

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος**  
**Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**  
**«ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»**

**Αδαμοπούλου Άννα**

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



**Λάρισα 2018**

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

**Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:**

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

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

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

## **Ευχαριστίες**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Δημήτρη Μόσιαλο, για την υπομονή που έκανε κατά τη διάρκεια υλοποίησης της πτυχιακής αυτής διατριβής. Όπως επίσης για την πολύτιμη βοήθεια του και καθοδήγηση του και για την επίλυση διαφόρων θεμάτων.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα μέλη της εξεταστικής 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 τη φιλική ατμόσφαιρα, ηθική συμπαράσταση και τη συνεργασία τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα στενά μέλη της οικογενείας μου για τη βοήθεια τους, την υπομονή και τη συνεχή συμπαράσταση τους, την αγάπη και την κατανόηση που έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια αυτή.

Περίληψη .....	7
Abstract .....	9
I.....	ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
.....	10
1. Τι είναι μέλι .....	10
1.1 Σύσταση του μελιού .....	11
1.2 Επιδράσεις στον άνθρωπο .....	13
1.3 Αντιβακτηριακή –αντιμικροβιακή δράση του μελιού.....	16
1.4 Ταυτότητα του ελληνικού μελιού.....	19
1.4.1 Μέλι πεύκου .....	20
1.4.2 Μέλι ελάτης .....	20
1.4.3 Μέλι καστανιάς .....	21
1.4.4 Θυμαρίσιο μέλι .....	21
1.4.5 Ρεικίσιο μέλι .....	22
1.4.6 Μέλι κουμαριάς .....	23
1.4.7 Μέλι Ροδόδενδρου.....	23
1.4.8 Μέλι Ηλίανθου.....	24
1.4.9 Μέλι βαμβακιού .....	24
1.4.10 Μέλι εσπεριδοειδών.....	25
1.5 Μέλι Manuka .....	25
1.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	27
1.7 Μολυσματικοί παράγοντες της <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	29
1.7.1 Κινητικότητα -motility.....	29
1.7.2 Η ελαστάση της <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	31
1.8 Σκοπός της παρούσας μελέτης .....	33
II.....	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
.....	33
Υλικά και Μέθοδοι .....	33
2.1 Υλικά .....	33
2.1.1 Δείγματα μελιών.....	34
2.1.2 Μέλι Manuka .....	35

2.1.3 Όργανα, αναλώσιμα και θρεπτικά υποστρώματα:.....	36
2.1.4 Βακτηριακό στέλεχος .....	36
2.2 Μέθοδοι.....	37
2.2.1 Προετοιμασία καλλιέργειας <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	37
2.2.2. Κινητικότητα βακτηρίων .....	37
2.2.2.1 Twitching κινητικότητα .....	37
2.2.2.2 Ομαδική κινητικότητα(Swarming motility ).....	38
2.2.2.3 Κολυμβητική κινητικότητα (Swimming motility).....	38
2.2.3 Προσδιορισμός ελαστάσης της <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	39
3. Αποτελέσματα.....	40
3.1 Αποτελέσματα της επίδρασης της παρουσίας των μελιών στην κινητικότητα της <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	40
3.1.1 Twitching κινητικότητα.....	40
3.1.2 Ομαδική κινητικότητα(Swarming motility ).....	42
3.1.3 Κολυμβητική κινητικότητα (Swimming motility).....	44
3.2 Αποτελέσματα της επίδρασης της παρουσίας των μελιών στην αναστολή της δραστηριότητας της ελαστάσης της <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	46
4.Συμπεράσματα-Συζήτηση.....	49
5.Βιβλιογραφία.....	51

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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

Όσο περνούν τα χρόνια, τα φυσικά προϊόντα όπως το μέλι συγκεντρώνουν την προσοχή του ιατρικού κόσμου, καθώς η εμφάνιση και η εξάπλωση βακτηριακών στελεχών ανθεκτικών σε πολλά αντιβιοτικά οδηγεί σε μη αποτελεσματική θεραπεία πολλών λοιμώξεων και αυτό έχει οδηγήσει στην επανεξέταση παλαιότερων εναλλακτικών θεραπειών (Mandal, 2010).

Η αντιβακτηριακή δράση του μελιού είναι γνωστή εδώ και πολλά χρόνια. Η δράση του αυτή οφείλεται σε ένα εύρος παραγόντων, όπως η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, το  $H_2O_2$ , η μεθυλγλουοξάλη, το πεπτίδιο bee defensin-1, το χαμηλό pH και οι φαινολικές ενώσεις (Kwakman, 2012, Alvarez-suarez, 2010)

Για την εξυπηρέτηση αυτού του σκοπού, ξεκίνησε η μελέτη των in vitro ιδιοτήτων του έναντι σε παθογόνα βακτήρια όπως η *Pseudomonas aeruginosa*. Τα αποτελέσματα ήταν πολύ ενθαρρυντικά, καθώς το μέλι εμφάνισε έντονη βακτηριοκτόνο δράση ενάντια στο βακτήριο αυτό (Anthimidou and Mossialos, 2013).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να μελετηθεί εάν και κατά πόσο τα μέλια του Ολύμπου, αναστέλλουν την παραγωγή των μολυσματικών παραγόντων (virulence factors) του gram αρνητικού βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* σε σύγκριση με το μέλι Manuka. Ερευνήθηκαν και οι τρεις τύποι κινητικότητας (swimming motility, twitching motility, swarming motility) που ευθύνονται για την ικανότητα προσκόλλησης και αποικισμού και επομένως συμβάλουν στην πρόκληση μολυσματικότητας από *Pseudomonas aeruginosa*. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση των μελιών του Ολύμπου στην κολυμβητική κινητικότητα, σε σύγκριση με την επίδραση του Manuka και διαπιστώθηκε ότι όλα τα μέλια του Ολύμπου εμφάνισαν μεγαλύτερη ανασταλτική δράση από το μέλι Manuka. Επιπλέον μελετήθηκε η twitching κινητικότητα και παρατηρήσαμε ότι όλα τα μέλια έδειξαν πολύ καλή ανασταλτική δράση σε σχέση με το θετικό μας control, την *Pseudomonas aeruginosa* αναπτυσσόμενη απουσία μελιού. Επίσης διερευνήθηκε η ομαδική κινητικότητα της *Pseudomonas aeruginosa* και πραγματοποιήσαμε αρκετά πειράματα με βάση διάφορα πρωτόκολλα αλλά δυστυχώς κανένα δεν μας έδωσε τα επιθυμητά αποτελέσματα.

Τέλος, ερευνήθηκε ένας άλλος μολυσματικός παράγοντας της *Pseudomonas aeruginosa*, η ελαστάση. Η ελαστάση της *Pseudomonas aeruginosa* συνεισφέρει στην παθογένεια της και είναι μια από τις κύριες πρωτεΐνες που εκκρίνεται στο περιβάλλον από πολλά στελέχη αυτού του ευκαιριακού παθογόνου (Gambello, 1991, Kessler, 1994). Από τα πειραματικά αποτελέσματα συμπεράναμε ότι όλα τα μέλια αναστέλλουν τη δραστηριότητα της ελαστάσης σε πολύ καλό βαθμό και με μεγαλύτερη ανασταλτική δράση σε σχέση με το μέλι Manuka.

