

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



**«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ - ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

**Τζήκα Παρασκευή**

**«ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ  
(VIRULENCE FACTORS) ΤΗΣ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ΠΑΡΟΥΣΙΑ  
ΜΕΛΙΩΝ ΟΛΥΜΠΙΟΥ»**



**Λάρισα, 2015**

Αναστολή της παραγωγής μολυσματικών παραγόντων (virulence factors)  
της *Pseudomonas aeruginosa* παρουσία μελιών Ολύμπου

**Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:**

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

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

**Αμούτζιας Γρηγόρης:** Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενομική του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## Ευχαριστίες

Το θέμα της Μεταπτυχιακής μου διατριβής προτάθηκε από τον επίκουρο Καθηγητή Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Μόσιαλο Δημήτρη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Δημήτρη Μόσιαλο, για τη συνεχή βοήθεια, καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του, οι οποίες και συνετέλεσαν στην ολοκλήρωση της πτυχιακής αυτής διατριβής.

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

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου και όλη την ομάδα του εργαστηρίου Βακτηριολογίας-Ιολογίας για την άριστη συνεργασία, την βοήθεια, για την απaráμιλλη ηθική συμπαράσταση και το φιλικό κλίμα.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου, που με στήριξε από την αρχή μέχρι το τέλος, σε όλο αυτό το δύσκολο ταξίδι, με αγάπη, κατανόηση και λοιπούς δυνατούς τρόπους.

2015

Τζήκα Παρασκευή

Περίληψη .....	7
Abstract.....	9
I.....	ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
.....	10
1. Τι είναι μέλι.....	10
1.1 Σύσταση και Διατροφική αξία του μελιού.....	11
1.2 Ευεργετικές επιδράσεις στον άνθρωπο .....	13
1.3 Τα είδη του ελληνικού μελιού .....	15
1.3.1 Μέλι πεύκου .....	15
1.3.2 Μέλι ελάτης .....	16
1.3.3 Μέλι καστανιάς.....	16
1.3.4 Θυμαρίσιο μέλι .....	17
1.3.5 Ρεικίσιο μέλι .....	17
1.3.6 Μέλι κουμαριάς .....	17
1.3.7 Μέλι Ροδόδενδρου .....	17
1.3.8 Μέλι Ηλίανθου.....	18
1.3.9 Μέλι βαμβακιού.....	18
1.3.10 Μέλι εσπεριδοειδών .....	18
1.4 Αντιμικροβιακές-αντιβακτηριακές ιδιότητες του μελιού.....	19
1.5 Μέλι Manuka και άλλα αντιβακτηριακά μέλια .....	21
1.6 <i>P. aeruginosa</i> .....	23
1.6.1 Πρωτεάσες.....	25
1.6.2 Πυοκυανίνη.....	26
1.6.3 Σιδηροφόρα.....	27
1.6.4 Κινητικότητα –Motility.....	28
1.7 Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	30
II.....	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
.....	31
Υλικά και Μέθοδοι.....	31
2.1 Υλικά .....	31
2.1.1 Δείγματα μελιού από την περιοχή του Ολύμπου.....	31
2.1.2 Manuka .....	33
2.1.3 Συνθετικό μέλι .....	33
2.1.4 Γάλα .....	33
2.1.5 Θρεπτικά υποστρώματα .....	33
2.1.5 Όργανα και αναλώσιμα: .....	34
2.1.5 Αναλώσιμα .....	34

2.1.6 Βακτηριακό στέλεχος :	34
2.2 Μέθοδοι.....	35
2.2.1. Προετοιμασία καλλιέργειας <i>P. aeruginosa</i> .....	35
2.2.2. Έλεγχος της επίδρασης των μελιών στην πρωτεόλυση που προκαλεί η <i>P. aeruginosa</i> .....	35
2.2.3. Έλεγχος της επίδρασης των μελιών στην παραγωγή πυοβερδίνης από την <i>P. aeruginosa</i> .....	35
2.2.4. Έλεγχος της επίδρασης των μελιών στην παραγωγή πυοκυανίνης από <i>P. aeruginosa</i> .....	36
2.2.5 Κινητικότητα Βακτηρίων-Δοκιμή κολύμβησης (Swimming Assay) .....	37
3. Αποτελέσματα .....	37
3.1 Αποτελέσματα της επίδρασης της παρουσίας των μελιών στην πρωτεόλυση που προκαλεί η <i>P. aeruginosa</i> .....	37
3.2 Αποτελέσματα της επίδρασης των μελιών στην παραγωγή πυοβερδίνης από την <i>P. aeruginosa</i> .....	39
3.3 Αποτελέσματα της επίδρασης των μελιών στην παραγωγή πυοκυανίνης από την <i>P. aeruginosa</i> .....	42
3.4 Αποτελέσματα επίδρασης παρουσία μελιών του Ολύμπου στην κινητικότητα της <i>P. aeruginosa</i> .....	44
4. Συμπεράσματα-Συζήτηση.....	47
5. Βιβλιογραφία.....	50

## Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, παθογόνα για τον άνθρωπο βακτήρια, όπως η *Pseudomonas aeruginosa*, έχουν αποκτήσει ανθεκτικότητα στα περισσότερα υπάρχοντα αντιβιοτικά. Η *P. aeruginosa* εκμεταλλεζόμενη ευνοϊκές για αυτή συνθήκες, προκαλεί λοιμώξεις που δύσκολα αντιμετωπίζονται, όπως ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις, σε άτομα με εκτεταμένα εγκαύματα ή ασθενείς με κυστική ίνωση.

Η *P. aeruginosa* οφείλει τη ανθεκτικότητά της κυρίως στην ικανότητά της να σχηματίζει βιοφίλμ, στην ύπαρξη αντλιών εκροής και την παραγωγή β-μεταλλο λακταμασών. Αναζητώντας λοιπόν οι επιστήμονες εναλλακτικές θεραπείες, ανακαλούν και ερευνούν φυσικές πηγές θεραπειών όπως το μέλι με εμφανή θεραπευτικά αποτελέσματα από τα αρχαία χρόνια.

Για την εξυπηρέτηση αυτού του σκοπού, ξεκίνησε η μελέτη των *in vitro* ιδιοτήτων του έναντι σε παθογόνα βακτήρια όπως η *P. aeruginosa*. Τα αποτελέσματα ήταν πολύ ενθαρρυντικά, καθώς το μέλι εμφάνισε έντονη βακτηριοκτόνο δράση ενάντια στο βακτήριο αυτό. Υπεύθυνοι παράγοντες για τη δράση αυτή ταυτοποιήθηκαν ότι είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το χαμηλό pH, η υψηλή όσμωση, η μεθυλγλυοξάλη και το πεπτίδιο bee defensin-1. Παράλληλα διαπιστώθηκε ότι με την επίδραση του μελιού αναστέλλεται και η παραγωγή μολυσματικών παραγόντων από παθογόνα βακτήρια, όπως η *P. aeruginosa*.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να μελετηθεί εάν και κατά πόσο τα μέλια του Ολύμπου, αναστέλλουν τους παράγοντες αυτούς, σε σύγκριση με το μέλι Manuka και ένα συνθετικό μέλι, αποτελούμενο μόνο από τα κύρια σάκχαρα του μελιού.

Μελετήθηκε λοιπόν η αναστολή πρωτεασών παρουσία των μελιών και διαπιστώθηκε ότι τα μέλια του Ολύμπου εμφάνισαν πολύ καλή ανασταλτική δράση και είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι τα 3 από τα 21 δείγματα μελιών του Ολύμπου εμφάνισαν μεγαλύτερη αναστολή πρωτεασών συγκριτικά με το μέλι Manuka. Αντίθετα, το συνθετικό μέλι, έδειξε ελάχιστη έως καθόλου ανασταλτική δράση.

Επιπλέον, μελετήθηκε η αναστολή της πυοβερδίνης, του κύριου σιδηροφόρου που παράγει η *P. aeruginosa* και βρέθηκε ότι η πλειοψηφία των μελιών, εμφάνισε ανασταλτική δράση και μάλιστα 4 μέλια του Ολύμπου εμφάνισαν μεγαλύτερη από ότι το μέλι Manuka, του οποίου η δράση ήταν πολύ μικρή. Αντίθετα, το συνθετικό μέλι και 4 από τα δείγματα μελιών του Ολύμπου ευνόησαν την παραγωγή πυοβερδίνης.

Επιπρόσθετα μελετήθηκε η αναστολή της πυοκυανίνης, μιας χρωστικής που επάγει την μολυσματικότητα της *P. aeruginosa*, όπου τα περισσότερα μέλια εμφάνισαν ανασταλτική δράση. Αξιοσημείωτη ήταν η δράση του Manuka και αρκετών δειγμάτων των μελιών του Ολύμπου. Καλύτερα αποτελέσματα από το Manuka παρουσίασαν 2 μέλια του Ολύμπου. Ένα μόνο μέλι ευνόησε την παραγωγή της πυοκυανίνης και το συνθετικό μέλι έδειξε πολύ καλή ανασταλτική δράση στο μολυσματικό αυτό παράγοντα.

Τέλος, ερευνήθηκε ένας από τους τύπους κινητικότητας (swimming essay), που ευθύνεται για την ικανότητα προσκόλλησης και αποικισμού και επομένως συμβάλει στην πρόκληση μολυσματικότητας από *P. aeruginosa*. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση των μελιών του Ολύμπου σε αυτή, σε σύγκριση με την επίδραση του Manuka και του συνθετικού μελιού και διαπιστώθηκε ότι όλα τα μέλια του Ολύμπου εμφάνισαν μεγαλύτερη ανασταλτική δράση από το μέλι Manuka. Το συνθετικό μέλι δεν φάνηκε να επηρεάζει την κινητικότητα της *P. aeruginosa*.

Συμπερασματικά, τα μέλια εκτός από αντιμικροβιακή δράση εμφανίζουν και καλή αναστολή των μολυσματικών παραγόντων της *P. aeruginosa* και δη αρκετά από τα μέλια του Ολύμπου εμφάνισαν καλύτερη ανασταλτική δράση σε σύγκριση με το διεθνώς αναγνωρισμένο μέλι Manuka. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν ενθαρρυντικά δεδομένα για την ιατρική χρήση του μελιού.



## Abstract

Recently, many pathogenic to human bacteria like *P. aeruginosa*, have obtained resistance to the present antibiotics. By taking advantage of any favorable environment, *P. aeruginosa* causes infections that are difficult to confront, like hospital-acquired infections in patients with extensive and deep burns or patients with cystic fibrosis.

*P. aeruginosa* is such a resistant bacterium, since it is capable to form biofilms and due to the existence of efflux pumps and the production of metallo-beta-lactamases. As the scientists are seeking for new alternative remedies, they recall and search for natural sources of treatments, as the honey that is obviously a product with excellent therapeutic results, since ancient times. A research of the in vitro activity of honey started, in order to achieve this goal, hence, to evaluate and measure the therapeutic impact of honey.

The results were really promising, since the honey played a really intense anti-bacteria role against the bacteria we test. The hydrogen peroxide, the low pH, the high osmosis, the Methylglyoxal and the peptide bee defensin-1 appeared to be the responsible factors of these anti-bacteria activities. On the same time, it was noted that the presence of honey prohibits the production of infectious characteristics that bacteria like *P. aeruginosa* have.

The aim of the present study was to test if and at which level, the Olympus honey is capable to inhibit these bacteria factors, comparing with the Manuka honey and a synthetic one (it has the major honeys sugars). Therefore, the inhibition of the proteases was investigated and it was found that 3 out of the 21 honeys of Olympus showed a remarkably larger inhibition effect than Manuka. On the other hand, synthetic honey showed very small to none inhibition action.

In addition, the inhibition of the pyoverdine was investigated, as pyoverdine is the major siderophore that *P. aeruginosa* produces, and it was found that all the honeys showed an high-level inhibition effect, specifically, four of them showed stronger inhibition than Manuka honey. On the other hand, four of the Olympus honeys and the synthetic one influenced positively the production of pyoverdine.

Furthermore, the inhibition effect on pyocyanin was investigated, as it is a coloring factor that assists the infectiveness of *P. aeruginosa* and the majority of honey samples had an inhibitory effect. Surprisingly, the Manuka honey results were similar with plenty Olympus honey samples results. No more than one honey type favored the production of pyocyanin, while the synthetic honey sample showed a great inhibitory affect against this infective factor.

Finally, the swimming ability was tested, as it is one of the mobility ways of bacteria that is responsible of the attachment, the colonization and consequently with swimming the infection become easier. The effect of the Olympus honey samples on the swimming essay, was an important part of the research, especially while it was compared with the Manuka and synthetic honey results. The Olympus honey samples achieved better results rather than Manuka one, while the synthetic one does not affect the bacteria mobility at all.

To summarize, honey is characterized of an antimicrobial effect but apart from that it offers us a fine inhibition against the virulence factors of *P. aeruginosa*, and furthermore, the majority of the Olympus honey samples really surpassed the globally recognized Manuka honey. These results could not be something less than optimistic and encouraging data for the utilization of the honey for medical purposes.

## I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. Τι είναι μέλι

Σύμφωνα με την Κοινοτική Οδηγία 2014/63 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, μέλι είναι η φυσική γλυκιά ουσία που παράγουν οι μέλισσες του είδους *Apis mellifera* από το νέκταρ των φυτών ή από εκκρίσεις ζώντων μερών φυτών ή εκκρίματα εντόμων απομυζούντων φυτά ευρισκόμενα πάνω στα ζώντα μέρη των φυτών, τα οποία οι μέλισσες συλλέγουν, μετατρέπουν αναμιγνύοντας με ειδικές ύλες του σώματός τους, αποθέτουν, αφυδατώνουν, εναποθηκεύουν και φυλάσσουν στις κηρήθρες της κυψέλης, προκειμένου να ωριμάσουν. Οι απαιτήσεις αυτές συνάδουν και με το πρότυπο του Codex Alimentarius για το μέλι (Codex Stan 12-1981). Όταν το νέκταρ εισέλθει στο στομάχι της μέλισσας, σταδιακά μετατρέπεται σε μέλι. Τα ένζυμα από τους αδένες της κεφαλής που ονομάζονται διαστάσες-ιμπερτάσες και ένζυμα από το θωρακικό αδέν (οξειδάση της γλυκόζης) αναμιγνύονται με το νέκταρ με σκοπό το σχηματισμό της γεύσης και του αρώματος του μελιού (Abdullah and Clemencia, 2009).



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

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

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

### 1.1 Σύσταση και Διατροφική αξία του μελιού



Η σύνθεση του μελιού ποικίλει ανάλογα με τα φυτικά είδη από τα οποία οι μέλισσες τρέφονται, αλλά τα κύρια συστατικά είναι ίδια σε όλα τα μέλια. Αποτελείται κυρίως από υδατάνθρακες, από τους οποίους η γλυκόζη και η φρουκτόζη βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (Abdullah Adiland Clemencia, 2009). Η συνολική ποσότητα των σακχάρων είναι περίπου 80% (Φρουκτόζη: 38,2%, Γλυκόζη: 31,3%, Μαλτόζη: 7,1%, Σουκρόζη: 1,3%) και <18% νερό (περίπου 17,2%) (USDA, 2015), συνδυασμός που προκαλεί ισχυρό οσμωτικό στρες και δεν επιτρέπει την αλλοίωση του μελιού από μικροοργανισμούς (Kwakman, 2012). Οι οξειδάσες της γλυκόζης που περιέχονται στο μέλι, όταν έρχονται σε επαφή με το νερό, παράγουν υπεροξείδιο του υδρογόνου, ένα ήπιο αντισηπτικό (Abdullah and Clemencia, 2009).

Επιπρόσθετα, το μέλι περιέχει αντιοξειδωτικά (όπως οι πολυφαινόλες) τα οποία σχετίζονται με την εμφάνιση και τις λειτουργικές ιδιότητες του μελιού. Το ενδιαφέρον για αυτές τις ενώσεις συνεχώς αυξάνεται διότι δυνητικά χρησιμεύουν σαν βιοχημικοί δείκτες για την επικύρωση γεωγραφικών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων. Επίσης, το μέλι περιέχει τρεις κύριες φαινολικές ουσίες (βενζοϊκό οξύ, κινναμωμικά οξέα και φλαβονοειδή). Τα φλαβονοειδή είναι τα πιο συχνά απαντώμενα σε μέλια ανθέων και η συγκέντρωσή τους στο μέλι είναι περίπου 20 mg/kg (Alvarez-Suarez et al., 2010).

Η περιεκτικότητα σε μεταλλικά στοιχεία και βιταμίνες είναι πολύ χαμηλή (περίπου 0,02% του βάρους) και έτσι η κατανάλωση του μελιού δεν έχει σημαντική θρεπτική αξία για τον άνθρωπο (Abdullah and Clemencia, 2009). Ημερήσια δόση 20 g μελιού καλύπτει περίπου το 3% των απαιτούμενων ημερήσιων ενεργειακών αναγκών (Alvarez –Suarez et al., 2010).

Από τα συστατικά του μελιού τα σάκχαρα αφομοιώνονται γρήγορα από τον οργανισμό ως άμεση πηγή ενέργειας. Συγκριτικά με την κοινή ζάχαρη εμπορίου παρουσιάζουν την εξής διαφορά η οποία είναι πάρα πολύ σημαντική για την υγεία μας: Η φρουκτόζη του μελιού απορροφάται στο αίμα με ενεργητική απορρόφηση (active transport), δηλαδή μεταφορείς που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων των λαχνών του εντερικού σωλήνα, συλλαμβάνουν τα μόρια της φρουκτόζης και τα μεταφέρουν μέσα στα κύτταρα, τα αφήνουν και επιστρέφουν για να πάρουν άλλα. Έτσι, η ταχύτητα απορρόφησης της φρουκτόζης καθορίζεται βασικά από την διαθεσιμότητα χημικού μεταφορέα, γίνεται με βραδύτερο ρυθμό και δεν προκαλεί υπερδιέγερση για την παραγωγή ινσουλίνης. Αντίθετα, η απορρόφηση της κοινής ζάχαρης μετά την πέψη της, γίνεται μέσω ώσμωσης. Αυτό σημαίνει ότι η γλυκόζη εισέρχεται με ταχύτητα και υψηλή συγκέντρωση στη ροή του αίματος, ο οργανισμός «φορτώνεται» ξαφνικά και αυτό προκαλεί την άμεση παραγωγή ινσουλίνης από το πάγκρεας για το καύσιμο των ζαχάρων.

