>18±1</b>	<b>12±0</b>
<b>2</b>	<b>14±1</b>	<b>13±0</b>
<b>3</b>	<b>14±2</b>	<b>12±1</b>
<b>4</b>	<b>16±1</b>	<b>13±1</b>
<b>5</b>	<b>16±1</b>	<b>13±0</b>
<b>6</b>	<b>15±1</b>	<b>14±1</b>
<b>7</b>	<b>16±2</b>	<b>13±2</b>
<b>8</b>	<b>16±1</b>	<b>14±1</b>
<b>9</b>	<b>14±2</b>	<b>9±0</b>
<b>10</b>	<b>16±1</b>	<b>14±0</b>
<b>11</b>	<b>13±1</b>	<b>7±5</b>
<b>12</b>	<b>15±2</b>	<b>8±1</b>

5.2. Προσδιορισμός της αντιμικροβιακής ικανότητας των δειγμάτων μελιού μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (minimum inhibitory concentration) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (microtiter plates).

ΜΕΛΙ	MIC <i>P. Aeruginosa</i>	MIC MANUKA
1	12,5 % v/v	12,5 % v/v
2	12,5 % v/v	12,5 % v/v
3	12,5 % v/v	12,5 % v/v
4	12,5 % v/v	12,5 % v/v
5	12,5 % v/v	12,5 % v/v
6	12,5 % v/v	12,5 % v/v
7	12,5 % v/v	12,5 % v/v
8	6,25 % v/v	12,5 % v/v
9	12,5 % v/v	12,5 % v/v
10	6,25 % v/v	12,5 % v/v
11	12,5 % v/v	12,5 % v/v
12	6,25 % v/v	12,5 % v/v

**5.3. Προσδιορισμός των μηχανισμών δράσης της αντιμικροβιακής ικανότητας των δειγμάτων μελιού με τον καθορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*minimum inhibitory concentration*) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (*microtiter plates*) μετά την προσθήκη α) καταλάσης β) πρωτεΐνης K.**

Με τη μέθοδο της μικροτιτλοποίησης προσδιορίσαμε την ελάχιστη συγκέντρωση των μελιών που απαιτείται για την αναστολή της ανάπτυξης της *P.aeruginosa* α) με την προσθήκη καταλάσης, β) με την προσθήκη πρωτεΐνης K. Τα μέλια εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις των 1,5% v/v, 3,125% v/v, 6,25% v/v, 12,5% v/v, 25% v/v, 50% v/v αντίστοιχα.

ΜΕΛΙ	MIC PSEUDO	MIC ME ΚΑΤΑΛΑΣΗ	MIC ME ΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗ
1	12,5% v/v	25% v/v	12,5% v/v
2	12,5% v/v	25% v/v	12,5% v/v
3	12,5% v/v	25% v/v	12,5% v/v
4	12,5% v/v	25% v/v	12,5% v/v
5	12,5% v/v	25% v/v	12,5% v/v
6	12,5% v/v	25% v/v	12,5% v/v
7	12,5% v/v	25% v/v	12,5% v/v
8	6,25% v/v	25% v/v	12,5% v/v
9	12,5% v/v	25% v/v	12,5% v/v
10	6,25% v/v	25% v/v	12,5% v/v
11	12,5% v/v	25% v/v	12,5% v/v
12	6,25% v/v	25% v/v	12,5% v/v