Συμπερασματικά, τα μέλια Ολύμπου εκτός από αντιμικροβιακή δράση εμφανίζουν και καλή αναστολή των μολυσματικών παραγόντων της *Pseudomonas aeruginosa* και ήδη αρκετά από αυτά 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**

In recent years, many human pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa*, have become resistant to most existing antibiotics. *Pseudomonas aeruginosa*, benefiting from favourable conditions, causes infections that are difficult to treat. The most prominent cases are in-hospital infections, people with extensive burns or cystic fibrosis patients.

Over the years, natural products such as honey have been receiving the attention for their antibacterial and antibiotic properties. As the emergence and spread of bacterial strains, resistant to many modern antibiotics, leads to ineffective treatment of many infections, it is urgent to investigate older alternative therapies (Mandal, 2010).

The antibacterial action of honey has been known for many years. This effect is due to a range of factors such as high concentration of sugars, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, methylglyoxal, bee defensin-1 peptide, low pH and phenolic compounds (Kwakman, 2012, Alvarez-Suarez, 2010)

To serve this purpose, the study of its in vitro properties against pathogenic bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa* began. The results were very encouraging, as honey showed intense bactericidal action against this bacterium (Anthimidou and Mossialos, 2013).

The purpose of the present study was to investigate whether, and to what extent, Olympus' honeys inhibits the production of virulence factors of the gram negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* as compared to Manuka honey. Three kinds of motility were investigated (swimming motility, twitching motility and swarming motility), which are responsible for their ability to adhere and colonize, and thus contribute to the induction of infectivity by *Pseudomonas aeruginosa*. Specifically, the effect of Olympus' honey on swimming mobility was studied, compared to the effect of Manuka, and it was found that all the honey in Olympus had a greater inhibitory effect than Manuka honey. In addition, about twitching mobility, we observed that all honey showed a very good inhibitory effect on our positive control, *Pseudomonas aeruginosa* that grows in the absence of honey. We also investigated the swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* and we contacted several experiments based on several different protocols but unfortunately none gave us desired results.

Finally, another virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*, elastase, was investigated. Elastase of *Pseudomonas aeruginosa* contributes to its pathogenicity and is one of the major proteins secreted into the environment by many strains of this opportunistic pathogen (Gambello, 1991, Kessler, 1994). From the experimental results we concluded that all honeys could reduce elastase's activity to a higher degree and with a greater inhibitory effect than Manuka honey.

In conclusion, Olympus' honeys, apart from antimicrobial activity, also exhibit good inhibition of *Pseudomonas aeruginosa's* virulence factors and several of them have been shown to have a better inhibitory effect than the internationally recognized Manuka honey. These results are encouraging data for the medical use of honey.

# **I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## **1 .Τι είναι το μέλι**

Είναι το μοναδικό γλυκαντικό που προέρχεται κατευθείαν από την φύση χωρίς καμία μεσολάβηση του ανθρώπου.

Μέλι νοείται το τρόφιμο που παράγουν οι μελιτοφόρες μέλισσες, ή αλλιώς αυτές του γένους *Apis mellifera* (F.A.O) από το νέκταρ των ανθέων ή από εκκρίσεις που προέρχονται από ζωντανά μέρη των φυτών ή που βρίσκονται πάνω σε αυτά, τα οποία συλλέγουν, μεταποιούν αναμιγνύουν με δικές τους ουσίες, αποταμιεύουν και αφήνουν να ωριμάσουν μέσα στις κηρήθρες της κυψέλης. Το μέλι μπορεί να είναι ρευστό παχύρρευστο ή κρυσταλλωμένο (Αλεξιάκης,2003).

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



Το μέλι επιπλέον είναι γνωστό για την αντιμικροβιακή του δράση όπως έχει αναφερθεί ήδη από το 1892 (Kwakman,2012). Η σχέση μεταξύ μελισσών και ανθρώπου ξεκίνησε τόσο νωρίς όσο και η εποχή του λίθου. Η πρώτη γραπτή αναφορά για το μέλι ήταν σε μια πλακέτα των Σουμερίων που χρονολογείται από το 2100-2000 π.Χ. και αναφέρουν την χρήση του ως φάρμακο και αλοιφή (Alvarez-Suarez, 2010). Το μέλι από την αρχαιότητα μέχρι τον 18ο αιώνα ήταν το μόνο ζαχαρώδες τρόφιμο για τον άνθρωπο. Η άποψη ότι ασκεί ευεργετική επίδραση γενικά στην υγεία του ανθρώπου ήταν και είναι διαδεδομένη σε όλο τον κόσμο. Χρησιμοποιείται σαν δυναμωτικό, λόγω της γλυκόζης που περιέχει, η οποία είναι άμεσα

αφομοιώσιμη από τον οργανισμό μας. Ασκεί ευεργετική επίδραση στην καρδιά, στο συκώτι και στο πεπτικό μας σύστημα. Επίσης, λόγω της παρουσίας υπεροξειδίου του υδρογόνου και της υψηλής συγκέντρωσης ζαχάρων έχει καλή αντιβακτηριακή δράση (Γούναρη, 2004).

Βρίσκεται ανάμεσα στα φυσικά προϊόντα που έχει χρησιμοποιηθεί για να θεραπεύσει πολλές ασθένειες, έχει χρησιμοποιηθεί μόνο του ή σε συνδυασμό με άλλες ουσίες και χορηγούνται είτε από το στόμα ή τοπικά για την εξάλειψη συγκεκριμένων ασθενειών (Manyi-Loh,2010). Επίσης χρησιμοποιείται για εγκαύματα, καταρράκτη, έλκη, γαστρεντερική θεραπεία κ.α. (Kwakman,2011) και όλα αυτά χάρη στην υψηλή ώσμωση. Το μέλι δημιουργεί ένα υγρό περιβάλλον που θεραπεύει πληγές με την μορφή διαλύματος το οποίο δεν κολλάει στους πληγωμένους ιστούς. Αυτό το υγρό περιβάλλον στην πληγή πιστεύεται ότι εμποδίζει την αποίκιση βακτηρίων και με αυτό τον τρόπο το μέλι εμποδίζει την φλεγμονή και μειώνει τον σχηματισμό εκκρίσεων πιο γρηγορά από τις συμβατικές θεραπείες (Alvarez-Suarez, 2010). Αξίζει να σημειωθεί ότι η μη επεξεργασία του μελιού είναι αυτή που οφείλεται για τις θρεπτικές και θεραπευτικές του ιδιότητες.

## **1.1 Σύσταση του μελιού**

Πρόκειται για ένα γλυκό, παχύρευστο υγρό το οποίο έχει υψηλή περιεκτικότητα ενζύμων. Επίσης περιέχει πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, ορμόνες, οργανικά οξέα και έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες ( Abdullah and Clemencia, 2009).