Παράλληλα η υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, λόγω κατανάλωσης ζάχαρης, έχει σαν αποτέλεσμα την επιτάχυνση του μηχανισμού της γλυκοζυλίωσης, δηλαδή τη δημιουργία συμπλόκων γλυκόζης και πρωτεϊνών. Τα σύμπλοκα αυτά, στη συνέχεια καθιζάνουν στα αγγεία του ανθρώπινου σώματος δημιουργώντας σκληρύνσεις. Η σκλήρυνση αυτή γνωστή ως αρτηριοσκλήρυνση, είναι αιτία για πολλά προβλήματα υγείας, όπως εγκεφαλικά επεισόδια, καρδιακές προσβολές, στηθάγχη, άτονα έλκη, άνοια και άλλα.

Τα μεταλλικά στοιχεία του μελιού συμμετέχουν στη λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών. Το κάλιο παίζει και ρόλο καταλύτη στη φωσφορυλίωση της γλυκόζης. Το ασβέστιο είναι απαραίτητο για τα οστά, για τα δόντια και τη πήξη του αίματος. Το χλώριο και το νάτριο ρυθμίζουν τις οσμωτικές ιδιότητες του αίματος και των υγρών του σώματος. Το μαγνήσιο υπάρχει στους μύς, τα οστά και το πλάσμα και δρα σαν καταλύτης.

Τα ιχνοστοιχεία του μελιού είναι απαραίτητα συμπληρωματικά στοιχεία για τον υγιή άνθρωπο. Στο μέλι μέχρι στιγμής έχουν ανιχνευτεί 4 από τα 9 απαραίτητα ιχνοστοιχεία. Συγκεκριμένα, έχει ανιχνευτεί ο σίδηρος, ο χαλκός, το μαγγάνιο, και το πυρίτιο. Ο σίδηρος είναι συστατικό της αιμογλοβίνης και ο χαλκός παίζει ρόλο καταλύτη στη σύνθεσή της.

Τα ένζυμα του μελιού είναι απαραίτητοι θρεπτικοί καταλύτες. Το ένζυμο ιμπερτάση διασπά τη σουκρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη. Στο ένζυμο αυτό οφείλεται η περιεκτικότητα του μελιού σε απλά σάκχαρα. Η διασπάση διασπά το άμυλο. Το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης διασπά τη γλυκόζη σε υπεροξειδίο του υδρογόνου και σε γλυκονικό οξύ. Το γλυκονικό οξύ με τη σειρά του συμμετέχει στην αποβολή τοξικών ουσιών μέσω των νεφρών. Η καταλάση διασπά το υπεροξειδίο του υδρογόνου ελευθερώνοντας σχετικά μεγάλη ενέργεια η οποία θανατώνει βακτήρια. Η φωσφατάση διασπά οργανικές ενώσεις φωσφορικού οξέος.

Τα οργανικά οξέα του μελιού διαμορφώνουν κατά ένα μεγάλο μέρος την οσμή του, τη γεύση και τέλος ασκούν ευνοϊκή επίδραση στην όρεξη. Στο μέλι βρέθηκε το γλυκονικό, το μηλικό, το κιτρικό, το γαλακτικό και άλλα οξέα.

Επίσης, το μέλι έχει ρυθμιστικές ουσίες οι οποίες επηρεάζουν τις λειτουργίες των διαφόρων οργάνων. Για παράδειγμα η ακετυλοχολίνη που βρίσκεται στο προϊόν είναι απαραίτητος νευροδιαβιβαστής τόσο στο συμπαθητικό όσο και στο παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα. Το μέλι παρουσιάζει ευρύ φάσμα αμινοξέων σε μικρές όμως ποσότητες.

Οι αρωματικές και χρωστικές ουσίες του μελιού δεν επηρεάζουν τη φυσιολογική λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού, γιατί δεν έχουν σχέση με τη θρεπτική και βιολογική του αξία. Επηρεάζουν όμως τις προτιμήσεις του καταναλωτή (Thrasivoulou, 2012).

Η περιεκτικότητα του μελιού σε βιταμίνες είναι χαμηλή. Βιταμίνες όπως φυλοκινόνη (K), θειαμίνη (B1), ριβοφλαβίνη (B2), πυριδοξίνη (B6) και νιασίνη αναφέρονται στο μέλι, αλλά γενικά, η ποσότητα των βιταμινών και ανόργανων συστατικών είναι μικρή και δεν επαρκεί για να συμπληρώσει τις καθημερινές απαιτήσεις διατροφής του ανθρώπου, είναι όμως αρκετή για να εξασφαλίσει την απορρόφηση και χρησιμοποίηση των ζαχάρων (Thrasivoulou, 2012, Alvarez-Suarez et al., 2010).

Οι χημικές συγκεντρώσεις όλων των παραπάνω ουσιών στα διάφορα είδη μελιού (ανθόμελο, πευκόμελο, καστανιάς και άλλων) διαφέρουν, ανάλογα με τη βοτανική τους προέλευση (Alvarez-Suarez et al., 2010).

## 1.2 Ευεργετικές επιδράσεις στον άνθρωπο



Πηγή: melitehoney, 2011

Το μέλι χρησιμοποιείται ως θρεπτική τροφή αλλά και για τις θεραπευτικές του ιδιότητες από τα αρχαία χρόνια. Χρησιμοποιείται κατά κόρον στην πρακτική ιατρική, τη συμβατική ιατρική αλλά και από το ευρύτερο κοινό (Alvarez-Suarez et al., 2010, Abdullah and Clemencia, 2009).

Χρησιμοποιούνταν σε πολλές κουλτούρες για τις θεραπευτικές του ιδιότητες, όπως τη θεραπεία εγκαυμάτων, τον καταρράκτη, ελκών και πληγών, έχοντας λειαντικό αποτέλεσμα όταν εφαρμόζεται σε ανοιχτές πληγές (Alvarez-Suarez et al., 2010).

Εξαιτίας των φυσικών του ιδιοτήτων, προβάλλει προστατευτική δράση και εξαιτίας της υψηλής οσμωτικότητάς του δημιουργεί ένα επουλωτικό υγρό για την πληγή με τη μορφή ενός διαλύματος που δεν κολλάει με τους τραυματισμένους ιστούς. Αυτό το υγρό περιβάλλον που δημιουργεί στην πληγή πιστεύεται ότι εμποδίζει τον αποικισμό βακτηρίων (Alvarez-Suarez et al., 2010). Δηλαδή, τα δύο σάκχαρα που περιέχει σε μεγάλη ποσότητα (γλυκόζη και φρουκτόζη) συγκρατούν ισχυρά το νερό με την εφαρμογή του μελιού στις πληγές, τις ξεραίνουν και έτσι η ανάπτυξη των βακτηρίων και των μυκήτων αναστέλλεται (Abdullah and Clemencia, 2009). Εν κατακλείδι, το μέλι μειώνει τις φλεγμονές και το σχηματισμό εκκρίματος (exudates) πιο γρήγορα από τις κλασικές θεραπείες (Alvarez-Suarez et al., 2010).

Έχει παρατηρηθεί η θεραπευτική του ιδιότητα σε μετεγχειρητικές πληγές, όπου οι συμβατικές θεραπείες, δηλαδή αντιβιοτικά και αντισηπτικά, συμπεριλαμβανομένων τραυμάτων που έχουν μολυνθεί με τον ανθεκτικό στη μεθικιλίνη *S. aureus* δεν ανταποκρίνονται (Mandal M. and Mandal S., 2011). Επίσης, τα ενζυμα που περιέχει το μέλι (οξειδάση της γλυκόζης) όταν συνδέονται με το νερό παράγουν υπεροξειδίο του υδρογόνου, ένα ισχυρό αντισηπτικό. Τα αντιοξειδωτικά και τα φλαβονοειδή που περιέχει αποτελούν επίσης αντιβακτηριακούς παράγοντες (Abdullah and Clemencia, 2009).

Γενικότερα, το μέλι παρουσιάζει αντιβακτηριακή δράση, λόγω των αντιμικροβιακών ουσιών που παράγει (υπεροξειδίο του υδρογόνου, ένζυμα λυσοζύμη, φαινολικές ουσίες και φλαβονοειδή). Εκτός από το υπεροξειδίο του υδρογόνου, πιστεύεται πως η περιεκτικότητα σε αντιμικροβιακές ενώσεις εξαρτάται από την φυτική προέλευση των μελιού. Επίσης, παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση, αφού μειώνει τις οξειδώσεις στα τρόφιμα (οξείδωση των λιπών, ενζυμική αμαύρωση των φρούτων και των φυτών) που μπορεί να προκαλέσουν δηλητηριώδεις αντιδράσεις σε αυτά και να επιφέρουν χρόνιες ασθένειες και καρκίνους. Τα αντιοξειδωτικά (όπως φαινολικές ουσίες, φλαβονοειδή, οργανικά οξέα) που υπάρχουν φυσικά στο μέλι συμβάλλουν στην αντιοξειδωτική του ικανότητα (Mandal M. and Mandal S., 2011, Alvarez-Suarez et al., 2010).

Η αντιοξειδωτική του αυτή ικανότητα ποικίλλει ανάλογα με την φυτική προέλευση του μελιού, πιθανώς λόγω των διαφορών σε φυτικούς δευτερογενείς μεταβολίτες και της διαφορετικής ενζυμικής δραστηριότητας. Πιστεύεται ότι οι φυτοχημικές ουσίες που περιέχει το μέλι μπορεί να αυξάνουν την άμυνα των κυττάρων κατά του οξειδωτικού στρες, προστατεύοντας τον άνθρωπο (Alvarez-Suarez et al., 2010).

Επιπλέον, το μέλι παρουσιάζει αντιμεταλλαξιγόνο, αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδη δράση. Αποδείχθηκε ότι μειώνει φλεγμονές του δέρματος, το οίδημα και την εξίδρωση, προάγει την επούλωση του τραύματος, μειώνει το μέγεθος της ουλής και διεγείρει την αναγέννηση των ιστών.

Η χημειοπροληπτική δράση του μελιού αποδόθηκε στις ιδιότητες του υπεροξειδίου του υδρογόνου που προάγει την απόπτωση των κυττάρων, αλλά πρόσφατα ευρήματα δείχνουν ένα συμπληρωματικό ρόλο των φυτοχημικών αντιοξειδωτικών, που μπορεί να δρουν συνεργιστικά ή ανεξάρτητα από την απελευθέρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Το μέλι έχει αντιβακτηριακή δράση ενάντια σε εντεροπαθογόνα βακτήρια όπως η *Salmonella*, η *Shigella* και η *E. coli*, μειώνοντας τη διάρκεια της διάρροιας (Alvarez-Suarez et al., 2010). Δρα ενάντια στους παράγοντες που προκαλούν πεπτικά έλκη και γαστρίτιδα, όπως το *Helicobacter pylori*. Η υποστήριξη για τη χρήση του μελιού ως θεραπευτική αγωγή για το πεπτικό έλκος και τη γαστρίτιδα προέρχεται από την παραδοσιακή ιατρική, καθώς και από τις αναφορές στη σύγχρονη εποχή, όπου υποστηρίζουν ότι το μέλι μπορεί να προάγει την επιδιόρθωση των κατεστραμμένων κυττάρων του βλεννογόνου του εντέρου, διεγείροντας την ανάπτυξη των νέων ιστών παίζοντας το ρόλο αντιφλεγμονώδη παράγοντα (Mandal M. and Mandal S., 2011).

Τέλος, το μέλι επιδρώντας στην ολική χοληστερόλη και την ακυλογλυκερόλη βοηθά στη μείωση του βάρους υπέρβαρων ανθρώπων και του λίπους τους, παράγοντες κινδύνου για την πρόκληση καρδιαγγειακών νοσημάτων. Επίσης, σε διαβητικούς ασθενείς το μέλι προκάλεσε σημαντικά χαμηλότερη αύξηση της γλυκόζης του πλάσματος από ότι η δεξτρόζη της ζάχαρης (Alvarez-Suarez et al., 2010).

### 1.3 Τα είδη του ελληνικού μελιού

Η Ελλάδα διακρίνεται από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές με έντονο ανάγλυφο και διαφορετική χλωρίδα. Ερευνητές, όπως ο Θρασυβούλου Α., ο Μανίκης Ι, Τσέλιος Δ. και άλλοι, με το πέρασ πλήθος ειδών αναλύσεων, οι οποίες έχουν εφαρμοστεί και διεθνώς, αλλά και καινοτόμες, κατάφεραν να ταυτοποιήσουν και τελικώς να νομοθετηθεί η ύπαρξη αμιγών καθαρών ποικιλιών του ελληνικού μελιού. Έχοντας ως γνώμονα τον τρόπο παρασκευής του μελιού από τις μέλισσες, προσανατόλισαν την έρευνά τους στην παρασκευή του μελιού από διάφορες φυτικές προελεύσεις, ολοκλήρωσαν τις φυσικοχημικές αναλύσεις σε δείγματα μελιών από διάφορες γεωγραφικές περιοχές και διαφορετικές φυτικές προελεύσεις. Η μελέτη των ελληνικών μελιών ξεκίνησε με προσδιορισμό των φυσικών ιδιοτήτων (χρώμα, οσμή, ειδικό βάρος) και των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών (υγρασία, τέφρα, ζάχαρα, οξύτητα, ηλεκτρική αγωγιμότητα, περιεκτικότητα), το ποσό γλυκόζης-φρουκτόζης, το ποσό σακχαρόζης, και τέλος, το είδος γυρεόκοκκων και την περιεκτικότητα σε υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF). Παράλληλα έγινε συσχέτιση με την ταχύτητα κρυστάλλωσής και τη χημική τους σύσταση, ταυτοποιήθηκαν τα λιπίδια, τα ελεύθερα αμινοξέα, οι ζυμομύκητες και τα σάκχαρα. Τέλος, ταυτοποιήθηκαν παράλληλα τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά κάθε μελιού και έτσι, έπειτα από έρευνα σε πολλά επίπεδα, διαμορφώθηκε η ταυτότητα των ελληνικών μελιών, που είναι τα εξής :

#### 1.3.1 Μέλι πεύκου



Αποτελεί το 65% της παραγωγής μελιού στην Ελλάδα και προέρχεται από τις μελιτώδεις εκκρίσεις του εντόμου *Marchalina hellenica*, γνωστό ως «βαμβακάδα», «εργάτης» «μικρόβιο ή παράσιτο» του πεύκου. Γι' αυτό και το μέλι αυτό έχει χαρακτηριστικά μελιτώματος, όπως υψηλή συγκέντρωση τέφρας και υψηλό pH. Το παράσιτο βρίσκεται κυρίως στην περιοχή της Θάσου, αλλά και στη Χαλκιδική, Εύβοια, Σκόπελο, Σκιάθο, Ζάκυνθο, Ρόδο, Κρήτη και άλλα.

Επίσης, περιέχει χαμηλές συγκεντρώσεις σακχάρων, χαρακτηριστικό που το διαφοροποιεί από τα άλλα μέλια. Έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη και γι' αυτό το λόγω η κρυστάλλωσή του γίνεται με βραδύ ρυθμό. Το χρώμα του επίσης είναι ξεχωριστό, στρέφει συνήθως το πολωμένο φως δεξιόστροφα και έχει ηλεκτρική αγωγιμότητα υψηλή ( $>1.0 \text{ Ms.cm}^{-1}$ ). Το πευκόμελο που παράγεται την Άνοιξη διαφέρει από αυτό που παράγεται το Φθινόπωρο όντας πιο ανοιχτόχρωμα, διαυγές

και με ιδιαίτερο άρωμα. Τέλος, το πευκόμελο χαρακτηρίζεται από μεγάλο αριθμό διαφορετικών ουσιών και από υψηλό αριθμό ιχνοστοιχείων, και θεωρείται για το λόγο αυτό, μέλι με υψηλή θρεπτική αξία.

### 1.3.2 Μέλι ελάτης



Το μέλι ελάτης συμβάλλει κατά 5-10% στην ετήσια ελληνική παραγωγή μελιού. Παράγεται η κεφαλληνιακή ελάτη (*Abies cephalonica*) η οποία φύεται σε μεγάλες εκτάσεις των ορεινών περιοχών νότια του Ολύμπου, την Ευρυτανία, το Περούλι, το Καρπενήσι, τον Ταΰγετο, την Αρκαδία, την Πάρνηθα και άλλα. Στα ελληνικά είδη ελάτης, παρασιτούν τα κοκκοειδή *Physokermes gemicryphus*, *Eulecanium sericeum*, και οι αφίδες *Mindarus abierinus*, *Cinara confinis* και *Cinara pectinatae*, που παράγουν μελιτώδεις εκκρίσεις, τις οποίες εκμεταλλεύονται οι μέλισσες για την παραγωγή του μελιού. Το πιο σημαντικό από τα έντομα αυτά είναι το *P. hemicryphus* το οποίο παρασιτεί στην ευρωπαϊκή και κεφαλληνική ελάτη, όπου οι αποδόσεις σε μέλι ανά μελίτσι φτάνουν και τα 30 κιλά.

Το μέλι ελάτης έχει χαρακτηριστική γεύση και εμφάνιση και λόγω του χαμηλού ποσοστού γλυκόζης δεν κρυσταλλώνει, γεγονός που το κάνει εμπορικά περιζήτητο. Το χρώμα και η εμφάνιση ποικίλουν ανάλογα με την περιοχή προέλευσής του. Το ελληνικό μέλι ελάτης, παρουσιάζει χαμηλό ποσοστό υγρασίας (Μ.Ο 15,2) (εργαστήριο Μελισσοκομίας, ΑΠΘ) ενώ μερικά δείγματα παρουσίασαν υγρασία <14%, γεγονός που ευνοεί την κρυστάλωσή τους, η οποία όμως αποφεύγεται λόγω χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη. Το pH του είναι υψηλότερο από όλες τις κατηγορίες μελιού. Τέλος, το μέλι πεύκου έχει χαμηλά ανάγοντα ζάχαρα, δηλαδή άθροισμα φρουκτόζης και δεξτρόζης.