#### 4. Συζήτηση

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

Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού οφείλεται στο υπεροξείδιο του υδρογόνου, το χαμηλό pH, την υψηλή συγκέντρωση σακχάρων καθώς και σε φυτοχημικές και πρωτεϊνικές ενώσεις (Nasir et al 2010, Mundo et al 2004, Moloi P. 1998, Pieper B. 2009). Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού εξαρτάται από τη φυτική πηγή από την οποία προέρχεται, από τη γεωγραφική περιοχή της φυτικής πηγής, τις περιβαλλοντικές συνθήκες, οι οποίες επηρεάζουν τη φυτική πηγή. Καθώς επίσης και από παράγοντες που επηρεάζουν το μέλισσι, όπως η κατάσταση της υγείας του και η ηλικία του και τέλος παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή ή τη δράση της οξειδάσης της γλυκόζης (Ohashi et al 2000, Mattila et al. 2006, Yang et al 2005). Το μέλι Manuka από τη Ν. Ζηλανδία έχει εγκριθεί για ιατρική χρήση σε επουλώσεις πληγών και ελκών λόγω της ισχυρής αντιμικροβιακής του δράσης. Χρησιμοποιείται επίσης και για εσωτερική χρήση διότι βοηθάει στη θεραπεία της γαντρεντερίτιδας και της δυσπεψίας. Είναι αποτελεσματικό έναντι βακτηρίων όπως *Pseudomonas aeruginosa* (Cooper et al 1999), *Staphylococcus aureus* (Cooper et al 1999, Allen et al 2000), *Helicobacter Pylori* (Al Somai et al 1994), *Bacillus subtilis* κ.α. Η μονάδα μέτρησης UMF κατηγοριοποιεί το μέλι Manuka με βάση την αντιβακτηριακή του δράση. Μέλι Manuka με UMF μεγαλύτερο του 10 θεωρείται ότι είναι κατάλληλο για θεραπευτική ιατρική χρήση. Η κύρια δραστική ουσία του Manuka είναι η μεθυλγλυοξάλη (MGO) μια αλδεΐδη η οποία ανιχνεύεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο μέλι και πλέον αναγράφεται στις συσκευασίες του μελιού ως MGO. Παραδείγματος χάρι MGO 550 σημαίνει ότι 550 mg μεθυλγλυοξάλης περιέχονται σε 1 κιλό μελιού.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εκτίμηση της αντιβακτηριακής δράσης μελιών της περιοχής του Ολύμπου έναντι Gram αρνητικών (*Pseudomonas aeruginosa*) βακτηρίων καθώς και η διερεύνηση των μηχανισμών που συμβάλλουν σε αυτή. Για την εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράση των μελιών χρησιμοποιήθηκαν 2 *in vitro* μέθοδοι: α) η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ

με πηγαδάκια “(wells diffusion method)” και η χρήση πλακών μικροτιλοποίησης (*microtiter plates*) για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*minimum inhibitory concentration*). Για την διερεύνηση των μηχανισμών της αντιμικροβιακής δράσης των μελιών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*minimum inhibitory concentration* με τη χρήση πλακών μικροτιλοποίησης” (*microtiter plates*) μετά την προσθήκη α) καταλάσης, η οποία υποδεικνύει ότι το υπεροξειδίο του υδρογόνου συμβάλει στην αντιβακτηριακή δράση, β) πρωτεΐνης K, η οποία υποδεικνύει ότι πρωτεΐνες ή ολιγοπεπτίδια που υπάρχουν στο μέλι συμβάλλουν στην αντιβακτηριακή του δράση. Και οι δύο μέθοδοι στηρίζονται στην ικανότητα των μελιών να αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων.

Αντιβακτηριακή δράση έναντι της *P.aeruginosa* έδειξαν όλα τα μέλια με τη μέθοδο της διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια. Με τη μέθοδο προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης 3 από τα 12 μέλια έδωσαν μικρότερο MIC (6,25% v/v) σε σχέση με το Manuka 25+ (MIC 12,5% v/v). Συγκεκριμένα τα μέλια με νούμερο 8, 10, 12 εμφανίζουν μεγάλη διαφορά σε σύγκριση με το Manuka. Αναφορικά με τους μηχανισμούς δράσης φαίνεται ότι σε αυτά τα μέλια σημαντικό ρόλο παίζει το υπεροξειδίο του υδρογόνου γιατί μετά την προσθήκη καταλάσης το MIC από 6,25% v/v αυξήθηκε σε 25% v/v. Επίσης, μετά την προσθήκη πρωτεΐνης K στα ίδια μέλια το MIC αυξάνεται από 6,25% v/v σε 12,5% v/v, αυτό σημαίνει ότι πρωτεΐνες ή ολιγοπεπτίδια που υπάρχουν στο μέλι συμβάλλουν στην αντιβακτηριακή του δράση.

Σημαντικό ρόλο στην αντιβακτηριακή δράση πρωτεϊνών και ολιγοπεπτιδίων που περιέχονται στο μέλι παίζει η bee-defensin-1 πρωτεΐνη, η οποία εκκρίνεται στο μέλι από τους υποφαρυγγικούς αδένες τις μέλισσας (Kwakman et al 2010). Η αντιβακτηριακή δράση μπορεί να οφείλεται και σε πρωτεΐνες ή ολιγοπεπτίδια που παράγονται από συμβιωτικά βακτήρια της μέλισσας και μεταφέρονται στο μέλι μέσω της πεπτικής οδού (Snowdon et al 1996) καθώς επίσης και από βακτήρια που υπάρχουν στο μέλι και μπορεί να μεταφέρθηκαν σε αυτό από την κυψέλη, τη γύρη (Gillian et al 1983), το έδαφος (Snowdon et al 1996) κ.α.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αποτελούν την βάση για περαιτέρω έρευνα όσον αφορά α) την εκτίμηση της αντιβακτηριακής δράσης των μελιών της περιοχής του Ολύμπου έναντι και άλλων βακτηρίων κλινικής σημασίας