Το μέλι περιέχει τουλάχιστον 181 ουσίες. Είναι ένα υπέρκορο διάλυμα από πρωτεΐνες, ένζυμα αμινοξέα, οργανικά οξέα, πολυφαινόλες, και ουσίες τύπου καροτενοειδών, βιταμίνες, μεταλλικά στοιχεία , σάκχαρα (Alvarez-Suarez , 2010) και τέλος οι υδατάνθρακες καλύπτουν το 95-97% του ξηρού βάρους του μελιού (Manyi-Loh,2010). Το μέλι αποτελείται κατά 77-84% περίπου από διάφορα σάκχαρα, κυρίως γλυκόζη(32%) και φρουκτόζη(39%), σακχαρόζη(1,5%), μαλτόζη (7%) ,λοιπά σάκχαρα (1%) (Ζερφυρίδης,1998) και περιέχει <18% νερό. Αυτή η υψηλή ποσότητα σακχάρων προκαλεί ισχυρό ωσμωτικό στρες και αποτρέπει την αλλοίωση από μικροοργανισμούς (Kwakman,2012) και έτσι το μέλι διατηρείται στη θερμοκρασία περιβάλλοντος χωρίς προφύλαξη από άποψη μικροβιακών επιμολύνσεων ή θερμοκρασιών διατήρησης(Ζερφυρίδης,1998) .Τα σάκχαρα του μελιού έχουν υψηλή συγγένεια με τα μόρια του νερού με αποτέλεσμα να αφήνουν μικρή ή καθόλου ποσότητα νερού και έτσι έχουμε ως αποτέλεσμα να μην υποστηρίζεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών (βακτήρια και ζύμες).Συνεπώς οι μικροοργανισμοί αφυδατώνονται και τελικά πεθαίνουν (Malika,2004).

Το μέλι περιέχει ένα ένζυμο που λέγεται οξειδάση της γλυκόζης που όταν έρθει σε επαφή με το νερό παράγει H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, το οποίο είναι ένα ήπιο αντισηπτικό ( Abdullah and Clemencia, 2009). 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 διασάση 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(Θρασυβούλου,2012).

Βιταμίνες όπως Κ(φιλοκινίνη), Β1(θειαμίνη), Β2(ριβοφλαβίνη), Β6(πυριδοξίνη) έχουν βρεθεί στο μέλι αλλά γενικά η περιεκτικότητα σε αυτές αλλά και σε μέταλλα είναι μικρή (Alvarez-Suarez, 2010), (περίπου 0.02% του βάρους του) ( Abdullah and Clemencia, 2009) και εξαρτώνται από τη βοτανική και γεωγραφική προέλευση του μελιού(National Honey Board,2003). Η συγκέντρωση των βιταμινών στο μέλι είναι πολύ 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 (Θρασυβούλου,2012).

Το pH του μελιού είναι χαμηλό και κυμαίνεται μεταξύ 3.2 – 4.5 , με κυρίαρχο το γλυκονικό οξύ( Abdullah and Clemencia, 2009).

Το νερό είναι ποσοτικά το 2<sup>ο</sup> πιο σημαντικό συστατικό στο μέλι. Το περιεχόμενο του εξαρτάται από έναν αριθμό περιβαλλοντικών παραγόντων κατά τη διάρκεια της παραγωγής όπως ο καιρός και η υγρασία μέσα στην κυψέλη αλλά και από τις συνθήκες του νέκταρ και τη μεταχείριση του μελιού κατά τη διάρκεια της εξαγωγής και της αποθήκευσης (Molan, 2002).

Οι πρωτεΐνες αποτελούν το 0,5% της μέσης σύστασης του μελιού. Είναι φυτικής προέλευσης, προέρχονται δηλαδή αποκλειστικά από τη γύρη, το νέκταρ και τις μελιτώδεις εκκρίσεις των φυτών από τα οποία τρέφονται οι μέλισσες. Σχεδόν 18, απαραίτητα και μη, αμινοξέα είναι παρόντα στο μέλι. Η προλίνη είναι το κυρίαρχο αμινοξύ και η λυσίνη το 2<sup>ο</sup> επικρατέστερο (Manγι-Loh,2010).

Οι κυριότερες πτητικές ουσίες στο μέλι είναι οι αλκοόλες, κετόνες, αλδεΐδες, οξέα, εστέρες, τερπένια, οργανικά οξέα . Τα παραπάνω έχουν βρεθεί σαν πτητικές ενώσεις σε διαφορετικού τύπου μέλια(Manγι-Loh,2010).

Οι πολυφαινόλες είναι μια άλλη κατηγορία ουσιών οι οποίες είναι βιοχημικοί δείκτες για την πιστοποίηση της αυθεντικότητας των γεωγραφικών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του μελιού. Αυτές οι ουσίες περιλαμβάνουν φαινολικά οξέα(βενζοϊκά και κινναμωνικά οξέα) και φλαβονοειδή τα οποία συνεισφέρουν σημαντικά στην αντιοξειδωτική ικανότητα του μελιού (Gheldoh,2002).

Επιπλέον τα ιχνοστοιχεία του μελιού είναι απαραίτητα συμπληρωματικά στοιχεία για τον άνθρωπο. Στο μέλι 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.

Επιπρόσθετα, στο μέλι υπάρχουν ρυθμιστικές ουσίες οι οποίες επηρεάζουν διάφορες λειτουργίες των οργάνων. Ως παράδειγμα, θέτουμε την ακετυλοχολίνη η οποία βρίσκεται στο προϊόν και είναι απαραίτητος νευροδιαβιβαστής τόσο στο συμπαθητικό όσο και στο παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα.

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 (Θρασυβούλου,2012).

## **1.2 Επιδράσεις στον άνθρωπο**

Το μέλι έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλούς πολιτισμούς για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες ήδη από την αρχαιότητα ( Abdullah and Clemencia, 2009).Είναι γνωστό για την αντιμικροβιακή του δράση και χρησιμοποιούνταν για διάφορες θεραπείες ασθενειών αλλά και πληγών (Wang,2012). Έχει χρησιμοποιηθεί μόνο του ή σε συνδυασμό με άλλες ουσίες και χορηγείται είτε από το στόμα ή τοπικά πάνω στην πληγή για την αντιμετώπιση μολύνσεων . Με την έλευση των αντιβιοτικών, η κλινική εφαρμογή του μελιού μειώθηκε στην δυτική ιατρική, αν και σε πολλούς πολιτισμούς συνέχισε να χρησιμοποιείται (Kwakman, 2010). Παρολ'αυτά, η υπερβολική χρήση των αντιβιοτικών ,η εμφάνιση ανθεκτικών βακτηρίων ,το υψηλό κόστος , η μη διαθεσιμότητα κάποιων συμβατικών φαρμάκων και η στρόφη της επιστημονικής κοινότητας σε πιο φυσικές μεθόδους αντιμετώπισης ασθενειών, προσέδωκε εκ νέου το ενδιαφέρον της μοντέρνας ιατρικής για το μέλι ως εναλλακτική θεραπεία(Manyi-Loh, 2010).