### 1.3.3 Μέλι καστανιάς



Παράγεται από το νέκταρ και τις μελιτώδεις εκκρίσεις της Καστανιάς (*Castanea sativa*), που είναι αρκετά διαδεδομένη στην ορεινή ζώνη της Ελλάδας. Οι μελιτώδεις εκκρίσεις παράγονται από την αφίδα *Myzocallis castanicola* που συναντώνται στην κάτω επιφάνεια των φύλλων αλλά και κάτω στα εχυνόμορφα κύπελα που περιβάλλουν τους καρπούς. Οι μελιτώδεις εκκρίσεις αρχίζουν τον Μάιο και συνεχίζονται μέχρι τον Ιούλιο ή αργότερα. Οι τιμές pH, αναγόντων ζαχάρων και αγωγιμότητας, τέφρας και υψηλές συγκεντρώσεις ενζύμων. Το μέλι καστανιάς έχει μικρότερη περιεκτικότητα σε ζύμες από τα άλλα μέλια, και ποικίλει ανάλογα με την προέλευσή του από ανοιχτό καφέ μέχρι σκούρο καφέ και μαύρο αν πρόκειται για μελίτωμα. Έχει έντονη, δυνατή, πικρή και διαρκείας γεύση.



### 1.3.4 Θυμαρίσιο μέλι



Χαρακτηρίζεται από εξαιρετικό άρωμα και γεύση. Παράγεται κυρίως στα νησιά, αλλά και σε όλη την ηπειρωτική χώρα που φυτρώνουν είδη θυμαριού. Έχει συνήθως άθροισμα γλυκόζης και φρουκτόζης μικρότερο από 60% και έχει υψηλά ποσοστά του ενζύμου διαστάση και προλίνης. Έχει χαρακτηριστικό ανοιχτό χρώμα, κρυσταλλώνει σε διάστημα 6-18 μήνες ανάλογα με τον αμιγή του χαρακτήρα.

### 1.3.5 Ρεικίσιο μέλι



Στην Ελλάδα υπάρχουν τέσσερα φυτά της οικογένειας των Ερεικωδών από την νεκταέκκριση των οποίων παράγονται αντίστοιχοι τύποι μελιών. Η φθινοπωρινή ερείκη γνωστή και ως «σουσούρα» (*Erica verticillata*), η ανοιξιάτικη ερείκη (*Erica arborea*), η Κουμαριά (*Arbutus unedo*) και το Ροδόδεντρο (*Rhododendron*). Ο κάθε τύπος μελιού χαρακτηρίζεται από διαφορετικές ιδιότητες. Το μέλι της φθινοπωρινής ερείκης έχει υψηλό ποσοστό υγρασίας σε σχέση με άλλα μέλια και υπέρβαση αυτή από την αγορανομική διάταξη γίνεται δεκτή ως ιδιομορφία του. Η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι σχετικά επίσης υψηλή και ανάμεσα των τιμών του ανθόμελου και του δασόμελου, πράγμα που τα διακρίνει από τα άλλα ανθόμελα. Το ανοιξιάτικο μέλι ερείκης, είναι πιο ανοιχτόχρωμο, με διαφορετική γεύση και υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης.

### 1.3.6 Μέλι κουμαριάς



Είναι μέλι υπόπικρο γι' αυτό και η εμπορική του αξία είναι περιορισμένη. Συνήθως δεν τρυγιέται αλλά παραμένει στις κυψέλες για το πέρας του χειμώνα.

### 1.3.7 Μέλι Ροδόδενδρου



Από τα 400 είδη Ροδόδενδρου, στην Ελλάδα συναντώνται κυρίως η Αζαλέα, η Κάλμα και Ασκληπιάς. Το μέλι αυτό περιέχει την τοξική ουσία ανδρομεδοτοξίνη πριν ωριμάσει, και η τοξικότητα αυτής εξαφανίζεται με την ωρίμανση του μελιού.

### 1.3.8 Μέλι Ηλίανθου



Το φυτό Ηλίανθος καλλιεργείται σε μεγάλες εκτάσεις στη χώρα μας και συμβάλει κατά πολύ στην παραγωγή του μελιού. Από τη μελέτη των φυσικοχημικών του χαρακτηριστικών προκύπτει το υψηλό ποσοστό υγρασίας του «*το οποίο συμβάλει στο γρήγορο ξίνισμα του προϊόντος*», η μικρή συγκέντρωση του ενζύμου διαστάση που το κάνει ευαίσθητο στη θέρμανση και οι υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης που είναι αιτία γρήγορης και ανομοιόμορφης κρυστάλλωσης και είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες.

### 1.3.9 Μέλι βαμβακιού



Το λεγόμενο βαμβακόμελο είναι αμιγής κατηγορία μελιού που παράγεται σε μεγάλες ποσότητες στην Ελλάδα. Οι μέλισσες συλλέγουν το νέκταρ από τα άνθη και «*τα εξωανθικά νεκτάρια*» του φυτού και το μελίτωμα που εκκρίνεται από έντομα, που παρασιτούν στην καλλιέργεια (αφίδες, αλευρώδεις, ημίπτερα και άλλα). Το βαμβακόμελο από μελίτωμα είναι ανοιχτόχρωμο, διακρίνεται από υψηλή αγωγιμότητα, μικρή περιεκτικότητα σε γυρεόκοκκους και πολλές φορές δεν έχει καλή γεύση. Το βαμβακόμελο από άνθος, είναι επίσης ανοιχτόχρωμο και η γεύση του είναι βουτυρώδης. Τα χημικά του χαρακτηριστικά είναι τα τυπικά των ανθόμελων.

### 1.3.10 Μέλι εσπεριδοειδών



Το μέλι αυτό είναι εξαιρετικά αρωματικό, με πολύ καλά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και μεγάλη ταχύτητα κρυστάλλωσης. Χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα χαμηλή περιεκτικότητα του ενζύμου διαστάση. Το άθροισμα γλυκόζης και φρουκτόζης του βρίσκεται πολλές φορές πάνω από το όριο των 60% (Οδηγία 101/2001Ε) (Thrasivoulu et al, 2002).

## 1.4 Αντιμικροβιακές-αντιβακτηριακές ιδιότητες του μελιού

Έχει αποδειχτεί πειραματικά ότι το μέλι αναστέλλει την ανάπτυξη βακτηρίων, όπως ο *Staphylococcus aureus* (κύριο παθογόνο), η *E.coli*, η *P.aeruginosa*, αλλά και ο μύκητας *Candida albicans* (Anthimidou and Mossialos, 2012, Abdullah and Clemencia, 2009). Παρόλα αυτά, οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του μελιού δεν είναι ακόμη τελείως κατανοητές. Οι μέλισσες παράγουν μέλι από το νέκταρ των λουλουδιών, αναμιγνύοντας νερό και υδρολυτικά ένζυμα.

Το μέλι περιέχει 1-2% ένζυμα και ενώσεις, των οποίων η συγκέντρωση παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιβακτηριακή δράση του μελιού και ποικίλει ανάλογα με την προέλευση του νέκταρ (Wang et al., 2012). Παρουσιάζει ισχυρή αντιβακτηριακή δραστηριότητα ενάντια σε σημαντικά κλινικά παθογόνα βακτήρια και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται στη μοντέρνα ιατρική. Η αντιβακτηριακή του δράση οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το χαμηλό pH και η υψηλή όσμωση (το μέλι αποτελείται από 80% (w/v) σάκχαρα) που είναι και οι μόνοι καλά χαρακτηρισμένοι αντιβακτηριακοί παράγοντες (Anthimidou and Mossialos, 2012, Kwakman et al., 2010).

Επιχειρώντας να ταυτοποιηθεί η πηγή της αντιβακτηριακής δράσης του μελιού, ερευνητές οδηγήθηκαν στην ανακάλυψη ενώσεων όπως η μεθυλγλυοξάλη (MGO) και το πεπτίδιο bee-defensin 1 (Wang et al., 2012). Η μεθυλγλυοξάλη και το αντιβακτηριακό πεπτίδιο bee defensin-1 ταυτοποιήθηκαν πρόσφατα σαν σημαντικοί αντιβακτηριακοί παράγοντες (Anthimidou and Mossialos, 2012), και βρέθηκαν σχετικά πρόσφατα στο μέλι Manuka που προέρχεται από το δέντρο Manuka (*Leptospermum scoparium*) (Kwakman et al., 2010) και στο ιατρικό τύπου μέλι Revamil source αντίστοιχα (Kwakman, 2012).

Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί συνολικά ως αντιβακτηριακοί παράγοντες, οι εξής ουσίες :

### i. Σάκχαρα

Το μέλι αποτελείται 80% από σάκχαρα, κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη, λίγη σουκρόζη και μαλτόζη και <18% νερό. Αυτή η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων προκαλεί ισχυρό οσμωτικό στρες και αποτρέπει την αλλοίωση από μικροοργανισμούς. Άρα τα σάκχαρα αποτελούν ισχυρό αντιμικροβιακό παράγοντα (Kwakman et al, 2010). Η αραίωση του μελιού μπορεί να προκαλέσει ανάπτυξη ζυμών, αλλά η συγκέντρωση των σακχάρων είναι επαρκής ώστε να διατηρήσει την αντιβακτηριακή δράση του μελιού, μέχρι αραίωση 30-40% (Kwakman, 2012).

### ii. Χαμηλό pH

Διάφορες μελέτες έδωσαν αντιφατικά αποτελέσματα ως προς τη συνεισφορά του χαμηλού pH (γενικά είναι μεταξύ 3,2 και 4,5) για την αντιβακτηριακή δράση, αλλά ο Kwakman και οι συνεργάτες του έδειξαν πως υπάρχει ρόλος του pH σε αυτή τη δράση του μελιού.

### iii. Υπεροξειδίο του υδρογόνου

Το  $H_2O_2$  έχει ταυτοποιηθεί από το 1960s, ως ο κύριος αντιβακτηριακός παράγοντας του μελιού. Η οξειδάση της γλυκόζης, ένας μεταβολίτης των υδατανθράκων που προστίθεται στο νέκταρ από τις μέλισσες, μετατρέπει τη γλυκόζη σε υπεροξειδίο του υδρογόνου και γλυκονικό οξύ υπό αερόβιες συνθήκες. Ο σχηματισμός του  $H_2O_2$ , αποτελεί την πρόληψη για την αλλοίωση του άγουρου μελιού όταν η συγκέντρωση της ζάχαρης δεν έχει φτάσει τα επιθυμητά επίπεδα, ώστε να εμποδίσει τη μικροβιακή ανάπτυξη (Kwakman, 2012). Το  $H_2O_2$  όχι μόνο αναχαιτίζει την ανάπτυξη των βακτηρίων αλλά και τα θανατώνει. Σε μικρές συγκεντρώσεις βρέθηκε επίσης ότι συμμετέχει ως ένας από τους αυξητικούς παράγοντες στην επούλωση πληγών, όταν σε αυτές εφαρμόζονται επιθέματα με μέλι (Kwakman et al., 2010).

Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του μελιού, η οξειδάση της γλυκόζης αδρανοποιείται, αλλά ανακτά τη δράση της με την αραίωση του μελιού. Η συγκέντρωση του υπεροξειδίου είναι υψηλότερη σε 30-50% αραιωμένο μέλι και μειώνεται ταχύτητα κάτω από 30% αραιώση, εξαιτίας της χαμηλής συνάφειας της οξειδάσης της γλυκόζης της μέλισσας με το υπόστρωμα γλυκόζης. Η καταλάση, η οποία διασπά το υπεροξειδίο του υδρογόνου, δεν έχει ταυτοποιηθεί στο μέλι μέχρι τώρα. Το  $H_2O_2$  είναι επίσης ο κύριος αντιμικροβιακός παράγοντας στο νέκταρ των φυτών και η συγκέντρωσή του επίσης διαφέρει μεταξύ δειγμάτων νέκταρ. (Kwakman, 2012).

### iv. Άλλες αντιβακτηριακές ενώσεις.

Η μεθυλγλυοξάλη πρόσφατα ταυτοποιήθηκε στο μέλι Manuka ως αντιβακτηριακός παράγοντας. Σχηματίζεται από τα σάκχαρα κατά τη θέρμανση ή την παρατεταμένη αποθήκευση τροφίμων και ποτών που περιέχουν υδατάνθρακες. Οι ερευνητές εξουδετερώνοντας τη μεθυλγλυοξάλη στο μέλι Manuka, παρατήρησαν ότι σταμάτησε η δράση του ενάντια στον *S.aureus* και σταδιακά μειώθηκε στον *B. subtilis* αλλά δεν μειώθηκε ενάντια στην *E. coli* και την *P. aeruginosa*. Τελικώς, διαπίστωσαν ότι η μεθυλγλυοξάλη είναι η κύρια υπεύθυνη ουσία για την μη υπεροξειδική αντιμικροβιακή δράση του μελιού Manuka.

Το αντιβακτηριακό πεπτιδίο bee defensin-1 ταυτοποιήθηκε αρχικά στο Revamil source (RS) μέλι και αργότερα στο Manuka αλλά και σε άλλα μέλια, χωρίς να έχει ανιχνευτεί συστηματικά σε αυτά. Το πεπτιδίο αυτό παράγεται από τον υποφαρυγγικό αδένα της μέλισσας, ο οποίος χρησιμοποιείται στην παραγωγή του μελιού. Η συγκέντρωση του αντιβακτηριακού πεπτιδίου διαφέρει από μέλι σε μέλι και έχει βρεθεί ότι δρα ενάντια στον *Paenibacillus larvae*, την αιτία της Αμερικανικής σηψιγονίας. Διαπιστώθηκε ότι με την εξουδετέρωση όλων των παραπάνω ενώσεων του μελιού, συνεχίζει να παρατηρείται δράση έναντι του *Bacillus stearothermophilis*, αλλά όχι και του *S. aureus*. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει την ύπαρξη πολλών άλλων αντιβακτηριακών ουσιών στο μέλι.

Οι φαινολικές ενώσεις που προέρχονται από το νέκταρ των φυτών διαπιστώθηκε επίσης πως είναι από τους σημαντικούς αντιβακτηριακούς παράγοντες του μελιού. Έχουν ταυτοποιηθεί διάφορες από αυτές, αλλά δεν έχει ξεκαθαριστεί ακόμη η ακριβή συμβολή της καθεμίας στην αντιβακτηριακή δράση του μελιού. Τέλος, κάποιοι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στη φυσική μικροχλωρίδα του μελιού παράγουν αντιμικροβιακές ενώσεις *in vitro*, αλλά δεν έχει ανιχνευτεί ξεκάθαρα η παραγωγή τους στο μέλι (Kwakman, 2012).

## 1.5 Μέλι Manuka και άλλα αντιβακτηριακά μέλια

Το μέλι Manuka προέρχεται από το νέκταρ που συλλέγουν μέλισσες του είδους *Apis mellifera* κατά την αναζήτηση της τροφής τους σε ένα θάμνο γνωστό ως Manuka (*Leptospermum scoparium*) που είναι γηγενής στη Νέα Ζηλανδία. (Hayashi et al., 2014). Αναφέρεται ότι έχει ανασταλτική επίδραση σε περίπου 60 είδη βακτηρίων, περιλαμβάνοντας αερόβια και αναερόβια, θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια αλλά και ζύμες (Hayashi et al., 2014, Mandal M. and Mandal S., 2011). Χρησιμοποιείται σε σύγχρονα σκευάσματα περιθάλψης πληγών και έχει αποδειχθεί ότι εξουδετερώνει τον ανθεκτικό στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* που αναπτύσσεται σε αυτές. (Hayashi et al., 2014). Επίσης, διαπιστώθηκε ότι παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση ενάντια στο *Helicobacter pylori* γεγονός που το καθιστά πολλά υποσχόμενο στη θεραπεία των στομαχικών ελκών. Τέλος παρουσιάζει αντιβακτηριακή δράση ενάντια στα παθογόνα *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus*, *P. auroginosa*, αλλά και σε κάποια είδη εντεροκόκκων (Mandal M. and Mandal S., 2011).

Το πανεπιστήμιο του Waikato στο Χάμιλτον της Ν. Ζηλανδίας ήταν αυτό που μελέτησε πρώτο τη σύνθεση του μελιού Manuka και την αντιμικροβιακή του δράση (Roberts et al., 2015). Η μεθυλγλυοξάλη αναγνωρίστηκε ως το κυρίαρχο βιοενεργό συστατικό του μελιού Manuka και η συγκέντρωσή της συσχετίστηκε με την μη-υπεροξειδική δραστηριότητα του μελιού (Alvarez-Suarez et al., 2010). Τα υψηλά επίπεδα του δικαρβονυλίου μεθυλγλυοξάλη στο μέλι Manuka, σχηματίζονται μη ενζυμικά από την πρόδρομη ένωση διϋδροξυακετόνη (DHA) του νέκταρ των λουλουδιών του Manuka, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής του (Hayashi et al., 2014, Adams et al., 2009).

Πλέον η μεθυλγλυοξάλη (MGO) αναγράφεται στην συσκευασία του μελιού Manuka. Για παράδειγμα, MGO 100 σημαίνει ότι 100 mg μεθυλγλυοξάλης περιέχονται σε 1Kg μελιού (Sherlock et al., 2010).