όπως το *Acinetobacter baumannii*, *Helicobacter pylori* και παθογόνων βακτηρίων που εμπλέκονται σε τροφικές δηλητηριάσεις όπως η *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* κ.α. β) Τον προσδιορισμό και άλλων μηχανισμών αντιβακτηριακής δράσης που υπάρχουν στα μέλια, για παράδειγμα MGO, φαινολικών ενώσεων και φλαβονοειδών. γ) Επίσης θα πρέπει να μελετηθεί η επαναληψιμότητα της αντιβακτηριακής δράσης των μελιών από χρονιά σε χρονιά και από παραγωγή σε παραγωγή, τέλος δ) να διερευνηθεί ποια είναι η επίδραση των μελιών με ισχυρή αντιβακτηριακή δράση στη φυσιολογία των βακτηρίων που έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης τους (ποια γονίδια επάγονται ή καταστέλλονται) με τη χρήση RNA-sequencing ώστε να προσδιοριστούν και πιθανοί κυτταρικοί στόχοι.



## 5. Βιβλιογραφία

- **Al Somai N, Coley KE, Molan PC, Hancock BM** , 1994 *Susceptibility of Helicobacter pylori to the antibacterial activity of manuka honey. J. R. Soc. Med.* 87 (1) 9-12.
- **Allen KL, Molan PC, Reid GM** 1991 *A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. J Pharm Pharmacol* 43: 817–822
- **Anthimidou E, Mossialos D** 2012 *Antibacterial Activity of Greek and Cypriot Honeys Against Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa in Comparison to Manuka Honey Journal of medicinal food J Med Food XX (X) 201X, 1–6*
- **Brennan SS, Leaper D** (1985) *The effect of antiseptics on the healing wound: a study using the rabbit ear chamber. Br J. Surg* 72 (10): 780-782
- **Cooper RA** (2007) *Honey in wound care: antibacterial properties GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär 2007, Vol. 2(2)*
- **Cooper RA, Jenkins L, Henriques AFM, Duggan RS, Burton NF** (2010) *Absence of bacterial resistance to medical-grade manuka honey European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 29, 10 (2010) 1237-1241
- **Cooper RA, Molan PC**, 1999 *The use of honey as an antiseptic in managing Pseudomonas infection. J. Wound Care* 8 (4) 161-164
- **Cooper RA, Molan PC, Harding KG** (1999) *Bactericidal activity of different types of honey against clinical and environmental isolates of Pseudomonas aeruginosa J R Soc Med* 1999 92: 283
- **Cooper RA, Molan PC, Harding KG**, 1999. *Antibacterial activity of honey against strains of Staphylococcus aureus from infected wounds. Journal of Royal Society of Medicine* 92, 283– 285
- **Cooper RA, Molan PC, Harding KG**, 2002 *The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. Journal of Applied Microbiology τόμος 93 (5):857-863*
- **Davies J** (1996) *Bacteria on the rampage. Nature* 383: 219-220
- **Filius PMG, Gyssens IC** (2002) *Impact of increasing antimicrobial resistance on wound management. Am J Clin Dermatol* 3: 1-7