Η μη επεξεργασία του μελιού είναι αυτή που προσφέρει στο μέλι τις σημαντικές του ιδιότητες ( Abdullah and Clemencia, 2009).Για άριστη αντιβακτηριακή δράση , το μέλι θα πρέπει να αποθηκευτεί σε ξηρό, δροσερό, και σκοτεινό περιβάλλον και να καταναλώνεται φρέσκο (Alvarez-Suarez, 2010).

Το μέλι είναι όξινο και χάρη στην ιδιότητα του αυτή δεν υπάρχει ανάπτυξη βλαβερών μικροοργανισμών. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η οξύτητα του μελιού αποτελεί έναν σημαντικό αντιβακτηριακό παράγοντα, αλλά αν το μέλι αραιωθεί το pH δεν θα είναι τόσο χαμηλό και η οξύτητα του μπορεί να μην είναι αποτελεσματική σε διάφορα βακτήρια. Όταν αραιώνεται το μέλι υπάρχει μία αύξηση στο pH του διαλύματος λόγω του υψηλού pH του νερού. Για αυτό το λόγο η οξύτητα του μελιού μειώνεται και έτσι μειώνεται και η αντιμικροβιακή δράση του μελιού ενάντια στους μικροοργανισμούς .Παρατηρήθηκε ότι μη αραιωμένο μέλι ήταν πιο αποτελεσματικό ενάντια σε *E.Coli* ενώ αραιώση 50% ήταν πιο αποτελεσματική ενάντια σε *Pseudomonas aeruginosa* ( Abdullah and Clemencia, 2009).

Η αντιοξειδωτική δράση του μελιού οφείλεται σε συστατικά που έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες (Manyi-Loh, 2010). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν βλαβερές επιδράσεις στα τρόφιμα (λιπιδική οξείδωση στο κρέας, ενζυμική αμαύρωση στα φρούτα και λαχανικά)καθώς και δυσμενείς επιδράσεις στην υγεία όπως

χρόνιες ασθένειες και καρκίνο. Το μέλι ασκεί την αντιοξειδωτική του δράση με το να αναστέλλει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών ,αντίδραση που καταλύεται με μεταλλικά ιόντα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός. Φλαβονοειδή και πολυφαινόλες τα οποία αποτελούν κοινά συστατικά του μελιού έχουν το δυναμικό να περιορίζουν τα μεταλλικά ιόντα σε συμπλέγματα ,εμποδίζοντας τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών σε πρώτο επίπεδο (Manji-Loh,2010). Το μέλι περιέχει υψηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών τα οποία έχουν τη δυνατότητα να προστατέψουν τις πληγές των ιστών από τις ελεύθερες ρίζες οι οποίες ίσως παράγονται από το υπεροξειδίο του υδρογόνου (Molan,1999) . Οι ουσίες που υπάρχουν φυσικά στο μέλι είναι τα φλαβονοειδή ,τα φαινολικά ,κάποια ένζυμα(οξειδάση της γλυκόζης ,καταλάση ) ,ασκορβικό οξύ, ουσίες τύπου καροτένιου, οργανικά οξέα, προϊόντα αντίδρασης Maillard και τέλος αμινοξέα και πρωτεΐνες και συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα του μελιού (Alvarez-Suarez, 2010).Η αντιοξειδωτική ικανότητα ποικίλει και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την πηγή των λουλουδιών πιθανόν λόγω των διαφορών στο περιεχόμενο του φυτού σε διγενείς μεταβολίτες και ενζυμική δραστηριότητα (Gheldof,2003).

Η αναλγητική, επουλωτική και αντιφλεγμονώδης δράση του μελιού ήταν γνωστή στους αρχαίους, οι οποίοι το χρησιμοποιούσαν για να θεραπεύσουν κάθε είδους τραύμα είτε από ασθένεια είτε από τραυματισμό. Είναι ήδη γνωστό πως με την επάλειψη των πληγών με μέλι παρατηρείται υποχώρηση της φλεγμονής, υποχώρηση του οιδήματος γύρω από την πληγή και μεγάλη ελάττωση του πόνου. Η αντιφλεγμονώδης δράση του έχει αποδειχθεί με βιοχημικές αναλύσεις, έρευνες σε πειραματόζωα και κλινικές μελέτες . Ο Hamzaoglu ανέφερε πως η ανάπτυξη του όγκου σε ποντίκια μειώθηκε από την εφαρμογή του μελιού προτείνοντας ότι η φυσικοχημική δράση του μελιού μείωσε τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου στο περιβάλλον του όγκου και τα αντιοξειδωτικά αυτού μπορούν να εμποδίσουν την εξάπλωση των μεταστατικών κυττάρων (Alvarez-Suarez , 2010). Η φλεγμονή αποτελεί φυσιολογική αντίδραση του οργανισμού σε κάθε πληγή. Αν, ωστόσο, είναι εκτεταμένη ή παραμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα μπορεί να προκαλέσει σοβαρές επιπλοκές στην υγεία όπως την παραγωγή ελευθέρων ριζών .Αυτές μπορούν να βλάψουν σε μεγάλο βαθμό και να διασπάσουν τις πρωτεΐνες ,τα λιπίδια ,τα νουκλεϊκά οξέα τα οποία είναι απαραίτητα συστατικά στη λειτουργία των κυττάρων(Manji-Loh, 2010). Επίσης έχει παρατηρηθεί η θεραπευτική του ιδιότητα σε μετεγχειρητικές πληγές, όπου οι υπόλοιπες 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)

Το μέλι έχει δείξει βακτηριακή δράση ενάντια σε εντεροπαθογόνους μικροοργανισμούς όπως *Salmonella* ,*Shigella*,*E.Coli* (Alvarez-Suarez , 2010).Ο Alnaqdy(2005) σε μια in vitro μελέτη έδειξε ότι το μέλι εμπόδισε την προσκόλληση της *Salmonella* στα βλεννογόνα επιθηλιακά κύτταρα .Η προσκόλληση είναι το αρχικό στάδιο της ανάπτυξης των βακτηριακών μολύνσεων στο γαστρεντερικό σύστημα .

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(Alvarez-Suarez , 2010).

Η παρατεταμένη κατανάλωση μελιού από άτομα που πάσχουν από καρδιακές διαταραχές, έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της κατάστασής τους .Η δράση αυτή οφείλεται στην αποθήκευση του γλυκογόνου στους μύες της καρδιάς και στην ακετυλοχολίνη η οποία διευρύνει τις στεφανιαίες αρτηρίες και δυναμώνει τη λειτουργία της καρδιάς(Θρασυβούλου,2012).Επίσης, σε διαβητικούς ασθενείς το μέλι προκάλεσε σημαντικά χαμηλότερη αύξηση της γλυκόζης του πλάσματος από ότι η δεξτρόζη της ζάχαρης (Alvarez-Suarez , 2010).