Η μοντέρνα ιατρική ανέπτυξε μια σχολαστική μέθοδο για να μετράει την αντισηπτική του ισχύ, το Unique Manuka Factor (UMF). Η μονάδα μέτρησης UMF κατηγοριοποιεί το μέλι με βάση την αντιμικροβιακή του δύναμη. Κάθε παρτίδα ελέγχεται συστηματικά από εγκεκριμένο εργαστήριο, και ταξινομείται κατά αύξουσα σειρά αποδοτικότητας σε κλίμακα από το 0 ως και το 25. Όσο πιο υψηλά ταξινομείται στην κλίμακα, τόσο πιο μεγάλη είναι η αντισηπτική δράση του Manuka. Η UMF είναι η μοναδική αξιόπιστη μονάδα μέτρησης αποδοτικότητας του μελιού

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

Όσον αφορά τη βακτηριοκτόνο δράση του μελιού Manuka, η χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου έδειξε ότι το συγκεκριμένο μέλι προκαλεί δομικές αλλαγές στην επιφάνεια των κυττάρων οδηγώντας τα σε λύση (Roberts et al., 2015). Το μέλι Manuka έχει εγκριθεί επίσημα για ιατρικούς σκοπούς (Sherlock et al., 2010) και χρησιμοποιείται συχνά στο Ηνωμένο Βασίλειο και τη Βόρεια Αμερική (Roberts et al., 2015).

Ένα ακόμη αντιμικροβιακό μέλι είναι το Revamil source (RS) (ιατρικού τύπου μέλι), το οποίο παράγεται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες σε θερμοκήπια (Kwakman et al., 2010, Kwakman et al., 2011). Περιλαμβάνει 333g/kg γλυκόζη, 385 g/kg φρουκτόζη, 73 g/kg σουκρόζη και 62 g/kg μαλτόζη (Kwakman et al., 2010). Οι παράγοντες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την αντιμικροβιακή του δράση είναι η υψηλή συγκέντρωση σε σάκχαρα, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, η μεθυλγλυοξάλη, το χαμηλό pH και το αντιμικροβιακό πεπτίδιο bee - defensin 1 (Kwakman et al., 2010, Kwakman et al., 2011).

Επιπρόσθετα, το μέλι Ulmo που προέρχεται από το δέντρο Ulmo – *Eucryphia cordifolia*, είναι γηγενές της Χιλής και παρουσιάζει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση. Αυτή οφείλεται κυρίως στο υπεροξειδίο του υδρογόνου. Ο Sherlock και οι συνεργάτες του σύγκριναν την αντιμικροβιακή του δράση με αυτή του Manuka σε ίδια στελέχη βακτηρίων και διαπίστωσαν ότι παρουσία του συνθετικού μελιού (RH) εμφανίστηκαν μεγαλύτερες ζώνες αναστολής απ' ότι παρουσία του Manuka, (Sherlock et al., 2010).

Ένα ακόμη αντιμικροβιακό μέλι είναι το Μαλαισιανό Tualang που συλλέγεται από τα παράλια της Ασίας και παράγεται από τις μέλισσες του είδους *Apis dorsata*, οι οποίες χτίζουν τις κυψέλες τους ψηλά στα δέντρα Tualang (*Koompassia excelsa*). Το μέλι Tualang χρησιμοποιείται συνήθως ως φαρμακευτικό προϊόν, αλλά και ως τροφή στη Μαλαισία. Ωστόσο, έχουν δημοσιευθεί λίγες επιστημονικές πληροφορίες για τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες. Μία από αυτές δόθηκε από τον Tan και τους συνεργάτες του, οι οποίοι συγκρίνοντας την αντιμικροβιακή δράση του με αυτή του Manuka, παρατήρησαν ότι το Tualang ήταν αποτελεσματικότερο έναντι των βακτηρίων *S. pyogenes*, *MRSA*, *S. agalactiae*, *S. aureus*, *P. mirabilis*, *S. flexneri*, *E. Coli* και *E. cloacae* απ' ότι το Manuka και παρουσίασε παρόμοια αντιμικροβιακή δράση με το Manuka ενάντια στα βακτήρια *S. typhi* και *P. aeruginosa* (Tan et al., 2009).

## 1.6 *P. aeruginosa*

Ένα σημαντικό πρόβλημα που αντιμετωπίζει η σύγχρονη ιατρική είναι η εμφάνιση ανθεκτικών στα αντιβιοτικά παθογόνων βακτηρίων, όπως το ευκαιριακό παθογόνο *P. aeruginosa*, που προβάλλει ανθεκτικότητα σε όλα σχεδόν τα γνωστά μέχρι σήμερα αντιβιοτικά (Wang et al., 2012).



Η *P. aeruginosa* είναι Gram αρνητικό βακτήριο και αποτελεί μέλος των γ-πρωτεοβακτηρίων. Είναι αερόβιο, σχήματος ράβδου με πλάτος 0,5-0,8 μm και μήκος 1.5-3.0 μm. Μεταβολίζει το κιτρικό οξύ, είναι θετικό στην καταλάση και την οξειδάση (Jensen et al., 2013, Balcht et al., 1994) και η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξής της είναι 37 °C (Murali Putty, 2007). Σχεδόν όλα τα

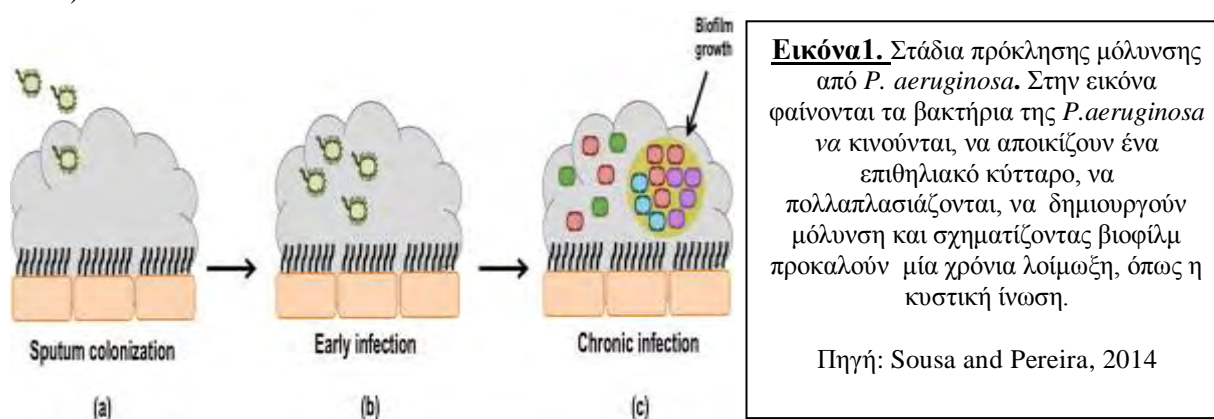
στελέχη κινούνται με τη βοήθεια ενός πολικού μαστιγίου. Ευδοκίμει όχι μόνο σε ατμοσφαιρικές συνθήκες, αλλά και σε υποξικές και αποικίζει διάφορα φυσικά και τεχνικά περιβάλλοντα. Ο βιότοπός του είναι το έδαφος, το νερό και άλλα (Jensen et al., 2013, Balcht et al., 1994).

Η *P. aeruginosa* προκαλεί πολλές λοιμώξεις στον άνθρωπο και η κατάσταση γίνεται κρίσιμη, εξαιτίας του γεγονότος ότι δεν υπάρχουν διαθέσιμα καινούργια αντιβιοτικά ενάντια στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Jensen et al., 2013, Wang et al., 2012). Αυτό συμβαίνει διότι έχει την ικανότητα να σχηματίζει βιοφίλμ, τα οποία αυξάνουν την αντίστασή της σε θεραπευτικές αγωγές (Jensen et al., 2013). Επίσης, πολλές μελέτες έχουν δημοσιευτεί για την υψηλή ανθεκτικότητα της *P. aeruginosa* σε πολυάριθμα βιοκτόνα, όπως η χλωρίνη, τεταρτοταγής ενώσεις του αμμωνίου, και αλδεΐδες. Η ανθεκτικότητάς της αυτή φαίνεται να οφείλεται στα φυσικά και δομικά χαρακτηριστικά του βιοφίλμ που σχηματίζει, το οποίο αποτελείται από ετερογενείς δομές υποπληθυσμών με διακριτές αποικίες και φαινότυπους αντοχής (Bridier et al., 2011). Για παράδειγμα, ο σχηματισμός βιοφίλμ από την ψευδομονάδα στην ενδροβροχική βλέννα των ασθενών με κυστική ίνωση (CF) καθιστά το βακτήριο πολύ δύσκολα καταπολεμήσιμο με την εφαρμογή διαφόρων αντιβιοτικών, καθώς αυτά διεισδύουν δύσκολα στα βιοφίλμ. (Jensen et al., 2013).

Η *P. aeruginosa* προκαλεί μολύνσεις σε διάφορους ξενιστές, όπως φυτά, έντομα και ζώα. Είναι υπεύθυνο για πολλά νοσοκομειακά και κλινικά κρούσματα σε όλο τον κόσμο (Benjamin et al., 2013). Επίσης, ευθύνεται για οξείες μολύνσεις των πνευμόνων, σήψη σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα (ασθενείς με εγκαύματα, HIV ή άτομα τα οποία υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία), ουρολοιμώξεις, μηνιγγίτιδα, λοιμώξεις από καθετήρες, σηψαιμία, πνευμονία, μολύνσεις τραυμάτων και νοσηρότητα και θνησιμότητα σε άτομα που πάσχουν από κυστική ίνωση, όπως προαναφέρθηκε (Benjamin et al., 2013, Lau et al., 2004, Anthimidou and Mossialos, 2012).

Το κύριο κλινικό πρόβλημα όσων πάσχουν από κυστική ίνωση (CF) είναι η προοδευτική απώλεια της αναπνευστικής λειτουργίας, που οφείλεται σε λοίμωξη των πνευμόνων από *Pseudomonas aeruginosa*. Παρόλο που τα αντιβιοτικά μειώνουν τη συχνότητα και τη διάρκεια των λοιμώξεων, το βακτήριο εγκαθίσταται στους πνεύμονες και ποτέ δεν εξουδετερώνεται τελείως (Lau et al., 2004).

Τα Φλεβικά έλκη ποδιών είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε μόλυνση από *P. aeruginosa*, η οποία εξαπλώνεται σε περισσότερα σημεία του τραύματος καθιστώντας δύσκολη τη θεραπεία. Επιπλέον, τα χρόνια φλεβικά έλκη που έχουν αποικιστεί από την *P. aeruginosa* εμφανίζουν αξιοσημείωτη μείωση του ποσοστού επιτυχίας μοσχευμάτων δέρματος. Διαπιστώθηκε σύνδεση μεταξύ χρόνιων πληγών και βιοφίλμ. Επιπλέον, έχει τεκμηριωθεί ότι η παραγωγή ραμνολιπιδίων από την *P. aeruginosa* συμβάλει στην αποτυχία θεραπειάς φλεβικών ελκών (Roberts et al., 2014).



Τα βακτήρια όπως η *P. aeruginosa*, χρησιμοποιούν ένα σύστημα Quorum Sensing (αίσθηση μεγέθους πληθυσμού) για να επικοινωνούν μεταξύ τους και με τη βοήθεια του οποίου δημιουργούν βιοφίλμ είτε προκαλούν μόλυνση παράγοντας μολυσματικούς παράγοντες. (Solano et al., 2014, Sandoz et al., 2007). Η *P. aeruginosa* έχει δύο γνωστά QS συστήματα: το δίκτυο AHL, LasR/RhlR και το δίκτυο HAQs, MvfR (Solano et al., 2014). Σχετικά πρόσφατα, ταυτοποιήθηκε και ένα τρίτο σύστημα QS γνωστό ως PQS (McKnight et al., 2000). Τα βακτήρια χρησιμοποιούν αυτά τα δίκτυα για να τροποποιούν τη μολυσματικότητά τους ανάλογα με τα ερεθίσματα του περιβάλλοντός τους (Wang et al., 2012). Το δίκτυο του QS, MvfR είναι πιο σημαντικό για την εμφάνιση μολυσματικότητας και ρυθμίζει διάφορους μολυσματικούς παράγοντες της *P. aeruginosa*.

Από βιοχημική και μοριακή σκοπιά, οι μολύνσεις από *P. aeruginosa* συνδέονται με τη σύνθεση μολυσματικών παραγόντων, όπως οι πρωτεάσες (LasA πρωτεάση, αλκαλική πρωτεάση, ελαστάση), τα ραμνολιπίδια, το υδροκυάνιο (hydrogen cyanide), οι εξωτοξίνες (εξωτοξίνη A) και οι φεναζίνες (όπως πυοκυανίνη), τα οποία προκαλούν φλεγμονές και οξειδωτικό στρες οδηγώντας σε δυσλειτουργία της αναπνευστικής οδού (Benjamin et al., 2013, Bardoe et al., 2012, Sandoz et al., 2007).



Η *P.aeruginosa* για να μπορέσει να ρυθμίσει αποτελεσματικά την έκφραση των περισσότερων μολυσματικών παραγόντων, διαχειρίζεται το δίκτυο αίσθησης αύξησης μεγέθους (Quorum sensing), το οποίο περιλαμβάνει τα σηματοδοτικά συστήματα που προαναφέρθηκαν (Benjamin et al., 2013). Με τον τρόπο αυτό μπορεί να δημιουργήσει χρόνιες μολύνσεις σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα, συμπεριλαμβάνοντας εκείνα τα άτομα που πάσχουν από την γενετική ασθένεια κυστική ίνωση (Sandoz et al., 2007).

Σε προηγούμενες μελέτες αποδείχτηκε ότι η αποδιοργάνωση του συστήματος επικοινωνίας της *P. aeruginosa* οδηγεί σε μείωση της μολυσματικότητας και της επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων της (Benjamin et al., 2013). Σύμφωνα με τον Wang και τους συνεργάτες του, για τη μείωση αυτή ευθύνονται οι μη βακτηριοκτόνες ουσίες του μελιού (λιγότερο από 6%) οι οποίες αποδιοργανώνουν τα δίκτυα επικοινωνίας της *P. aeruginosa*, αναστέλλοντας την έκφραση των γονιδίων Las, και Rhl, αλλά και μολυσματικούς παράγοντες που δρουν συνεργιστικά. Οι ίδιοι καταλήγουν σε δύο πιθανούς μηχανισμούς εμφάνισης αντιμολυσματικής δράσης του μελιού: βακτηριοκτόνο επίδραση από ουσίες (οι οποίες δεν έχουν ταυτοποιηθεί πλήρως) που εξαρτώνται από την προέλευση του νέκταρ, και επιδράσεις στα συστήματα QS που είναι ανεξάρτητα από την πηγή του νέκταρ (Wang et al., 2012).

### 1.6.1 Πρωτεάσες

Οι πρωτεάσες (πεπτιδολυτικές υδρολάσες) είναι πρωτεολυτικά ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση των πρωτεϊνών, προσθέτοντας νερό ανάμεσα από τους πεπτιδικούς δεσμούς και καταλύουν τη σύνθεση πεπτιδίων σε οργανικούς διαλύτες και σε διαλύτες με χαμηλή συγκέντρωση νερού.

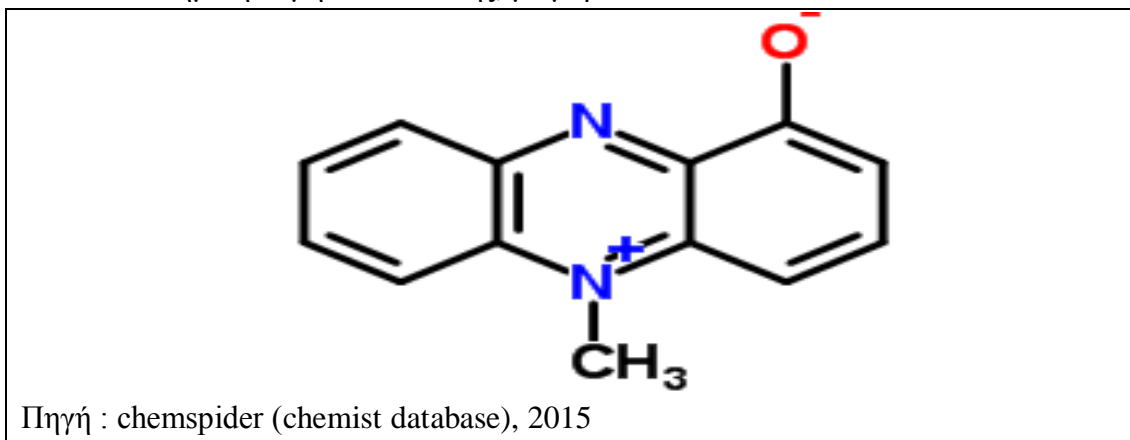
Με βάση τη δομή και την βιοδραστικότητά τους, υπάρχουν αρκετά είδη πρωτεασών όπως σερίνης, μεταλλικές, καρβοξυλικές, όξινης, ουδέτερης και αλκαλικές πρωτεάσες. Οι πρωτεάσες είναι σημαντικά βιομηχανικά ένζυμα και αποτελούν το ένα τέταρτο της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής ενζύμου. Οι πρωτεάσες είναι σημαντικά ένζυμα λόγω της ευρείας εφαρμογής τους στην επεξεργασία δερμάτων, βιομηχανία απορρυπαντικών, βιομηχανία τροφίμων, τη φαρμακευτική, κλωστοϋφαντουργία και άλλα. Η εξωκυτταρική παραγωγή πρωτεασών από μικροοργανισμούς επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τα συστατικά του μέσου στο οποίο βρίσκεται ο οργανισμός, όπως πηγές άνθρακα, αζώτου και μεταλλικών ιόντων, και από άλλες παραμέτρους ανάπτυξης (Raj et al., 2012). Ο Raj και οι συνεργάτες του έχουν βρει πως η άριστη θερμοκρασία παραγωγής πρωτεασών από την *P. aeruginosa* είναι οι 37°C για 48 ώρες και pH 7.

### 1.6.2 Πυοκυανίνη

Η *P.aeruginosa* εκκρίνει την χρωστική πυοκυανίνη (μπλε-πράσινο), την πυοβερδίνη (κίτρινο, πράσινο και φθορισμού), την πυομελανίνη (ανοικτό καφέ) και την πυορρυθρίνη (κόκκινο- καφέ). Η *P. aeruginosa* είναι το μόνο είδος από τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια που παράγει πυοκυανίνη, η οποία την καθιστά εύκολα εντοπίσιμη στον ανθρώπινο οργανισμό. Η πυοκυανίνη στο 90-95% των στελεχών *P.aeruginosa* είναι μπλε χρώματος και αναφέρεται ως «μπλε πύον». Παράγεται σε υπόστρωμα χαμηλής συγκέντρωσης σιδήρου και παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του σιδήρου. Ο σίδηρος είναι βασική απαίτηση για την ανάπτυξη της *P. aeruginosa* και η πυοκυανίνη φαίνεται ότι συμμετέχει στο μηχανισμό απελευθέρωσης σιδήρου από την τρανσφερίνη (Jayaseelan et al., 2014).