- **Forrest RD** (1982) *Early history of wound treatment. J Roy Soc Med* 75: 290-198-205
- **Gomez-Caravaca AM, Gomez-Romero M, Arraez-Roman D, Segura-Carretero A, Gutierrez F**, 2006 *advances A in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis.* 2006; 41:1220–1234
- **Hern TT, Abdul RR, Gan SH, Halim AS, Hassan SA, Sulaiman SA, and Kirnpal-Kaur BS**, 2009 *The antibacterial properties of Malaysian tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to manuka honey* 15;9:34
- **Hugo WB** (1991) *A brief history of heat and chemical preservative and disinfection. J Appl Bacteriol* 71: 9-18
- **Janmaat AF, Winston ML, Ydenberg RC**, 2000 *Condition-dependent response to changes in pollen stores by honey bee (Apis mellifera) colonies with different parasitic loads. Behav Ecol Sociobiol* 47:171–179
- **Kwakman PHS, Van den Akker JPC, Guclu A, Aslami H, Binnekade JM, et al.**, 2008 *Medical-grade honey kills antibiotic-resistant bacteria in vitro and eradicates skin colonization. Clin Infect Dis* 46: 1677–1682
- **Mattila HR, Otis GW**, 2006 *Effects of pollen availability and Nosema infection during the spring on division of labor and survival of worker honey bees (Hymenoptera: Apidae). Environ Entomol.* 35:708–717
- **Moellering RC** (1995) *Past, present, and future of antimicrobial agents. The Am J Med* 99 (suppl 6A):11S -18S
- **Molan PC**. 1992 *The antibacterial activity of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. Bee World* 1992; 73:5-28
- **Mullai V, Menon T** 2007 *Bactericidal Activity of Different Types of Honey Against Clinical and Environmental Isolates of Pseudomonas aeruginosa The journal of alternative and complementary medicine Volume 13, Number 4, 2007, pp. 439–441*
- **Mundo MA, Padilla-Zakour OI, Worobo RW**, 2004 *Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys, Cornell University, USA* 97(1):1-8
- **Patton T, Barrett J, Brennan J, Moran N**, 2006 *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

- **Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, Pompliano DL** (2007) *Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. Nat Rev Drug Discov* 6: 29-40
- **Russell AD** (2002) *Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. J Appl Microbiol* 92 Suppl: 121S-35S
- **Sherlock O, Dolan A, Athman R, Power A, Gethin G, Cowman S, Humphreys H**, 2010 *Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa, BMC Complementary and Alternative Medicine* 2010, 10:47
- **Snowdon JA, Cliver DO**, 1996 *Microorganisms in honey, International Journal of Food Microbiology* 31: 1-26
- **White J.W. Jr**, 1993 *Honey, in the hive and the honey bee, Dadant and Sons Publication Hamilton- Illinois* p.p. 869-895
- **Wilkinson JM, Cavanagh HMA** *Antibacterial Activity of 13 Honeys Against Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa Journal of medicinal food J Med Food* 8 (1) 2005, 000–000
- **Willix DJ, Molan PC, Harfoot CJ**. *A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of manuka honey and other honey. J Appl Bacteriol* 1992;73:388-94
- **Yang X, Cox-Foster DL**, 2005 *Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. Proc Natl Acad Science USA.* 102:7470–7475
- **Zander E., Maurizio A.**, 1975 *Handbuch der Bienenkunde 6 Der Honig Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer*
- **Καϊλίδης Σ.Δ.**, 1965 *Monophlebus hellenicus (Marchalina hellenica) Genn, Το μελισσοτροφικό έντομο της πεύκης, Δασικά χρονικά* 81/82 (7-8): 1-16
- **Νικολόπουλος Ν. Χρίστος**, 1965 *Μορφολογία και βιολογία του είδους Marchalina hellenica (Gennadius), Έκδοση της Ανώτατης Γεωπονικής Σχολής Αθηνών* pg..32

- **Τυπάλδος – Ξυδιάς Α, 1979** *Θάσος και Κασσάνδρα: οι μεγαλύτερες μελισσοκομικές περιφέρειες της Ελλάδας, Μελισσοκομική Ελλάς (29): 105-111*

### ***Ιστότοποι:***

- [www.apistherapy.blogspot.gr](http://www.apistherapy.blogspot.gr)
- [www.bee2bee.gr](http://www.bee2bee.gr)
- [www.el.wikipedia.org](http://www.el.wikipedia.org)
- [www.geaolympou.gr](http://www.geaolympou.gr)
- [www.healthnotesandnews.blogspot.gr](http://www.healthnotesandnews.blogspot.gr)
- [www.honeycentre.com](http://www.honeycentre.com)
- [www.kynigos.net.gr](http://www.kynigos.net.gr)
- [www.melifotopoulos.gr](http://www.melifotopoulos.gr)
- [www.melisokomiki.eu](http://www.melisokomiki.eu)
- [www.melissoktima.blogspot.gr](http://www.melissoktima.blogspot.gr)
- [www.melissomania.gr](http://www.melissomania.gr)
- [www.nefeli.lib.teicrete.gr](http://www.nefeli.lib.teicrete.gr)
- [www.neogen.com](http://www.neogen.com)
- [www.omse.gr](http://www.omse.gr)
- [www.ray4goodkarma.wordpress.com](http://www.ray4goodkarma.wordpress.com)
- [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)
- [www.users.uoa.gr](http://www.users.uoa.gr)
- [www.webmd.com](http://www.webmd.com)
- [www.xmbeekeeping.eu](http://www.xmbeekeeping.eu)