Το μέλι είναι ένας δυνατός αναστολέας του παράγοντα που προκαλεί πεπτικά έλκη και γαστρίτιδα ,τον *Helicobacter Pylori* (Alvarez-Suarez, 2010). Η συμβατική θεραπεία για την αντιμετώπιση του *Helicobacter Pylori* δεν είναι καθόλου ικανοποιητική .Οι θεραπείες με το μέλι μπορεί να είναι χρήσιμες για την αντιμετώπιση του συγκεκριμένου βακτηρίου και in vitro μελέτες έχουν δείξει ότι το μέλι παρουσιάζει μια αντιβακτηριακή δράση ενάντια στο *Helicobacter Pylori* και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με αντιβιοτικά για την εξάλειψη του (Manyi-Loh,2010).

Σε συγκέντρωση 30-50%, το μέλι έχει αποδειχθεί ότι είναι ανώτερο σε σχέση με συμβατικά αντιβιοτικά για τη θεραπεία των μολύνσεων του ουροποιητικού(Alvarez-Suarez et al., 2010). Σε συγκεντρώσεις μελιού 50% βρέθηκε ότι η *Pseudomonas aeruginosa* και *E.Coli* αναστάλθηκε η δράση τους .Όμως αυτή η συγκέντρωση δεν ήταν αποτελεσματική για *S.aureus* και *Candida albicans*. Η έρευνα έδειξε ότι το μέλι περιορίζει τους μύκητες αλλά όταν αραιώνεται 50% και 30% το μέλι χάνει την αποτελεσματικότητά του ενάντια στους μύκητες ( Abdullah and Clemencia, 2009). Το μέλι είναι ικανό να σκοτώσει βακτήρια ακόμα και στην πιο ανθεκτική κατάσταση των biofilms και έτσι αποδεικνύεται πιο αποτελεσματικό από οποιοδήποτε συχνά χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό (Wang,2012).

Άλλες σημαντικές επιδράσεις του μελιού σχετίζονται με τους ολιγοσακχαρίτες. Οι ολιγοσακχαρίτες έχουν πρεβιοτικά αποτελέσματα παρόμοια με τους φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες . Οι ολιγοσακχαρίτες έχουν αναφερθεί ότι προκαλούν μια αύξηση στον πληθυσμό των *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* ,τα οποία είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση μιας υγιούς εντερικής μικροχλωρίδας στον άνθρωπο (Alvarez-Suarez , 2010). Για την ακρίβεια ο *Lactobacillus spp.* προστατεύει το σώμα από μολύνσεις όπως η Σαλμονέλλωση και το *Bifidobacterium spp.* περιορίζει την υπερανάπτυξη των ζυμών και παθογόνων βακτηρίων στα εντερικά τοιχώματα και ίσως μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης του καρκίνου του παχέος εντέρου (Manyi-Loh ,2010).

Το μέλι έχει συστατικά με αντικαρκινικές ιδιότητες και στις αντικαρκινικές αυτές ουσίες συγκαταλέγονται τα καφεϊκά οξέα που υπάρχουν σε αυξημένες ποσότητες στο μέλι. Σε πρόδρομες επιστημονικές μελέτες βρέθηκε ότι τα οξέα αυτά εμποδίζουν την ανάπτυξη σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων του εντέρου και ιδιαίτερα εστιάζονται σε έναν τύπο καρκίνου που ονομάζεται αδενοκαρκίνωμα (Θρασυβούλου,2012).

Λαμβάνοντας υπόψιν τη μεγάλη θρεπτική του αξία (303kcal/100gr) και τη γρήγορη απορρόφηση των υδατανθράκων το μέλι είναι ένα τρόφιμο κατάλληλο για τα άτομα όλων

των ηλικιών .Όταν καταναλώνεται από το στόμα ,οι υδατάνθρακες του είναι εύπεπτοι και μεταφέρονται γρήγορα στο αίμα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ενεργειακά αποθέματα από το ανθρώπινο σώμα .Για αυτό το λόγο το μέλι συνίσταται κυρίως σε παιδιά και αθλητές για να τους δώσει ενέργεια (Alvarez-Suarez , 2010, Θρασυβούλου,2012).

Υπάρχουν ωστόσο και περιπτώσεις στις οποίες το μέλι μπορεί να δημιουργήσει και προβλήματα στον ανθρώπινο οργανισμό υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Αυτές είναι α) σε βρέφη ως πιθανή αιτία αλλαντίασης από το *Clostridium botulinum* όπου τα σπόρια του κλωστριδίου της αλλαντίασης έχουν την ικανότητα να βλαστάνουν στον εντερικό σωλήνα βρεφών ηλικίας μικρότερης του ενός έτους και να παράγουν το δηλητηριώδες τους, β) με την κατανάλωση δηλητηριωδών μελιών όπου σπανιότατα από κάποια συγκεκριμένα φυτά παράγονται μέλια τα οποία προκαλούν αίσθημα δυσφορίας και ναυτίας (Θρασυβούλου,2012) γ) πιθανολογούμενη εμφάνιση αλλεργικών αντιδράσεων ή μακροχρόνιων προβλημάτων υγείας λόγω της κατανάλωσης μελιού που έχει προέλθει από μεταλλαγμένα φυτά (Γούναρη,2004).

## **1.2 Αντιβακτηριακή –Αντιμικροβιακή δράση του μελιού**

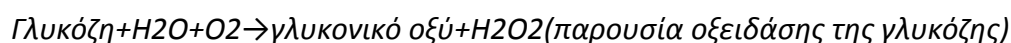
Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού, όπως αναφέρθηκε, είναι γνωστή εδώ και πολλά χρόνια και είναι πολύ σημαντική ιδιαίτερα στην περίπτωση όπου το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου είναι εξασθενημένο και δεν μπορεί να αμυνθεί απέναντι σε μικροβιακές μολύνσεις (Manji-Loh, 2010). Η αντιβακτηριακή δράση μεταξύ διαφορετικών μελιών είναι μεταβλητή και εξαρτάται κυρίως από την βοτανική, εποχιακή και γεωγραφική προέλευση (Anthimidou and Mossialos, 2013 ).Το μέλι έχει δείξει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς όπως *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella dublin*, *Shigella dysenteriae* και αναστέλλει την ανάπτυξη αναερόβιων βακτηρίων . Το μέλι έχει βακτηριοστατική και βακτηριοκτόνο δράση και όταν εφαρμόστηκε κατευθείαν σε αναπτυσσόμενους πληθυσμούς της *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*, *Candida albicans*, ο πληθυσμός τους αναστάλη (Anthimidou and Mossialos, 2012 Abdullah and Clemencia, 2009). Ο ακριβής μηχανισμός της αντιμικροβιακής δράσης του μελιού δεν είναι τελειώς κατανοητός. Παράγοντες που συνεισφέρουν στην αντιμικροβιακή δράση των μελιών είναι η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων , το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, η μεθυγλυοξάλη, το πεπτιδίο bee defensin-1 και το χαμηλό pH (Kwakman,2012,Alvarez-Suarez , 2010).