Χημικά, η χρωστική πυοκυανίνη χαρακτηρίζεται ως μία φεναζίνη, αζωτούχα ετεροκυκλική ένωση (Εικόνα 2.). Αποτελεί έναν οξειδοαναγωγικό δευτερογενή μεταβολίτη διαλυτό στο χλωροφόρμιο, που με τη βοήθεια και άλλων μεταβολιτών συμβάλει στο να επιζήσει η *P.aeruginosa*. Η πυοκυανίνη παράγεται από το χορισμικό οξύ με τη βοήθεια των ενζύμων PhzM και PhzS, τα οποία τροποποιούν πρόδρομες τρι-κυκλικές ενώσεις, όπως την πρόδρομη ένωση phenazine-1-carboxylic acid (Jayaseelan et al., 2014, Lau et al., 2004).

Εικόνα 2. Χημική δομή πυοκυανίνης, με μοριακό τύπο  $C_{13}H_{10}N_2O$



Είναι ένα αμφίφυλο ιόν, γι' αυτό και μπορεί να διαπεράσει εύκολα βιολογικές μεμβράνες. Ανακτάται σε μεγάλες ποσότητες από την πτύελο ασθενών που πάσχουν από κυστική ίνωση και έχουν μολυνθεί από *P. aeruginosa*, και από εκκρίσεις αυτιών ατόμων που έχουν μολυνθεί από *P. aeruginosa* και πάσχουν από χρόνια ωτίτιδα.

Παρόλα αυτά, δεν είναι βέβαιη η ακριβής ποσότητα πυοκυανίνης που απαιτείται για την πρόκληση παθογένειας από *P. aeruginosa*. Γενικότερα, η σύνθεση της πυοκυανίνης ρυθμίζεται από την αίσθηση του μεγέθους πληθυσμού QS (quorum sensing), τη διαδικασία που συμμετέχει μία κοινότητα βακτηρίων, το μέγεθος της οποίας εξαρτάται από ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, που ενεργοποιούν την έκφραση τοξικών γονιδίων (virulence genes) στα βακτήρια (Lau et al., 2004).

Πρόσφατες μελέτες για το ρόλο της πυοκυανίνης ως μολυσματικό παράγοντα σε εναλλακτικά μοντέλα ξενιστών και ποντίκια, απέδειξαν ότι η PCN παίζει σημαντικό ρόλο στην μόλυνση που προκαλεί η *P. aeruginosa* (Song and Yoon, 2014). Επιπλέον, αποκαλύφθηκαν εξελικτικά μονοπάτια των ευκαρυωτικών κυττάρων, τα οποία αποδείχθηκε ότι διαταράσσονται από την PCN (Lau et al., 2004).

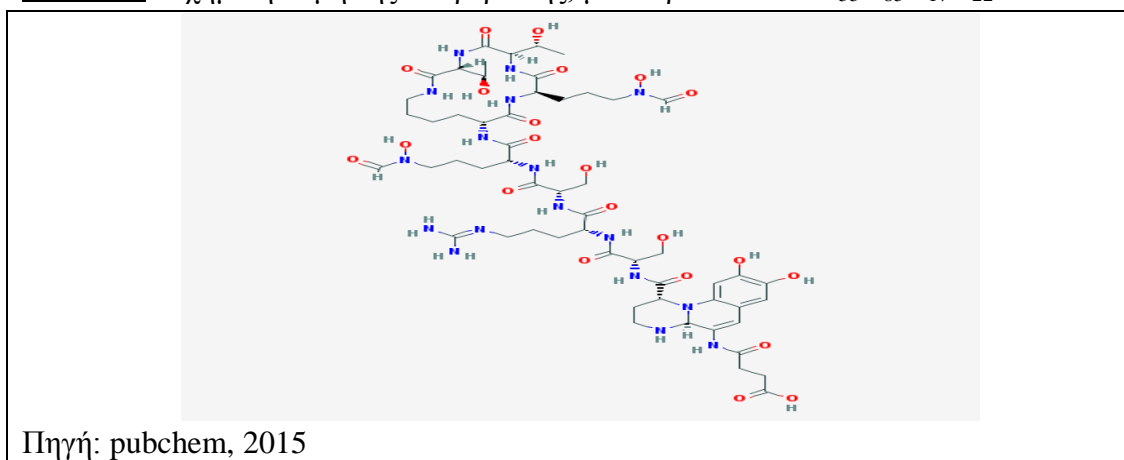
### 1.6.3 Σιδηροφόρα

Η *P. aeruginosa* σε απόκριση στην έλλειψη σιδήρου του υποστρώματός της παράγει ενδογενή σιδηροφόρα υπό μορφή συμπλόκων για την άμεση κάλυψη των αναγκών της σε σίδηρο (Imperi et al., 2009). Αυτά είναι η πυοβερδίνη (Εικόνα 1.3), η πυοχελίνη, συνοδευόμενα από διάφορους άλλους ρυθμιστές πρόσληψης σιδήρου (Sandoz et al., 2007). Συγκεκριμένα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις σιδήρου επάγεται η μεταγραφή διάφορων γονιδίων που συμμετέχουν στην απόκριση σε έλλειψη σιδήρου με τη βοήθεια του συστήματος QS, το οποίο και επάγεται από αυτή. Οι ρυθμιστές του QS, MvfR, LasR/RhlR και VqsR είναι υπεύθυνοι για την επαγωγή γονιδίων που παράγουν σίδηρο (Hazan et al., 2010).

Εκτός από τον θεραπευτικό της ρόλο, η πυοβερδίνη συμμετέχει στον έλεγχο σχηματισμού βιοφίλμ, την επικοινωνία των κυττάρων και την πρόκληση μολυσματικότητας. Με ένα μηχανισμό παραγωγής σημάτων (surface signaling) ρυθμίζει την έκφραση μολυσματικών παραγόντων, όπως την εξωτοξίνη A, την εξωπρωτεάση PrgL, και την ίδια την πυοβερδίνη. Η πυοβερδίνη έχει αποδειχτεί ως μολυσματικός παράγοντας σε πολλά μοντέλα ξενιστών (Ochsner et al., 2002) και στην *P. aeruginosa* έχει αποδειχτεί ότι λειτουργεί ως σηματοδοτικό μόριο (Krona et al., 2013).

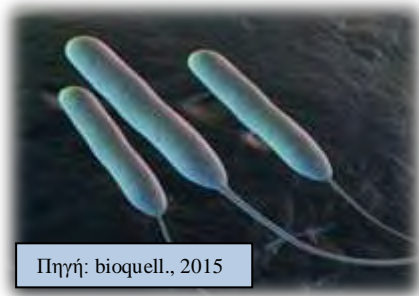
Σύμφωνα με τον Roberts και τους συνεργάτες του, το μέλι Manuka αναστέλλει την παραγωγή σιδηροφόρων (Roberts., 2015).

Εικόνα 3. Η χημική δομή της πυοβερδίνης, με Μοριακό τύπο  $C_{55}H_{85}N_{17}O_{22}$



#### 1.6.4 Κινητικότητα –Motility

Σήμερα, έχουν εντοπιστεί ήδη πολλοί καθοριστικοί παράγοντες υπεύθυνοι για την πρόκληση παθογένειας από *P. aeruginosa*. Το βακτήριο αυτό χαρακτηρίστηκε ως ευκαιριακό, αφού ανταποκρίνεται στις συνθήκες του περιβάλλοντος και ανάλογα με αυτές μολύνουν και σχηματίζουν βιοφίλμ. Η έναρξη της μόλυνσης και ο σχηματισμός βιοφίλμ εξαρτάται από την βακτηριακή προσκόλληση στο περιβάλλον ενός τραύματος, η οποία διευκολύνεται από την μεταβληθείσα κινητικότητα και τις αλληλεπιδράσεις με την κυτταρική επιφάνεια του ξενιστή.

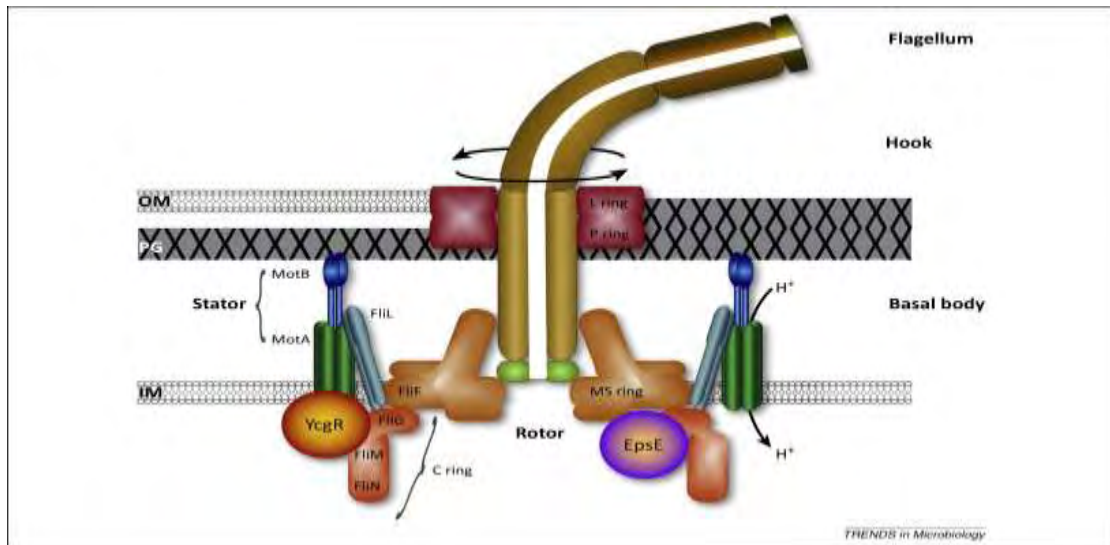


Σε οξείες λοιμώξεις το βακτήριο γίνεται συνήθως επιθετικό και εκκρίνει μια σειρά τοξινών και πρωτεασών με τη συμμετοχή των μαστιγίων και των συστημάτων έκκρισης τύπου III και τύπου IV. Στα αρχικά στάδια μιας δερματικής μόλυνσης, τα βακτηριακά κύτταρα αλληλεπιδρούν με την υποδόρια επιφάνεια, καταλήγοντας σε μία από τις δύο συμπεριφορές:

είτε μετακινούνται είτε προσκολλώνται. Η μετακίνηση συνήθως προηγείται της προσκόλλησης και έτσι πραγματοποιείται η εξάπλωση των βακτηριακών κυττάρων εντός της πληγής, πριν την προσκόλληση και ανάπτυξή τους σε πολυκυτταρική κοινότητα (Εικόνα 1.1). Οι μηχανισμοί κινητικότητας υπηρετούνται από ένα εξελιγμένο χημειοταξικό σύστημα το οποίο δημιουργεί βαθμιδωτές συγκεντρώσεις, και έτσι βοηθά την *P. aeruginosa* να διασχίζει διαφόρων τύπων επιφάνειες είτε συρρέοντας, είτε κολυμπώντας είτε συσπάζοντας, ανάλογα με το σταθερότητα του περιβάλλοντός της (Roberts et al., 2015).

Η *P. aeruginosa* κινείται με ένα μόνο πολικό μαστίγιο, το οποίο συμβάλλει στις μολύνσεις διευκολύνοντας τη βακτηριακή είσοδο και προσκόλληση σε κύτταρα ή υγρές επιφάνειες. Τα βακτηριακά μαστίγια “αγκιστρώνονται” στο κυτταρικό τοίχωμα και τη μεμβράνη μέσω του βασικού τους σώματος που εκτείνεται προς το νήμα μέσω του αγκίστρου (Εικόνα 5.). Το νήμα μαστιγίου αποτελείται από μία απλή πρωτεΐνη, τη μαστιγίνη (flagg) (Lau et al., 2004). Η μαστιγίνη της *P. aeruginosa* (paFliC) ενεργοποιεί την έμφυτη ανοσία και προάγει προσαρμοστικές ανοσοαποκρίσεις ως αντιγόνο. Έχει διαπιστωθεί ότι η τοπική χορήγηση paFliC προστατεύει τραυματισμένους κερατοειδείς από λοίμωξη με *P. aeruginosa*, με την ενεργοποίηση μιας έμφυτης ανοσοαπόκρισης του κερατοειδούς στο ποντίκι (Song and Yoon, 2014).

**Εικόνα 5.** Δομή του μαστιγίου της *P.aeruginosa*: άγκιστρο, βασικό σώμα, νήμα



Ο Roberts και οι συνεργάτες του ταυτοποίησαν διαφορετικές εκφράσεις της δομικής πρωτεΐνης του μαστιγίου FliC παρουσία του μελιού Manuka και συγκεκριμένα, διαπίστωσαν ότι η έκφρασή της μειώνεται με την παρουσία του μελιού αυτού. Αυτό εξηγείται και από την εμφάνιση μειωμένης κινητικότητας *P. aeruginosa* παρουσία αυτού. Τέλος, συμπεραίνεται ότι το swimming (όπως και το swarming) εξαρτάται από το μαστίγιο (Roberts et al., 2015).

## 1.7 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της δράσης ελληνικών μελιών του Ολύμπου από διάφορες φυτικές πηγές, όσον αφορά την πιθανή αναστολή μολυσματικών παραγόντων της *Pseudomonas aeruginosa* παρουσία αυτών. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν 21 δείγματα μελιού της περιοχής του Ολύμπου, ως προς την παραγωγή πρωτεασών, πυοβερδίνης, πυοκυανίνης και της κινητικότητας της *P. aeruginosa* παρουσία αυτών, συγκριτικά με το καλύτερα μελετημένο μέλι στον κόσμο, Manuka 550+ και ένα συνθετικό μέλι που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο.

Και στις 4 πειραματικές διαδικασίες μελετήθηκε αρχικά η ανάπτυξη της *P. aeruginosa* σε θρεπτικά μέσα που ευνοούν την παραγωγή μολυσματικών παραγόντων και στη συνέχεια η επίδραση της προσθήκης των μελιών σε αυτά.

## II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Υλικά και Μέθοδοι

#### 2.1 Υλικά

##### 2.1.1 Δείγματα μελιού από την περιοχή του Ολύμπου

Για την επίτευξη των παραπάνω σκοπών, εκτελέστηκαν πειράματα για τα οποία συλλέχθηκαν δείγματα μελιού από την περιοχή του Ολύμπου, από την πλευρά προς τη θάλασσα, τον κάτω Όλυμπο (όπως Καρυά Ολύμπου, Άνω Λεχώνια), αλλά και από την άλλη πλευρά του Ολύμπου, την περιοχή της Θεσσαλίας (Κρασιά Ελασσόνας, Ελασσόνα, Συκεά Ελασσόνας και άλλα) (Πίνακας 2.1).

Όσον αφορά τη βλάστηση του Ολύμπου, χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ζωνών. Από τα 300 έως τα 500 υπάρχει η ζώνη αείφυλλων σκληρόφυλλων και περιλαμβάνει κυρίως θάμνους και δέντρα χαμηλού ύψους όπως την αριά (*Quercus ilex*), τη γλυστροκουμαριά (*Arbutus adrachnae*), το πουρνάρι (*Quercus coccifera*), την ήμερη κουμαριά (*Arbutus unedo*), τον κέδρο (*Juniperus oxycedrus*). Υπάρχουν επίσης ορισμένα χαρακτηριστικά φυλλοβόλα είδη: ο μελιός (*Fraxinus ornus*), το τρίλοβο σφενδάμι (*Acermonspessulanum*), η κουτσουπιά (*Cercis siliquastrum*), η κοκορεβυθιά (*Pistacia terebinthus*), και άλλα. Από τα 600 μέχρι τα 1400 μέτρα, ζώνη των δασών οξιάς - ελάτης και ορεινών κωνοφόρων, συναντούμε κυρίως τη μαύρη πεύκη (*Pinus nigra var. Pallasiana*) σε συμπαγείς συστάδες. Σε μικρές ομάδες και λόγχμες εμφανίζονται η υβριδογενής ελάτη (*Abies hybridogenus*), η οξυά (*Fagus moesiaca*), σποραδικά η φτελιά (*Ulmus glabra*), ο ίταμος (*Taxus baccata*), η λεπτοκαρυά (*Coryllus avellana*), η κρασιά (*Cornus mas*), η αγριοκερασιά (*Prunus cerasifera*) και μια σημαντική ποικιλία από ποώδη φυτά. Στα φαράγγια και στις ρεματιές συναντάμε πλατάνια (*Platanus orientalis*) και ιτιές (*Salix cinerea*) (Φορέας Εθνικού Δρυμού, 2008).

Τα δείγματα μελιού που συλλέχθηκαν συνοδεύτηκαν με πληροφορίες για την κατά τόπους προέλευσή τους, την φυτική τους προέλευση, την ημερομηνία συγκομιδής και τον παραγωγό του. Η συλλογή τους έγινε σε γυάλινα βαζάκια που φυλάχτηκαν σε δροσερό και σκιερό μέρος .