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

I. Υπεροξειδίο του υδρογόνου

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου για πολλά χρόνια θεωρείτο ως ο κύριος ανασταλτικός παράγοντας του μελιού στην ανάπτυξη των βακτηρίων και παράγεται μόνο όταν το μέλι αραιωθεί(Θρασυβούλου,2012) .Η οξειδάση της γλυκόζης προστίθεται στο νέκταρ από τις μέλισσες, μετατρέπει τη γλυκόζη σε υπεροξειδίο του υδρογόνου και γλυκονικό οξύ υπό αερόβιες συνθήκες (Kwakman,2012).



Το  $\text{H}_2\text{O}_2$  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 , 2010). Η καταλάση βρέθηκε σε μικρές ποσότητες στο μέλι και επιταχύνει την αντίδραση διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου:  $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$ . Το επίπεδο του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ένα μέλι καθορίζεται από τα αντίστοιχα επίπεδα της οξειδάσης της γλυκόζης και της καταλάσης (Weston,2000).

Η περιεκτικότητα του μελιού σε  $\text{H}_2\text{O}_2$  παραλλάσει ανάλογα με τη βοτανική του προέλευση: (Γούναρη,2004)

✓ Είδος μελιού		μg $\text{H}_2\text{O}_2$ /gr
1. Βαμβάκι	→	292,2
2. Μελίτωμα	→	185,6
3. Καστανιάς	→	180,5
4. Ανθόμελο άνοιξης	→	97,0
5. Θυμαριού, Μέντας	→	57,5
6. Πορτοκαλιάς	→	4,3
7. Ανθόμελο φθινοπώρου	→	3,5
8. Ανθόμελο καλοκαιριού	→	1,0

## II. Μεθυγλυκοξάλη

Υψηλές συγκεντρώσεις μεθυγλυκοξάλης έχουν βρεθεί στο μέλι Manuka. Σχηματίζεται από τα σάκχαρα κατά τη θέρμανση ή την παρατεταμένη αποθήκευση τροφίμων και ποτών που περιέχουν υδατάνθρακες. Η μεθυγλυκοξάλη είναι η κύρια υπεύθυνη ουσία για την μη υπεροξειδική αντιμικροβιακή δράση του μελιού Manuka. Οι ερευνητές εξουδετερώνοντας τη μεθυγλυκοξάλη στο μέλι Manuka, παρατήρησαν ότι σταμάτησε η δράση του ενάντια στον *S.aureus* και σταδιακά μειώθηκε στον *Bacillus subtilis* αλλά δεν είχε καμία επίδραση ενάντια στην *E. coli* και την *P. aeruginosa* (Kwakman, 2012).

## III. Bee defensin-1

Το αντιβακτηριακό πεπτίδιο bee defensin-1 ταυτοποιήθηκε αρχικά στο Revamil source (RS) μέλι. Το πεπτίδιο αυτό παράγεται από τον υποφαρυγγικό αδένα της μέλισσας, ο οποίος χρησιμοποιείται στην παραγωγή του μελιού. Έχει ισχυρή δράση αλλά μόνο ενάντια στα Gram + βακτήρια συμπεριλαμβανομένου *Bacillus Subtilis*, *S.aureus*, *Paenibacillus larvae*. Η συγκέντρωση του αντιβακτηριακού πεπτιδίου διαφέρει από μέλι σε μέλι και έχει βρεθεί ότι δρα ενάντια στον *Paenibacillus larvae*, την αιτία της Αμερικανικής σηψιγονίας.

## IV. Σάκχαρα

Τα δυο κυριότερα συστατικά του μελιού είναι τα σάκχαρα (81%) και το νερό (17%) και η σύνθεση τους παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιμικροβιακή δράση του μελιού και ποικίλλει ανάλογα με την προέλευση του νέκταρ (Wang, 2012). Αυτή η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων προκαλεί ισχυρό ωσμωτικό στρες και αποτρέπει την αλλοίωση από μικροοργανισμούς επειδή τα μόρια των σακχάρων έχουν υψηλή συγγένεια με τα μόρια του νερού και έτσι τα βακτήρια έχουν πολύ μικρή ποσότητα νερού για να μπορέσουν να αναπτυχθούν (Molan, 1999). Άρα τα σάκχαρα αποτελούν ισχυρό αντιμικροβιακό παράγοντα (Kwakman, 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).

## V. pH

Άλλος παράγοντας που σχετίζεται με την αντιμικροβιακή δράση του μελιού είναι η οξύτητα του. Η φυσική οξύτητα του μελιού μπορεί να αναστείλει πολλούς παθογόνους μικροοργανισμούς. Το pH του μελιού είναι χαμηλό και κυμαίνεται μεταξύ 3.2 – 4.5, με κυρίαρχο το γλυκονικό οξύ (Abdullah and Clemencia, 2009).

#### VI. Άλλες ουσίες

Οι φαινολικές ενώσεις που προέρχονται από το νέκταρ των φυτών διαπιστώθηκε επίσης πως είναι από τους σημαντικούς μη υπεροξειδικούς αντιβακτηριακούς παράγοντες του μελιού. Έχουν ταυτοποιηθεί διάφορες από αυτές, αλλά δεν έχει ξεκαθαριστεί ακόμη η ακριβή συμβολή της καθεμίας στην αντιβακτηριακή δράση του μελιού. Επίσης το μέλι περιέχει λυσοζύμη και φλαβονοειδή που φαίνεται ότι παίζουν ρόλο στην αντιμικροβιακή δράση του μελιού (Alvarez-Suarez, 2010). 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).

### **1.4 Ταυτότητα ελληνικού μελιού**

Με τον όρο ταυτότητα εννοούμε το σύνολο των χαρακτηριστικών που ορίζουν μια συγκεκριμένη κατηγορία αμιγούς μελιού. Ως αμιγές ορίζεται το μέλι εκείνο που με βάση τα χαρακτηριστικά του κατατάσσεται σε μια συγκεκριμένη κατηγορία συγκεκριμένης φυτικής προέλευσης.

Τα συστατικά του μελιού που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση του μελιού, χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες.

Στην πρώτη ανήκουν τα γνωστά φυσικοχημικά και μικροσκοπικά χαρακτηριστικά του μελιού που στηρίζουν κυρίως την ταυτότητα του προϊόντος βάσει των νομοθετημένων ποιοτικών κριτηρίων όπως είναι τα σάκχαρα, τα ένζυμα, η HMF, η αγωγιμότητα, η οξύτητα, το φάσμα των γυρεόκοκκων και άλλα. Τα χαρακτηριστικά αυτά με την βοήθεια των γυρεόκοκκων μπορούν να δώσουν και την βοτανική προέλευση των μελιών.

Στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν ενώσεις που βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, προέρχονται από τη χλωρίδα της περιοχής και μπορούν να δώσουν πληροφορίες για τη γεωγραφική προέλευση των αμιγών κατηγοριών μελιού. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι πτητικές ενώσεις, τα φλαβονοειδή, τα αμινοξέα, ο συνδυασμός γυρεόκοκκων κ.α.

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

- Μέλια ανθέων: πορτοκαλιάς, θυμαριού, ευκάλυπτου, δεντρολίβανου, λεβάντας, λυγαριάς, ακακίας είναι μερικά από τα μέλια που προέρχονται από το νέκταρ που παράγουν τα αντίστοιχα φυτά.

- Μέλια μελιτώματος: το μέλι του πεύκου και του ελάτου είναι μερικά από τα μέλια που προέρχονται τα αντίστοιχα φυτά ( Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990).

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

#### **1.4.1 Μέλι πεύκου**

Το 65% περίπου της συνολικής παραγωγής μελιού στην Ελλάδα είναι πευκόμελο. Το μέλι προέρχεται από τις μελιτώδεις εκκρίσεις του εντόμου *Marchalina hellenica* γνωστό ως "βαμβακάδα", εργάτης, μικρόβιο ή παράσιτο του πεύκου. Ο εργάτης βρίσκεται σε αρκετές περιοχές της χώρας όπως στην Θάσο, Χαλκιδική, Εύβοια, Σκόπελο κλπ.(Αλεξάκης,2003).

Το πευκόμελο έχει υψηλή συγκέντρωση τέφρας, υψηλό pH και αγωγιμότητα και χαμηλά ανάγοντα ζάχαρα. Η νέα οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης (101/2001 E.C) η οποία ισχύει από τον Αύγουστο του 2003 καταργεί τα ανάγοντα ζάχαρα και αντί αυτών χρησιμοποιεί το άθροισμα της γλυκόζης και της φρουκτόζης, στο οποίο τα ελληνικά πευκόμελα ανταποκρίνονται. Τα υπόλοιπα αγορανομικά χαρακτηριστικά του δεν παρουσιάζουν κάποια ιδιομορφία.



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 (Thrasivouli , 2002).

#### **1.4.2 Μέλι από έλατο**

Αποτελεί τη μικρότερη ποσότητα στο σύνολο της ετήσιας παραγωγής των ελληνικών μελιών 5% και όπως του πεύκου έτσι και αυτό το μεγαλύτερο μέρος του προκύπτει από μελιτώματα 65-70%. Κυρίως, μέλι ελάτου έχουμε από τα όρη, εκεί όπου φύονται τα έλατα. Όρη Πελοποννήσου, Πάρνωννα, Παρνασσό, Πίνδο κλπ. (Αλεξάκης,2003) όπου συναντάται η ελάτη η κεφαλληνιακή η οποία καλύπτει ιδιαίτερα μεγάλες εκτάσεις

Με βάση τον Santas(1983,1988) στα ελληνικά είδη ελάτης, παρασιτούν τα κακκοειδή *Physokermes hemicryphus* & *Eulecanium sericeum*, και οι αφίδες μελιτώδεις εκκρίσεις

εκμεταλλεύσιμες από τις μέλισσες. Το σημαντικότερο από τα έντομα αυτά είναι το *P. hemicyrphus* το οποίο παρασιτεί στην ευρωπαϊκή και κεφαλληνιακή ελάτη, όπου οι αποδόσεις μπορούν να φθάσουν έως 30 κιλά μελιού να μελίσι.



Το μέλι ελάτης είναι από τις κατηγορίες ελληνικού μελιού με ιδιαίτερα καλή γεύση και χαρακτηριστική εμφάνιση, που το κάνει να ξεχωρίζει. Λόγω του χαμηλού ποσοστού γλυκόζης, δεν κρυσταλλώνει γεγονός που το κάνει περιζήτητο για ανάμιξη σε εμπορικούς τύπους (Thrasinou et al, 2002). Το χρώμα είναι πολύ σκούρο, με παραλλαγές ανάλογα με την περιοχή προέλευσης του. Είναι αντιαναιμικό, αντισηπτικό και διουρητικό, το μέλι αυτό είναι εξαιρετικά πλούσιο σε ιχνοστοιχεία όπως το φώσφορο, το κάλιο, το ασβέστιο, το θείο, το μαγνήσιο, ο ψευδάργυρος, το βόριο, ο σίδηρος (Henri Clement, 2002).

### **1.4.3 Μέλι καστανιάς**

Παράγεται από νέκταρ και τις μελιτώδεις εκκρίσεις της Καστανιάς, που αποτελεί ένα αξιόλογο μελισσοκομικό φυτό και αρκετά διαδεδομένο στην ορεινή ζώνη της χώρας μας. Στη Μακεδονία συλλέγεται κυρίως στο Άγιο Όρος.

Οι μελιτώδεις εκκρίσεις παράγονται από την αφίδα *Myzocallis castanicola* που συναντάται στην κάτω επιφάνεια των φύλλων αλλά και πάνω στα εχινόμορφα κύπελα που περιβάλλουν τους καρπούς. Οι μελιτώδεις εκκρίσεις αρχίζουν τον Μάιο και συνεχίζονται μέχρι τον Ιούλιο ή λίγο αργότερα.



Το ελληνικό μέλι καστανιάς δεν διαφέρει από το αντίστοιχο μέλι της ίδιας βοτανικής προέλευσης που παράγεται σε άλλες χώρες. Όλα χαρακτηρίζονται από υψηλές τιμές pH, 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 (Thrasivoulou et al, 2002). Το μέλι παραμένει υγρό για πολλούς μήνες και έχει τη φήμη ότι ευνοεί την κυκλοφορία του αίματος, αναγνωρίζεται σήμερα για τις επουλωτικές του ιδιότητες. Είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία: ,μαγνήσιο, μαγγάνιο και βάριο (Henri Clement,2002).

#### **1.4.4 Θυμαρίσιο μέλι**

Από τους 12.000 περίπου τόνους που παράγει ετήσια η Ελλάδα οι 1.000, αυτό θα πει πως βρισκόμαστε στο ποσοστό 10% που είναι θυμαρίσιο. Θεωρείται ότι είναι άριστης ποιότητας εξαιτίας του εξαιρετικού αρώματος του και της γεύσης του. Παράγεται κυρίως στα νησιά αλλά και σε όλη την ηπειρωτική χώρα όπου συναντάμε όλα τα είδη θυμαριού.

Έχει ευχάριστη γεύση αλλά μερικές φορές λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σε φρουκτόζη δίνει αίσθηση καψίματος στον λάρυγγα. Το άρωμα του είναι ευχάριστο και χαρακτηριστικό.