παραλαβή και φύλαξη δειγμάτων

**Πίνακας 2.1** Χαρακτηριστικά Δειγμάτων μελιών του Ολύμπου

A/A	ΤΥΠΟΣ	ΗΜ.ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΠΑΡΑΓΩΓΟΣ
1	Μέλι Ανθέων	Ιούλιος 2013	Καρυά Ολύμπου	Σαμαράς Γεώργιος
2	αγριοτριφύλλι, και μικρά άλλα ετήσια φυτά		Ελασσόνα Ολύμπου	Γκρίγκα Ιωάννα
3	Μέλι ανθέων		Συκεά Ελασσόνας	Σδάνης Γεώργιος, Σδάνης Νικόλαος
4	Μελισσοκομικά φυτά,τριφύλλι, αγροσπαράγκι, κοντορίγανη, λαδανιά, μελιτώματα	30/7/2013	Παλιαμπέλα Βερδικούσιας Λάρισα	Καρκατσέλας Χαράλαμπος
5		Ιούλιος 2013	Δομένικο Ελασσόνας	Τσιπλικιάρης Κων/νος
6		Ιούλιος 2013	Σκαμινιά	Γιούρι Σολκόβσκι
7			Σαραντάπορο	Χατζή Μαρία
8	Αγριοτριφύλλι ,ακακία, θρούμπη, μέντα, βελανιδιά, μελούρα	Ιούνιος-Ιούλιος 2013	Κρασιά Ελασσόνας	Καραλής Νικόλαος
9			Άζωρο Ελασσόνας	Νταλίπη Χρυσούλα, Μπουρονίκος Δημήτριος
10	Μέλι Ανθέων		Βερδικούσια Λαρίσης	Σβαρνάς Αθανάσιος
11			Καλλιθέα Ελασσόνας	Πουρσανίδης, Κουρδή Ουρανία
12		Ιούνιος 2012	Καρυά Ολύμπου	Σαμαράς Γεώργιος
13	Ανθέων και Καστανιάς	2013	Άνω Λεχώνια -Βόλος	Βλάχου Αλεξάνδρα
14	Ανθέων και κωνοφόρων	2012	Δομένικο Ελασσόνας	Ευάγγελος Αθανάσιος, Ζάγκας
15	Ανθέων	Ιούλιος 2014	Καρυά Ολύμπου	Γεώργιος. Σαμαράς
16	Καστανιάς	2012	Θεσσαλία	Νικολούλη Κατερίνα
17	Παλιούρι, Καβαλαριά, αγριοτριφύλλι, αγριοτριανταφυλλιά, αγριοσπάραγκο, πεύκο-καπνός, ακακία, κρινάκια, κιχύριο-φλόμος,	2014	Δρυμός Ελασσόνας	Αργυρόπουλος Ελευθερίου
18	ακακία, τσάι του βουνού, βατομουριές, έλατο	30/8/2014	Καρυά Ολύμπου	Κατσίβελος Γιώργος
19	Άνθη και κωνοφόρα	Αύγουστος 2014	Άζωρος	Νταλίπη Χρυσούλα
20	Ανθέων και κωνοφόρων	2014	Γαλανόβρυση Ελασσόνας	Καρμίρη Αθηνά- Καρετσός Ανδρέας
21	Άνθη και κωνοφόρα	30/7/2014	Καρυάς Ολύμπου	Γεώργιος Σαμαράς, Γεωπόνος Msc, επόπτης κέντρου μελισσοκομίας Θεσσαλίας



### 2.1.2 Manuka

Το μέλι Manuka που χρησιμοποιήθηκε ήταν το MGO™550+ και UMF 25+. Περιέχει τουλάχιστον 550mg/kg μεθυλγλυοξάλη και για το λόγο αυτό ανήκει στην βαθμική κατηγορία super high. Είναι της εταιρίας Manuka health που εδρεύει στη Νέα Ζηλανδία.



πηγή : manuka health, 2015

### 2.1.3 Συνθετικό μέλι

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

### 2.1.4 Γάλα

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

### 2.1.5 Θρεπτικά υποστρώματα

Χρησιμοποιήθηκαν τα Θρεπτικά Υποστρώματα: LB άγαρ, LB broth, PCA, TSB, King's Broth, Bacteriological agar.

- ❖ Το LB agar που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρίας LabM. και περιέχει :
  - Tryptone 10,0 g/lit
  - Yeast extract 5,0 g/lit
  - Sodium chloride 10,0 g/lit
  - Agar 15,0 g/lit
- ❖ Το LB broth (Luria Bertani) είναι της εταιρίας Lab M. και περιέχει :
  - Tryptone 10,0 g/lit
  - Yeast extract 5,0 g/lit
  - Sodium chloride 10,0 g/lit
- ❖ Το TSB broth είναι της εταιρίας Lab M. και περιέχει :
  - Tryptone (caseine digest U.S.P) 17,0 g/lit
  - Soy peptone 3,0 g/lit
  - Sodium Chloride 5,0 g/lit
  - Dipotassium hydrogen phosphate 2,5 g/lit
  - Dextrose 2,5 g/lit
- ❖ Το PCA είναι της εταιρίας Conda Pronadisa και περιέχει :
  - Digest of casein 5,0g/lit
  - Yeast extract 2,5 g/lit
  - Glycose 1,0g/lit
  - Bacter agar 15,0 g/lit

- ❖ Τα 50 ml King's Broth περιέχουν :
  - 1 g bacteriological peptone (εταιρία Lab M.)
  - 0,5 ml γλυκερόλη (εταιρία SERVA)
  - 0,075g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (εταιρία Applichem panreac)
  - 0,075g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (εταιρία Alfa Aesar)
- ❖ Το Bacteriological agar είναι της εταιρίας biolab και περιέχει :
  - Beef extract 1,0 g/lit
  - Yeast extract 2,0 g/lit
  - Peptone 5,0 g/lit
  - Sodium Chloride 5,0 g/lit

### 2.1.5 Όργανα και αναλώσιμα:

- Binder (Θάλαμος επώασης)
- Επωαστήρας
- Φυγόκεντρος
- Φασματοφωτόμετρο
- Vortex
- Υδατόλουτρο
- Οικιακό ψυγείο
- Καταψύκτης πολύ χαμηλών θερμοκρασιών
- Αυτόματες πιπέτες
- Πιπέτες Pasteur
- Κρίκος εμβολιασμού
- Γυάλινα φιαλίδια (vials)
- Κωνικές φιάλες
- Ογκομετρικός κύλινδρος
- Χάρακας

**Αναλώσιμα :** τιπς, τρυβλία (Petri), eppendorfs (1,5 ml), κυψελίδες

### 2.1.6 Βακτηριακό στέλεχος :

*Pseudomonas aeruginosa* 1773(Ανθεκτική στις καρβαπενέμες)

## 2.2 Μέθοδοι

### 2.2.1. Προετοιμασία καλλιέργειας *P. aeruginosa*

Για την προετοιμασία των καλλιεργειών της *P. aeruginosa* χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες (glycerol stock) που διατηρούνται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

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

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

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

Για τον έλεγχο της αναστολής των πρωτεασών της *P. aeruginosa* χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα PCA και 1,5% αποβουτυρωμένο γάλα. Για τον έλεγχο των μελιών προστέθηκε στο μίγμα PCA και γάλατος 4% ποσότητα μελιού. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε το Manuka Honey (MH) και ως αρνητικό control το συνθετικό μέλι (SH) που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο.

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

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

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

Για τον έλεγχο παραγωγής πυοβερδίνης από την *P. aeruginosa* χρησιμοποιήθηκαν vials με 5 ml θρεπτικό υπόστρωμα King's Broth (για 50 ml King's Broth χρειάζονται 1 g bacteriological peptone, 0,5 ml γλυκερόλη, 0,075g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  και 0,075g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) με την προσθήκη 4% ποσότητας μελιού. Σαν θετικό control χρησιμοποιήθηκε το Manuka Honey (MH) ενώ σαν αρνητικό control το συνθετικό μέλι (SH) που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο. Έπειτα έγινε προσθήκη 5 μl από υγρή καλλιέργεια της *P. aeruginosa* σε  $\text{OD}_{600\text{nm}}=2,0$ .

Στην συνέχεια, τα vials τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 24 h υπό ανάδευση στις 210 rpm.

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

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

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

$$A = e \times b \times C$$

Όπου: A η απορρόφηση στα 405nm  
e ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης =  $1,4 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$   
b= 1cm  
C η συγκέντρωση

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

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

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

Στην συνέχεια, τα vials τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα στους  $37^\circ\text{C}$  για 24 h υπό ανάδευση στις 210 rpm.

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

Έπειτα, 1 ml από κάθε vial τοποθετήθηκε σε erpendorf και μετρήθηκε σε φωτόμετρο η απορρόφηση στα 600 nm για να δούμε πόσο πυκνή είναι η καλλιέργεια. Τα υπόλοιπα 4 ml από τα vials μοιράστηκαν σε erpendorfs για φυγοκέντριση στις 12.000 rpm για 5 min. Ποσότητα 750  $\mu\text{L}$  από το υπερκείμενο από κάθε erpendorf αναμίχθηκε με ίση ποσότητα χλωροφόρμιου. Η κατώτερη μπλε φάση απομακρύνθηκε και αναμίχθηκε με ίση ποσότητα HCl 0,2 N. Παρατηρήθηκε νέος διαχωρισμός φάσεων και αποσπάστηκε η κόκκινη φάση η οποία μετρήθηκε φωτομετρικά στα 520 nm (Hazan et al., 2010, Folch et al., 2013)

Η συγκέντρωση της πυοκυανίνης υπολογίστηκε από τον τύπο  $\text{mg/L} = A \times 17,072$ . Για κάθε δείγμα μελιού έγιναν τρεις επαναληπτικές μετρήσεις με συγκέντρωση 4% κάθε μελιού και η απόδοση της συγκέντρωσης της πυοκυανίνης αναφέρεται στο μέσο όρο των μετρήσεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση τους.

### 2.2.5 Κινητικότητα Βακτηρίων-Δοκιμή κολύμβησης (Swimming Assay)

Η κινητικότητα της *P. aeruginosa* μελετήθηκε σε τρυβλία με LB broth, 0.3% άγαρ και 4% μέλι, όπου εμβολιάστηκαν 5μl υγρής καλλιέργειας *P.aeruginosa*. Συγκεκριμένα, ο εμβολιασμός της έγινε στο κέντρο των τρυβλίων, μέσα στη μάζα του υποστρώματος. Τα τρυβλία, αφέθηκαν για 48 h σε θερμοκρασία 37 °C και μετρήθηκε η ζώνη κινητικότητας.

## 3. Αποτελέσματα

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



Για τη μελέτη της αναστολής του μολυσματικού παράγοντα (πρωτεάση) και κατά πόσο αυτή αναστέλλεται παρουσία μελιού, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που ακολούθησαν οι Wang et al., 2012. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν 21 δείγματα μελιού από την περιοχή του Ολύμπου, η οποία χαρακτηρίζεται από πλούσια χλωρίδα. Όλα τα μέλια του Ολύμπου παρουσίασαν πολύ καλές επιδόσεις ενάντια στον μολυσματικό παράγοντα πρωτεάση. Οι επιδόσεις αυτές συγκρίθηκαν με αυτές του μελιού Manuka που χρησιμοποιήθηκε ως θετικό control και με του συνθετικό μελιού που χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό control. Βέβαια, όλες οι επιδόσεις των μελιών συγκρίθηκαν πρώτα από όλα με το εμβολιασμένο υπόστρωμα με *P. aeruginosa*, χωρίς την παρουσία κάποιου μελιού (Control). Η σύγκριση όλων έγινε με βάση τις ζώνες πρωτεόλυσης που παράγει η *P. aeruginosa*, ανάλογα με το βαθμό διάσπασης την καζεΐνη του γάλακτος. Έτσι, μετρώντας τις ζώνες πρωτεόλυσης σε όλα τα τρυβλία φάνηκε ότι σε σχέση με το Control (Μόνο PCA+ γάλα) όλα τα μέλια εμφάνισαν πολύ καλή ανασταλτική δράση. Το αρνητικό control(συνθετικό μέλι) παρουσίασε ελάχιστη αναστολή, έως καθόλου. Το Manuka ορίστηκε επάξια ως θετικό control, καθώς εμφάνισε μεγαλύτερη ανασταλτική δράση από τα 15 μέλια του Ολύμπου (1,3,4,5,6,6,7,8,10,13,15,16,18,19,20,21). Όμως, πέντε από τα μέλια του Ολύμπου όχι μόνο εμφάνισαν μεγαλύτερη ανασταλτική δράση από το Manuka, αλλά εμφάνισαν μηδενική ζώνη πρωτεόλυσης.

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

Δείγματα	Διάμετρος ζώνης πρωτεόλυσης (mm)
Control	24,73 ± 1
Συνθετικό Μέλι (SH)	22,27 ± 1
Manuka Honey (MH)	3,67 ± 1
1	8,27 ± 0,5
2	0 ± 0
3	8,4 ± 1
4	11,13 ± 1
5	7,33 ± 1
6	8,47 ± 0,5
7	7,93 ± 0,5
8	8,27 ± 0,5
9	0 ± 0
10	6 ± 0,5
11	0 ± 0
12	0 ± 0
13	6,27 ± 1
14	0 ± 0
15	9,93 ± 0,5
16	10 ± 0,5
17	0 ± 0
18	6,13 ± 0,5
19	5,87 ± 0,5
20	6,53 ± 0,5
21	5,13 ± 1

### **Διάγραμμα 3.1** Διαγραμματική απεικόνιση της ανασταλτικής δράσης των μελιών του Ολύμπου



Από τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα, καταλήγουμε στο ότι τα σάκχαρα του μελιού (συνθετικό μέλι,) αναστέλλουν ελάχιστα την παραγωγή πρωτεασών από την *P.aeruginosa*. Αντίθετα το μέλι που περιέχει πλήθος ουσιών, επηρέασε πολύ θετικά την αναστολή της πρωτεάσης.

Αφού όλα τα μέλια παρουσίασαν μεγάλη ανασταλτική δράση σε σχέση με το Control, μπορεί να γίνει ομαδοποίησή τους σε 3 κατηγορίες :

- ✚ Μέλια που εμφάνισαν μεγαλύτερη ανασταλτική δράση από το Manuka με τιμές 0 mm: 2, 9, 11, 12, 14, 17
- ✚ Μέλια που εμφάνισαν μικρότερη ανασταλτική δράση από το Manuka με τιμές από 5,13-10 mm : 1,3,4,5,6,7,8,10,13,15,16,18,19,20
- ✚ Μέλια με παρόμοια δράση με αυτή του Manuka με τιμές από 3,6,7-5,13 : 21

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

Για τη μελέτη της επίδρασης των μελιών του Ολύμπου στην αναστολή του μολυσματικού παράγοντα πυοβερδίνη, εφαρμόστηκε η μέθοδος 2.23 σε 21 μέλια της περιοχής του Ολύμπου. Χρησιμοποιήθηκε σαν Control υγρή καλλιέργεια *P. aeruginosa* σε King's B, χωρίς της παρουσία μελιού, σαν θετικό control χρησιμοποιήθηκε το μέλι Manuka 15+ και σαν αρνητικό control το συνθετικό μέλι.

Από τα πειραματικά αποτελέσματα (Πίνακας 3.2) παρατηρήθηκε ότι το συνθετικό μέλι, είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής πυοβερδίνης από την *P. aeruginosa*. Άρα, τα σάκχαρα όχι μόνο δεν φαίνεται να αναστέλλουν την παραγωγή αυτού του μολυσματικού παράγοντα αλλά αντιθέτως την επάγουν. Όσον αφορά το μέλι Manuka, έδειξε ελάχιστη ανασταλτική δράση, όμοια με 6 μέλια του Ολύμπου (τιμές 0,14-0,12 x10<sup>-4</sup>M). Αντίθετα, κάποια από τα μέλια του Ολύμπου εμφάνισαν αρκετά καλή ανασταλτική δράση σε σχέση με το μέλι Manuka (<<0,13 x10<sup>-4</sup>M) και τα άλλα 6 μέλια. Τέλος, κάποια μέλια του Ολύμπου φαίνεται πως επάγουν την παραγωγή πυοβερδίνης με τιμές 0,17-0,4 x10<sup>-4</sup>M.

Επομένως, τα μέλια του Ολύμπου ύστερα από συγκρίσεις με το control, το θετικό control, και το αρνητικό control μπορούν να καταταχθούν στις παρακάτω 3 κατηγορίες.

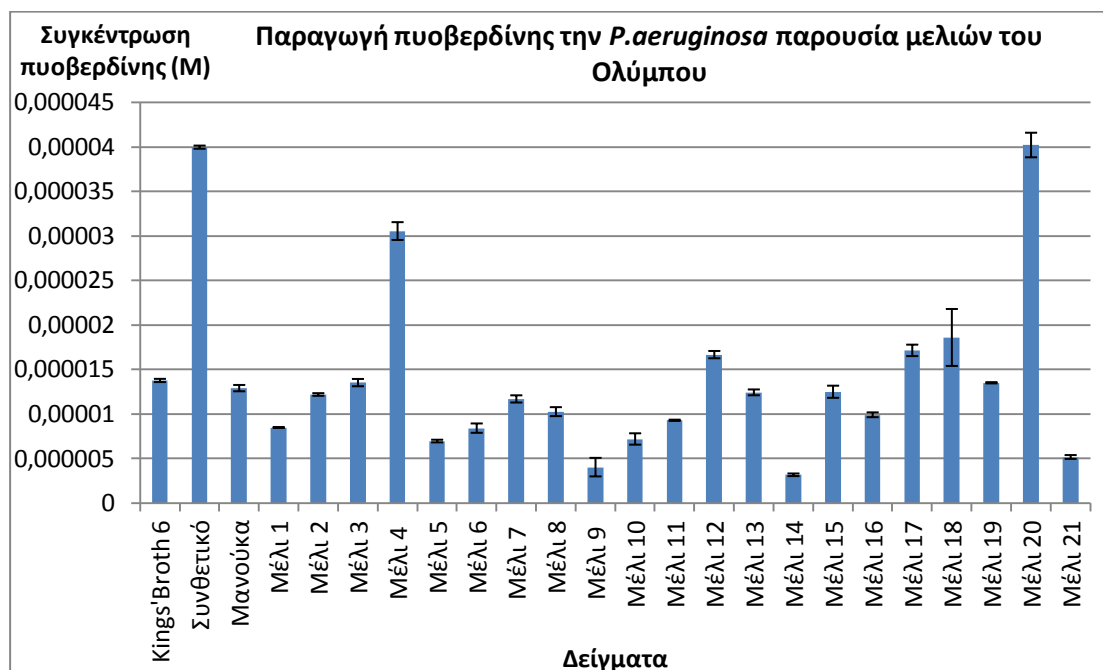
- ✚ Μέλια με ανασταλτική δράση όμοια του Manuka (με τιμές  $0,14-0,12 \times 10^{-4} \text{M}$ ): 2, 3, 7, 13, 15, 19
- ✚ Μέλια με μεγαλύτερη ανασταλτική δράση από το Manuka με τιμές  $0,03-0,1 \times 10^{-4} \text{M}$  : 1, 5, 6, 9, 10, 11, 14, 16, 21
- ✚ Μέλια με άριστη ανασταλτική δράση με τιμές  $0,03-0,052 \times 10^{-4} \text{M}$  : 9, 14, 21
- ✚ Μέλια που επάγουν την παραγωγή πνοβερδίνης ( $0,17-0,4 \text{ M}$ ): Σ, 4, 12, 20



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

Δείγματα	Συγκέντρωση Πνοβερδίνης (M)
Control	$0,14 \times 10^{-4} \pm 0,0002 \times 10^{-4}$
Συνθετικό μέλι (SH)	$0,4 \times 10^{-4} \pm 0,0002 \times 10^{-4}$
Manuka Honey (MH)	$0,13 \times 10^{-4} \pm 0,0004 \times 10^{-4}$
1	$0,085 \times 10^{-4} \pm 0,00004 \times 10^{-4}$
2	$0,13 \times 10^{-4} \pm 0,0002 \times 10^{-4}$
3	$0,14 \times 10^{-4} \pm 0,0004 \times 10^{-4}$
4	$0,31 \times 10^{-4} \pm 0,001 \times 10^{-4}$
5	$0,07 \times 10^{-4} \pm 0,0002 \times 10^{-4}$
6	$0,084 \times 10^{-4} \pm 0,00053 \times 10^{-4}$
7	$0,12 \times 10^{-4} \pm 0,0004 \times 10^{-4}$
8	$0,1 \times 10^{-4} \pm 0,0005 \times 10^{-4}$
9	$0,04 \times 10^{-4} \pm 0,001 \times 10^{-4}$
10	$0,072 \times 10^{-4} \pm 0,00064 \times 10^{-4}$
11	$0,093 \times 10^{-4} \pm 0,0001 \times 10^{-4}$
12	$0,17 \times 10^{-4} \pm 0,0004 \times 10^{-4}$
13	$0,12 \times 10^{-4} \pm 0,00033 \times 10^{-4}$
14	$0,032 \times 10^{-4} \pm 0,00015 \times 10^{-4}$
15	$0,13 \times 10^{-4} \pm 0,0007 \times 10^{-4}$
16	$0,1 \times 10^{-4} \pm 0,0003 \times 10^{-4}$
17	$0,17 \times 10^{-4} \pm 0,00065 \times 10^{-4}$
18	$0,19 \times 10^{-4} \pm 0,0032 \times 10^{-4}$
19	$0,14 \times 10^{-4} \pm 0,00007 \times 10^{-4}$
20	$0,4 \times 10^{-4} \pm 0,0014 \times 10^{-4}$
21	$0,052 \times 10^{-4} \pm 0,00022 \times 10^{-4}$

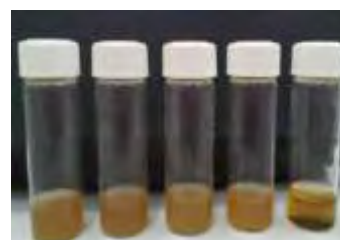
**Διάγραμμα 3.2** Αποτελέσματα της επίδρασης των μελιών στην παραγωγή πυοβερδίνης από την *P. aeruginosa*



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

Για τη μελέτη της αναστολής το μολυσματικού παράγοντα πυοκυανίνη από *P.aeruginosa* παρουσία μελιού, μελετήθηκαν 21 δείγματα μελιού από την περιοχή του Ολύμπου, τα χαρακτηριστικά των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1 Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο που ακολούθησαν οι Hazan et al., 2010, με τη διαφορά ως προς το θρεπτικό υπόστρωμα, LB. Στην παρούσα μέθοδο χρησιμοποιήθηκε το TSB που χρησιμοποίησαν και οι Folch et al., 2013, με σκοπό την μεγαλύτερη παραγωγή πυοκυανίνης από την *P.aeruginosa* απουσία μελιού. Αυτό διαπιστώθηκε ύστερα από διαδοχικές δοκιμές πριν την έναρξη του πειράματος. Σαν θετικό control χρησιμοποιήθηκε το μέλι Manuka, σαν αρνητικό το Συνθετικό μέλι και σαν control το υπόστρωμα TSB με *P. aeruginosa*, δίχως την παρουσία μελιού.

Η παραγωγή πυοκυανίνης διαπιστώθηκε και από το κοκκινωπό χρώμα της καλλιέργειας, μετά από 24 h παραμονής της στον επωαστήρα. Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα, φαίνεται ότι όλα τα μέλια παρουσίασαν ανασταλτική δράση όσον αφορά την παραγωγή πυοκυανίνης, εκτός από το μέλι 9. Η παρουσία του Συνθετικού μελιού έδειξε αρκετά καλή ανασταλτική δράση, παρόμοια με το μέλι 16 και 20 και ελάχιστα μεγαλύτερη από το Manuka. Εξαιρετικά καλή αναστολή έδειξαν τα μέλια του Ολύμπου 11 και 16 (τιμές 0,09 mg/L). Επομένως, τα μέλια που μπορούν να καταταχθούν με σε 4 κατηγορίες :



- ✚ Μέλια όμοια δράση με το Manuka με τιμές 0,15-2,0 mg/L : SH, 2, 10, 20
- ✚ Μέλια με μεγαλύτερη δράση από το Manuka με τιμές <0,15 mg/L: SH, 11, 16
- ✚ Μέλια με μικρότερη δράση από το μέλι Manuka με τιμές >0,15 mg/L : όλα τα υπόλοιπα μέλια 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21
- ✚ Μέλια που επάγουν την παραγωγή της πυοκυανίνης με τιμές >1,58 mg/L : 9

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

Δείγματα	Συγκέντρωση Πυοκυανίνης (mg/L)
Control	1,58 ± 0,1
Συνθετικό μέλι (SH)	0,11 ± 0,1
Manuka Honey (MH)	0,15 ± 0,01
1	1,54 ± 0,15
2	0,22 ± 0,04
3	0,28 ± 0,04
4	0,89 ± 0,02
5	0,33 ± 0,07
6	0,83 ± 0,02
7	0,24 ± 0,04
8	0,84 ± 0,03
9	4,56 ± 0,04
10	0,2 ± 0,02
11	0,09 ± 0,03
12	0,79 ± 0,04
13	0,27 ± 0,03
14	0,63 ± 0,04
15	0,5 ± 0,05
16	0,09 ± 0
17	0,32 ± 0,03
18	0,51 ± 0,07

19	0,35±0,04
20	0,18±0,01
21	0,32±0,03

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



Από τα πειραματικά αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι τα σάκχαρα αναστέλλουν την παραγωγή της πυοκυανίνης σε πολύ καλό βαθμό. Σίγουρα όμως, υπάρχουν και άλλες ουσίες όμως στα μέλια που συντελούν στην παραγωγή αυτού του μολυσματικού παράγοντα, κρίνοντας από τις διάφορες διακυμάνσεις των αποτελεσμάτων.

### 3.4 Αποτελέσματα επίδρασης παρουσία μελιών του Ολύμπου στην κινητικότητα της *P. aeruginosa*.

Για την μελέτη της επίδρασης των μελιών του Ολύμπου στην κινητικότητα της *P. aeruginosa* ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο 2.4. Παρασκευάστηκαν τρυβλία με 1,5% και 0,3% άγαρ, για να δούμε τη διαφορά που προκαλεί στην κινητικότητα της *P. aeruginosa* η παρουσία μελιού. Αφού διαπιστώθηκε η μεγάλη διαφορά της “κόλυμβησης” που εκτελεί το βακτήριο, επιλέχθηκε η συγκέντρωση 0,3% άγαρ για τη μελέτη αυτή. Δηλαδή σε κάθε τρυβλίο υπήρχε 4% μέλι και 0,3% άγαρ.

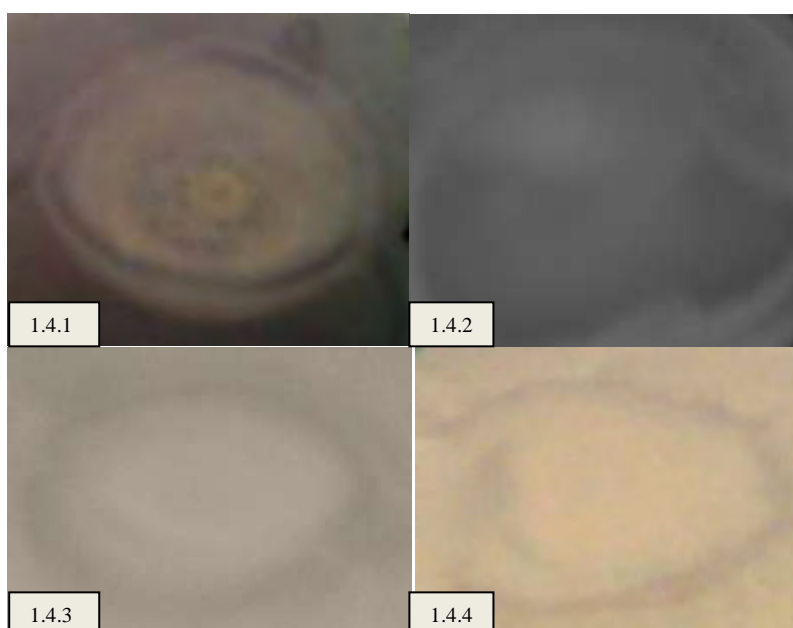
Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το συνθετικό μέλι δεν εμπόδισε την εξάπλωση του βακτηρίου. Αντίθετα, όλα τα μέλια το εμπόδισαν. Το μέλι Manuka εμποδίζει σε αρκετά μεγάλο βαθμό την κινητικότητα της ψευδομονάδας, όμως παρατηρείται ότι παρουσία πολλών από τα 21 δείγματα μελιών του Ολύμπου, παρουσιάζει πολύ μικρότερη κινητικότητα (τύπου swimming). Επομένως, τα μέλια μπορούν να ταξινομηθούν σε 3 κατηγορίες :

- ✚ Μέλια που μειώνουν περισσότερο τη κινητικότητα από το Manuka με τιμές διαμέτρου < 3,9 cm: 16, 17, 18
- ✚ Μέλια με παρόμοια δράση με το Manuka με τιμές διαμέτρου 3,9-4,5 cm: 2, 3, 4, 6, 8, 11, 12, 15, 14, 19, 20, 21
- ✚ Μέλια με μικρότερη δράση από το Manuka με τιμές διαμέτρου > 4,5 cm: 7, 16, 17, 18

**Πίνακας 3.4** Αποτελέσματα επίδρασης των μελιών στην κινητικότητα της *P. aeruginosa* (swimming motility)

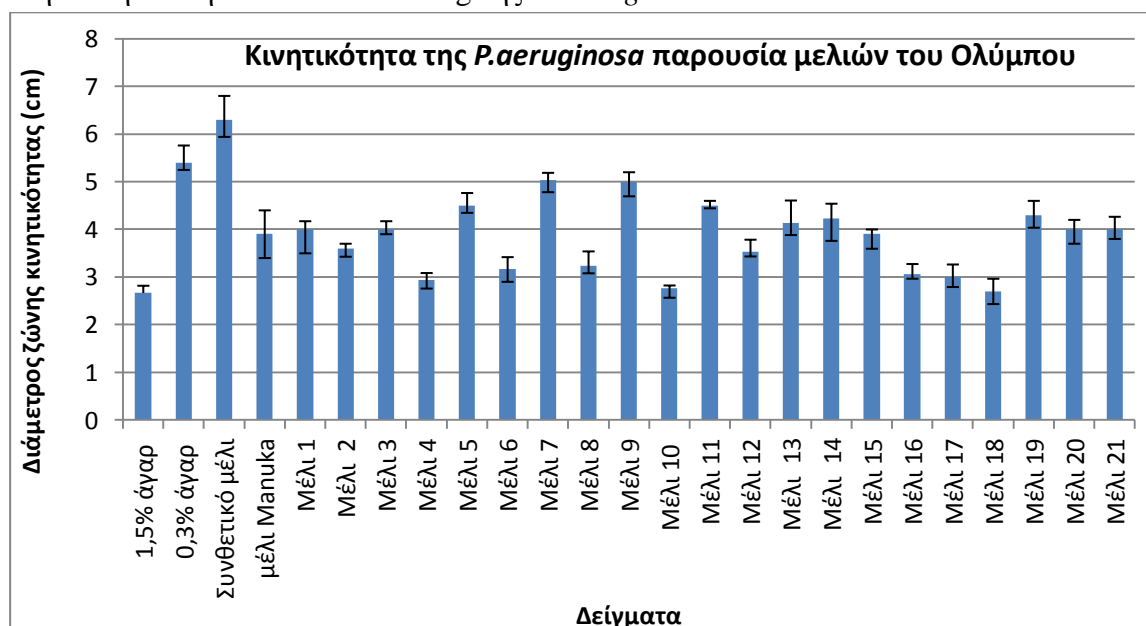
Δείγματα	Διάμετρος ζώνης κινητικότητας (cm)
1,5% άγαρ	2,67± 0,2
0,3% άγαρ	5,4±0,5
Manuka	3,9±0,5
Συνθετικό	6,3 ± 0,3
1	4± 0,2
2	3,6±0,1
3	4 ±0,2
4	2,94±0,2
5	4,5±0,3
6	3,17±0,2
7	5,03± 0,2
8	3,23±0,3
9	5±0,2
10	2,27±0,1
11	4,5± 0,1
12	3,53±0,3
13	4,13±0,5
14	4,23± 0,5
15	3,9±0,1
16	3,07±0,2
17	3±0,3
18	2,7±0,3
19	4,3±0,3
20	4±0,2
21	4±0,3

**Εικόνες 1(1, 2, 3, 4)** Swimming essay της *P. aeruginosa* σε ημιστερέο υπόστρωμα, όπου στην 2 η παρουσία συνθετικού μελιού, στην 1 η παρουσία του μελιού 2 Ολύμπου, στην 3 το μέλι του Ολύμπου 6 και στην 4 το μέλι Ολύμπου 21.



Τελικώς, συμπεραίνεται ότι τα σάκχαρα δεν εμποδίζουν την κινητικότητα της *P. aeruginosa*. Αντίθετα άλλες ουσίες του μελιού, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1(1,2,3,4), παίζουν ρόλο στην αναστολή της κίνησής της. Το μέλι Manuka, εμφάνισε δράση παρόμοια με τη δράση πολλών άλλων μελιών του Ολύμπου (Διάγραμμα 3.4).

**Διάγραμμα 3.4** Διαγραμματική απεικόνιση της επίδρασης των μελιών του Ολύμπου στην κινητικότητα τύπου swimming της *P. aeruginosa*



#### 4. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Η *P. aeruginosa* είναι γνωστή από την συμβολή της σε μεγάλο αριθμό μολύνσεων και χαρακτηρίζεται από ισχυρή ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά (Jensen et al., 2013). Η ανθεκτικότητα αυτή της ψευδομονάδας στα φάρμακα φαίνεται να οφείλεται στα φυσικά και δομικά χαρακτηριστικά του βιοφίλμ που σχηματίζει, το οποίο αποτελείται από ετερογενείς δομές υποπληθυσμών με διακριτές αποικίες και φαινότυπους αντοχής (Bridier et al., 2011).

Η *P. aeruginosa* για να αναπτυχθεί, να πολλαπλασιαστεί, να αποικίσει και να προκαλέσει μόλυνση και συνεπώς παθολογία, χρησιμοποιεί δύο δίκτυα επικοινωνίας με τη βοήθεια των οποίων τροποποιεί τη μολυσματικότητά της, ανάλογα με τα ερεθίσματα του περιβάλλοντος. Δηλαδή, αν το περιβάλλον είναι ευνοϊκό για αυτή (Wang et al., 2012). Όταν το περιβάλλον κριθεί ευνοϊκό από τα δίκτυα επικοινωνίας της αλλά και άλλων αλληλένδετων παραγόντων, παράγει μολυσματικούς παράγοντες, όπως είναι οι πρωτεάσες, σιδηροφόρα όπως η πυοβερδίνη, φεναζίνες όπως η πυοκυανίνη, εξωτοξίνες και ραμονολιπίδια (Benjamin et al., 2013).

Η *P. aeruginosa* για την έναρξη της μόλυνσης προσκολλάται και σχηματίζει βιοφίλμ στο τραύμα. Στην επίτευξη αυτού του στόχου της, τη βοηθάει η κινητικότητά της, και η αλληλεπίδρασή της με την κυτταρική επιφάνεια. Όσον αφορά την κινητικότητα αυτή, υπεύθυνο είναι το μαστίγιο που φέρει, το οποίο τη βοηθά να διασχίζει τις επιφάνειες συρρέοντας, κολυμπώντας ή συσπάζοντας, ανάλογα με την σταθερότητα του περιβάλλοντός της (Roberts et al., 2015).

Οι ερευνητές έδειξαν πως η πυοκυανίνη παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην μόλυνση που προκαλεί η *P. aeruginosa* (Lau et al., 2004). Παράγεται σε υπόστρωμα με χαμηλή συγκέντρωση σιδήρου και παίζει και ρόλο στον μεταβολισμό του σιδήρου (Jayaseelan et al., 2014). Η σύνθεση της πυοκυανίνης ρυθμίζεται από την αίσθηση του μεγέθους πληθυσμού QS (quorum sensing), μέσω της οποίας τα βακτήρια ενεργοποιούνται, ώστε να ρυθμίζουν την έκφραση των μολυσματικών γονιδίων (virulence genes) και να παράγουν τους μολυσματικούς παράγοντες που προαναφέρθηκαν (Lau et al., 2004).

Η απόκτηση του σιδήρου ρυθμίζεται από πλήθος γονιδίων της *P. aeruginosa* και ενεργοποιούνται σε απόκριση της έλλειψης σιδήρου. Το σύστημα ενεργοποίησης και εφοδιασμού σιδήρου συμπεριλαμβάνει σύμπλοκα σιδηροφόρων, όπως είναι η πυοβερδίνη και διάφοροι ρυθμιστές πρόσληψης σιδήρου. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις σιδήρου γίνεται σύνδεση με τις αποθήκες έλλειψης σιδήρου και επάγεται η μεταγραφή διάφορων γονιδίων που συμμετέχουν στην απόκριση σε έλλειψη σιδήρου (Hazan et al., 2010).

Από διάφορες μελέτες, διαπιστώθηκε ότι το μέλι έχει αντιβακτηριακή δράση, και αντιμολυσματική δράση (αποτρέπει τη μόλυνση από *P. aeruginosa*). Μία από τις πιο πρόσφατες μελέτες απέδειξε ότι το μέλι αποτρέπει την μόλυνση από *P. aeruginosa* μέσω δύο διακριτών μηχανισμών: την βακτηριοκτόνο δράση από μόρια του μελιού που δεν έχουν ταυτοποιηθεί ακόμη πλήρως, και εξαρτώνται από την προέλευση του νέκταρ και την αποδιοργάνωση δικτύων του QS της *P. aeruginosa*, από ενώσεις που δεν εξαρτώνται από την προέλευση του νέκταρ (Wang et al., 2012).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να μελετηθεί η δυνατότητα αναστολής της παραγωγής των αναφερθέντων μολυσματικών παραγόντων, παρουσία μελιών του Ολύμπου.

Η πρωτεολυτική δράση (παραγωγή πρωτεασών) της *P. aeruginosa* μελετήθηκε παρουσία 21 δειγμάτων μελιών του Ολύμπου, και συγκρίθηκε με αυτή ενός συνθετικού μελιού, που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο και περιέχει τα πιο κοινά σάκχαρα του μελιού (γλυκόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη, σουκρόζη). Επίσης, συγκρίθηκε με αυτή του μελιού Manuka, το οποίο έχει ερευνηθεί επανειλημμένως ως προς την ικανότητα του να αναστέλλει την παραγωγή πρωτεάσης από *P. aeruginosa*. Από την παρούσα έρευνα, βρέθηκε ότι τα μέλια του Ολύμπου αναστέλλουν τις εξωκυτταρικές πρωτεάσες, οι οποίες είναι κάτω από τον έλεγχο του δικτύου MvfR και του *las* οπερονίου (Déziel et al., 2004). Ο Wang και οι συνεργάτες του (2012) απέδειξαν ότι η το μέλι αλληλεπιδρά με το σύστημα QS της *P. aeruginosa* και αναστέλλει την έκφραση του γονιδίου που παράγει τον μολυσματικό παράγοντα αυτό. Τέλος, φάνηκε ότι τα σάκχαρα αναστέλλουν ελάχιστα έως καθόλου την παραγωγή πρωτεασών, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα του Wang και των συνεργατών του (2012). Το μέλι Manuka παρουσίασε τη μεγαλύτερη αναστολή από όλα τα υπόλοιπα μέλια, πλην τριών μελιών του Ολύμπου 11, 12 και 17 που εμφάνισαν αρκετά μεγαλύτερη.

Η αναστολή της παραγωγής πυοκυανίνης από *P. aeruginosa* παρουσία μελιών του Ολύμπου, μελετήθηκε ακολουθώντας τα πρωτόκολλα που ακολούθησαν οι Hazan et al., 2010 και οι Folch et al., 2013. Από τα πειραματικά αποτελέσματα φαίνεται ότι τόσο τα μέλια του Ολύμπου, όσο και το Manuka, αλλά και το συνθετικό μέλι μείωσαν σε σημαντικά την παραγωγή πυοκυανίνης, που αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα πειραματικά αποτελέσματα του Wang και των συνεργατών του (2012). Αυτό σημαίνει ότι η συγκέντρωση των σακχάρων μειώνει την παραγωγή πυοκυανίνης. Η μείωσή της αυτή συνδέεται με την αναστολή του συστήματος MifR, το οποίο ελέγχει την παραγωγή της (Wang et al., 2012).

Πάραυτα, παρατηρήθηκε το εξής παράδοξο σε ένα μέλι του Ολύμπου · αύξηση της παραγωγής πυοκυανίνης. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει με την ικανότητα της πυοκυανίνης να παράγεται σε υπόστρωμα με χαμηλές συγκεντρώσεις σιδήρου (Jayaseelan et al., 2014) και επομένως μπορεί αυτό το μέλι να έχει ουσίες που να μειώνουν τη διαθεσιμότητα σιδήρου στο υπόστρωμα που καλλιεργήθηκε η *P. aeruginosa*. Αντίθετα, το ίδιο μέλι μείωσε δραστικά την παραγωγή πυοβερδίνης.

Για τη μελέτη της αναστολής παραγωγής πυοβερδίνης, ακολουθήθηκε η μέθοδος που στήθηκε στο εργαστήριο και βρέθηκε ότι τα μέλια του Ολύμπου στην πλειοψηφία τους αναστέλλουν την παραγωγή πυοβερδίνης. Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ελάχιστη αναστολή πυοβερδίνης παρουσία του μελιού Manuka, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα του Roberts και συνεργατών του (2015). Επίσης, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι τα μέλια του Ολύμπου 2, 4, 10, 18 παρουσίασαν άριστη ανασταλτική δράση. Κάποια όμως μέλια του Ολύμπου, όπως και το συνθετικό μέλι παρουσίασαν αύξηση της παραγωγής πυοβερδίνης. Όσον αφορά την επαγωγή της παραγωγής πυοβερδίνης από τα μέλια, αυτό μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει, από την παρουσία σε αυτό ουσιών οι οποίες μειώνουν τη



συγκέντρωση του υποστρώματος σε σίδηρο. Με τη μείωση αυτή ενεργοποιούνται τα συστήματα QS της ψευδομονάδας και ενεργοποιούν τα γονίδια που παράγουν σιδηροφόρα (Hazan et al., 2010). Όμως, βρέθηκε ότι και το συνθετικό μέλι επάγει την παραγωγή πυοβερδίνης, γεγονός που χρήζει περαιτέρω έρευνας.

Τέλος, μελετήθηκε ένας μηχανισμός κινητικότητας, η κολύμβηση (swimming motility), χρησιμοποιώντας πάλι το μέλι Manuka ως θετικό control και το Συνθετικό ως αρνητικό, αλλά και τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς παρουσία μελιού. Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι τα σάκχαρα δεν επηρέασαν την κινητικότητα της *P.aeruginosa*, η οποία και παραμένει όμοια. Αντίθετα τα μέλια μείωσαν αρκετά την κινητικότητά της.

Σύμφωνα με τον Roberts και τους συνεργάτες του (2015), η *P. aeruginosa* παρουσίασε διαφορετική έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με τα μαστίγια παρουσία του μελιού Manuka. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι δεν εκφράζονται κάποιες από αυτές, με αποτέλεσμα τη μειωμένη κινητικότητά της. Το swimming (όπως και το swarming) εξαρτώνται και τα δύο από το μαστίγιο. Όπως διαπιστώθηκε το FliC που είναι δομική πρωτεΐνη του μαστιγίου μειώνει την έκφρασή του με την παρουσία του μελιού (Roberts et al., 2015).

Συμπερασματικά, τα μέλια εκτός από αντιμικροβιακή δράση εμφανίζουν και πολύ καλή αναστολή των μολυσματικών παραγόντων της *P. aeruginosa* και δη αρκετά από τα μέλια του Ολύμπου εμφάνισαν πολύ καλή ανασταλτική δράση σε σύγκριση με το διεθνώς αναγνωρισμένο μέλι Manuka. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν ενθαρρυντικά δεδομένα για την ιατρική χρήση του μελιού.

## 5. Βιβλιογραφία

Abdullah A.A and Clemencia Al., 2009, *Effect of Natural Honey (Produced by African sculata in Guyana) Against Bacteria (Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli and Staphylococcus aureus) and Fungus (Candida albicans)*, Word Journal of Dairy & Food Sciences 4 (1): 73-33

Adams, C., Manley-Harris, M. and Molan, P., 2009. *The origin of methylglyoxal in New Zealand Manuka (Leptospermum scoparium) honey*. Carbohydrate research 344 : 1050-1053.

Alvarez-Suarez Sara Tulipani, Romandini Stefania, Bertoli Enrico, BattinoMaurizio, 2010 *Contribution of honey in nutrition and human health:a review*, Mediterr J Nutr Metab 3:15–23

Anthimidou, E. and Mossialos, D., 2012, *Antibacterial Activity of Greek and Cypriot Honeys against Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa in Comparison to Manuka Honey*. Journal of Medicinal Food 16 (1) : 42-47.

Barakat Rana, Goubet1 Isabelle, Manon Stephen, Berges Thierry & Rosenfeld Eric, 2014, *Unsuspected pyocyanin effect in yeast under anaerobiosis*, MicrobiologyOpen 3 (1): 1–14

Balcht, Aldona; Smith, Raymond, 1994, *Pseudomonas aeruginosa: Infections and Treatment*. Informa Health Care : 83–84.

Benjamin F., DézielE., DoucetN.Gunnar F. Kaufmann, 2013, *Systematic Mutational Analysis of the Putative Hydrolase PqsE: Toward a Deeper Molecular Understanding of Virulence Acquisition in Pseudomonas aeruginosa*, PLOS ONE, 8(9): e73727.

Bridier F., Brissonnet D. G. Greub, V. Thomas, and R. Briandet1, *Dynamics of the Action of Biocides in Pseudomonas aeruginosa Biofilms*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 55 (6) : 2648–2654

Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., He, J., Mindrinos, M. N., Tompkins, R. G., and Hazan Ronen, He Jianxin, Xiao Gaoping, Dekimpe Valerie , Apidianakis Yiorgos, Lesic Biliana, Astrakas Christos, Deziel Eric, Lepine Francois, Rahme Laurence G., 2012, *Homeostatic Interplay between Bacterial Cell-Cell Signaling and Iron in Virulence*, PLoS Pathogens, volume 6 (3): e1000810. doi:10.1371

Henriques F. & Jenkins R. E. & Burton N. F. & Cooper R. A., *The effect of manuka honey on the structure of Pseudomonas aeruginosa*, Eur J Clin Microbiol Infect Dis 30:167–171

Hazan, R., He, J., Xiao, G., Dekimpe, V., Apidianakis, Y., Lesic, B., Deziel, E., Astrakas, C., Lepine, F. and Rahme, L., 2010, *Homeostatic Interplay between Bacterial Cell-Cell Signaling and Iron in Virulence.*, PLoS Pathogens 6 (3) : e1000810

Francesco Imperia, Federica Tiburzi, and Paolo Visca, 2009., *Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in Pseudomonas aeruginosa*, PNAS , 106 (48) : 20440–20445

Jayaseelan Sheeba, Ramaswamy Damotharan, Dharmaraj Selvakumar, 2014, *Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights*, World J Microbiol Biotechnol, 30:1159–1168

Jensen Peter, Briales Alejandra, Brochmann Rikke P., Wang Hengzhuang, Kragh Kasper N, Kolpen Mette, Hempel Casper, Bjarnsholt Thomas, Høiby Niels & Ciofu Oana, 2013, *Pathogens and Disease*, 70 : 440–443

Katsuhiko Hayashi, Aiko Fukushima<sup>1</sup>, Mitsuko Hayashi-Nishino<sup>1</sup> and Kunihiko Nishino, 2014, *Effect of methylglyoxal on multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa*, *frontiers in Microbiology*, 5 (180) : 1

Kronda, J., Cooper, R. and Maddocks, S. (2013). Manuka honey inhibits siderophore production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*, **115** (1), 86-90.

Kwakman, P., te Velde, A., de Boer, L., Vandenbroucke-Grauls, C. and Zaat, S., 2011, *Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity*, *Plos On*, 6 (3), e17709

Kwakman, P., te Velde, A., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, C. and Zaat, S., 2010, *How honey kills bacteria*. *The FASEB Journal* 24 (7) : 2576-2582

Kwakman, P. and Zaat, S., 2012, *Antibacterial Components of Honey*. *IUBMB Life* 64 (1), 48-55.

Lau Gee W., Hassett Daniel J., Ran Huimin and Kong Fansheng, 2004, The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection, *TRENDS in Molecular Medicine*, 10 (12)

Muller, M., 2006, *Premature cellular senescence induced by pyocyanin, a redox-active Pseudomonas aeruginosa toxin*. *Free Radic, Biol. Med.* 41:1670–1677

Manisha Deb Mandal, Shyamapada Mandal, Honey: its medicinal property and antibacterial activity, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2): 154-160

Mossialos, D. and Amoutzias, G., 2007, Siderophores in fluorescent pseudomonads: new tricks from an old dog. *Future Microbiology* 2 (4) : 387-395

Murali Putty, 2007, *Pseudomonas Aeruginosa*, *EMLab*, 5 (3)

McKnight, S., Iglewski, B. and Pesci, E., 2000, *The Pseudomonas quinolone signal regulates rhl quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Bacteriology* 182 (10) : 2702–2708

Ochsner Urs A., Wilderman Paula J., Vasil Adriana I. and VasilMichael L., 2002, *GeneChip expression analysis of the iron starvation response in Pseudomonas aeruginosa: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes*, *Molecular Microbiology* 45 (5) : 1277–1287

Roberts Aled E. L., Maddocks Sarah E. and Cooper Rose A., 2015, *Manuka honey reduces the motility of Pseudomonas aeruginosa by suppression of flagella-associated genes*, *J Antimicrob Chemother*; 70: 716–725

Rahme, L. G., 2004, *Analysis of Pseudomonas aeruginosa 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in the cell-to-cell communication*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101: 1339–1344

Robert Belas, 2014, *Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria*, *Trends in Microbiology* September, 22 (9)

Sherlock, O., Dolan, A., Athman, R., Power, A., Gethin, G., Cowman, S. and Humphreys, H., 2010, *Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa*. *Complementary and Alternative Medicine* 10 (47) : 1-5

Sandoz Kelsi M., Mitzimberg Shelby M., and Schuster Martin, 2007, *Social cheating in Pseudomonas aeruginosa quorum sensing*, journal PNAS, 104 (40) : 15876–15881

Sousa Ana Margarida and Pereira Maria Olívia, 2014, *Pseudomonas aeruginosa Diversification during Infection Development in Cystic Fibrosis Lungs*, *Pathogens*, 3(3) : 680-703

Solano Cristina, Echeverz Maite and Lasa Inigo, 2014, *Biofilm dispersion and quorum sensing*, *Current Opinion in Microbiology* 18: 96–104

Song Wan Seok, Yoon Sung-il, 2014, *Crystal structure of FliC flagellin from Pseudomonas aeruginosa and its implication in TLR5 binding and formation of the flagellar filament*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 444 (2) : 109–115

Tan Hern Tze, Rahman Abdul Rosliza, Gan Siew Hua, Halim Ahmad Sukari, Hassan Siti Asma, Sulaiman Siti Amrah and Kirnpal-Kaur BS, 2009, *The antibacterial properties of Malaysian tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to manuka honey*, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9:34 doi:10.1186/1472-6882-9-34

Wang, R., Starkey, M., Hazan, R. and Rahme, L., 2012, *Honey's ability to counter bacterial infections arises from both bactericidal compounds and QS inhibition*. *Frontiers in Microbiology* 3 (144) : 1-8

White, J.W.Jr., 1993, *Honey, in the hive and the honey bee*. *Dadant and Sons Publication Hamilton-Illinois* : 869-895.

### **Ελληνική Βιβλιογραφία**

Thrasivoulou A, 2012, *Πρακτική Μελισσοκομία, Προβλήματα αιτίες και λύσεις, εκδόσεις Μελισσοκομική Επιθεώρηση*, Θεσσαλονίκη, σελ 262-272

Thrasivoulou A., Manikis I., Tanakaki X., Tsellios D., Karampouyrnioti S., Dimou M., 2002, *Η Ταυτότητα του Ελληνικού Μελιού Α. Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά που στηρίζουν την ποιότητα του Προϊόντος*, Πρακτικά 1<sup>ου</sup> Επιστημονικού Συνεδρίου Μελισσοκομίας-Σηροτροφίας, Αθήνα.

### **Ηλεκτρονικές πηγές**

[http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/ALL/?uri=OJ:JOL\\_2014\\_164\\_R\\_0001\\_file:///C:/Users/USER/Downloads/cxs\\_012e.pdf](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/ALL/?uri=OJ:JOL_2014_164_R_0001_file:///C:/Users/USER/Downloads/cxs_012e.pdf)  
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00144/full>

Φορέας Εθνικού Δρυμού Ολύμπου, 2008  
[http://www.olympusfd.gr/gr/Xlorida\\_Panida.asp](http://www.olympusfd.gr/gr/Xlorida_Panida.asp)

<http://www.chemspider.com/>

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/46936203#section=Chemical-Vendors>  
[http://www.manukahealth.co.nz/mgo\\_manuka\\_honey.cfm](http://www.manukahealth.co.nz/mgo_manuka_honey.cfm)  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/13027?lang=en&region=GR>  
<http://melitehoney.gr/news-and-events/>

*Πηγές Φωτογραφιών των μελιών*

<http://www.melinet.gr/images/one/134>

<http://www.meliparnon.gr/home/>

[http://www.melisokomiki.eu/index.php?route=module/kbm/category&kbm\\_path=7\\_10](http://www.melisokomiki.eu/index.php?route=module/kbm/category&kbm_path=7_10)

<http://www.bees.gr/archives/3096>

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

<http://www.herb.gr/index.php/catalogsearch/result/?q=%CE%AD%CE%BB%CE%B1%CF%84%CE%BF&x=0&y=0>

[tomelissi.wordpress.com](http://tomelissi.wordpress.com)

[aroma-melissas.com](http://aroma-melissas.com)

[www.md.all.biz](http://www.md.all.biz)

(UCSB (UC Santa Barbara Geography / News & Events / Department News, 2015 - *Nation's beekeepers lost 40 percent of bees in 20141*)

<http://www.geog.ucsb.edu/events/department-news/1641/nation-s-beekeepers-lost-40-percent-of-bees-in-2014-15/>