Έχει αναφερθεί πως το θυμαρίσιο μέλι είναι τονωτικό, έχει αντισηπτικές ιδιότητες αυξάνει την ενεργητικότητα και τις φυσικές δυνάμεις του ανθρώπου. Έχει χαρακτηριστικό ανοιχτό χρώμα και κρυσταλλώνει σε διάστημα 6 μέχρι 18 μήνες ανάλογα με τον αμιγή του χαρακτήρα(Thrasivoulou , 2002).Λόγω του έντονου αρώματος και της μεγάλης ζήτησης του ,οι έμποροι το αναμειγνύουν με άλλα μέλια. Μικρή ποσότητα 5% θυμαρίσιου μελιού αρκεί για να δώσει σε όλη την παρτίδα το άρωμα του θυμαριού(Αλεξάκης,2003).

#### **1.4.5 Ρεικίσιο μέλι**

Στην Ελλάδα υπάρχουν 4 φυτά της οικογένειας των Ερεικωδών από την νεκταροέκκριση των οποίων παράγονται αντίστοιχοι τύποι μελιών. Η φθινοπωρινή ερείκη γνωστή ως σούσουρα, η ανοιξιιάτικη ερείκη, η Κουμαριά και το Ροδόδεντρο. Το μέλι που παράγεται από τα 4 αυτά φυτά έχει διαφορετικές ιδιότητες.



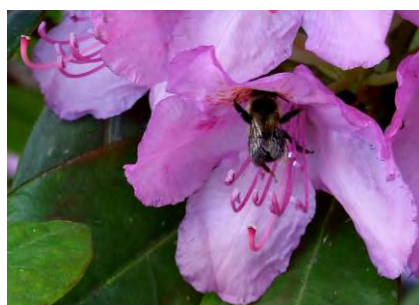
Το χρώμα του είναι κοκκινωπό, η οσμή και η γεύση του χαρακτηριστική. Λόγω της υψηλής φυσικής περιεκτικότητας κρυσταλλώνει πολύ γρήγορα και για αυτό δεν προσφέρεται για ανάμειξη με άλλα μέλια και για δημιουργία εμποριών τύπων. Χρειάζεται προσοχή γιατί ξινίζει πιο εύκολα από τα υπόλοιπα λόγω της υψηλής του υγρασίας και της μεγάλης του περιεκτικότητας σε ζαχαρομόκητες. Θεωρείται υψηλής θρεπτικής αξίας και τονωτικό για τον άνθρωπο (Thrasivoulu , 2002).

#### **1.4.6 Μέλι κουμαριάς**



Το μέλι κουμαριάς είναι τονωτικό για τα μελίσσια είναι όμως υπόπικρο για τον άνθρωπο και με περιορισμένη εμπορική αξία. Συνήθως δεν τρυγιέται αλλά αφήνεται στις κυψέλες για το ξεχειμώνιασμα του μελισσιού. Θεωρείται ιδανικό για τους διαβητικούς γιατί έχει τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε σάκχαρα. Κρυσταλλώνει σε 2-4 μήνες. Δεν υπάρχουν στοιχεία για τη χημική του σύνθεση και τις φυσικές του ιδιότητες (Thrasivoulu , 2002).

#### **1.4.7 Μέλι ροδόδενδρου**



Από τα 400 είδη Ροδόδεντρου, 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. (Thrasivoulu, 2002). Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, οι περιπτώσεις δηλητηρίασης από μέλι είναι τόσο σπάνιες, που θα μπορούσε κανείς να τις κατατάξει μάλλον σε γενική αλλεργική αντίδραση (Olszowy, 1977, Krochmal, 1994). Το χρώμα του είναι πολύ ανοιχτό σε υγρή κατάσταση και σχεδόν άσπρο σε στερεή. Έχει απαλό άρωμα, φρουτώδης και διακριτικά ξυλώδης γεύση (Henri Clement, 2002).

#### **1.4.8 Μέλι ηλίανθου**

Ο ηλίανθος καταλαμβάνει σημαντικές καλλιεργούμενες εκτάσεις στη χώρα μας και δίνει μεγάλη παραγωγή μελιού. Σε μέτριες χρονιές ένα μελίσσι μπορεί να συλλέξει από 2,4 έως 15 κιλά μέλι ηλίανθου με δυνατότητα μέχρι και 40 κιλά.



Από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του επισημαίνεται το υψηλό ποσοστό υγρασίας το οποίο συμβάλει στο γρήγορο ξίνισμα, η χαμηλή συγκέντρωση διαστάσης που το κάνει ευαίσθητο στην θέρμανση και οι υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης που είναι αιτία της γρήγορης και ανομοιόμορφης κρυστάλλωσης.

Είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατροφή μας (Thrasivoulu, 2002).

#### **1.4.9 Μέλι βαμβακιού**

Το βαμβακόμελο είναι μία από τις αμιγείς κατηγορίες μελιού που παράγει η Ελλάδα σε μεγάλες ποσότητες. Τα τελευταία χρόνια η παραγωγή του περιορίστηκε σημαντικά λόγω των μεγάλων απωλειών που προκαλούνται στις μέλισσες από τα φυτοφάρμακα, καθώς επίσης και από τις μικρές αποδόσεις νέκταρ των νέων καλλιεργουμένων αυτογόνιμων ποικιλιών βαμβακιού.





Οι μέλισσες συλλέγουν νέκταρ από ανθικά και εξωανθικά νεκτάρια του φυτού καθώς επίσης και από μελίτωμα που εκκρίνεται από διάφορα έντομα τα οποία παρασιτούν την καλλιέργεια. Συχνά οι μέλισσες δείχνουν προτίμηση στα εξωανθικά νεκτάρια και στο μελίτωμα το οποίο είναι πλουσιότερο σε ζάχαρα.

Είναι ανοιχτόχρωμο και όταν κρυσταλλώσει γίνεται γαλακτόχρωμο. Η γεύση του είναι χαρακτηριστική βουτυρώδης. Έχει την μεγαλύτερη βακτηριοστατική δράση σε σχέση με τα άλλα είδη μελιού λόγω της υψηλής συγκέντρωσης του σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (Thrasivoulu, 2002).

#### **1.4.10 Μέλι εσπεριδοειδών**



Το μέλι εσπεριδοειδών είναι αρωματικό με ιδιαίτερα καλά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και με γρήγορη ταχύτητα κρυστάλλωσης. Χαρακτηριστικό της αμιγούς αυτής κατηγορίας μελιού είναι η χαμηλή φυσική περιεκτικότητα στο ένζυμο διασάση. Το άθροισμα γλυκόζης και φρουκτόζης βρίσκεται πολλές φορές πάνω από το όριο 60%. (Οδηγία 101/2001Ε) (Thrasivoulu, 2002).

#### **1.5 Μέλι Manuka**

Το μέλι Manuka προέρχεται από το φυτό *Leptospermum scoparium* γηγενές της Νέας Ζηλανδίας και νοτιοανατολικής Αυστραλίας (Anthimidou and Mossialos, 2012). Έχει υψηλή συγκέντρωση της αντιβακτηριακής ουσίας μεθυλγλυοξάλη αλλά η συνεισφορά αυτής καθώς και άλλων αντιβακτηριακών ουσιών είναι άγνωστη. Γενικά η MGO μπορεί να σχηματιστεί από σάκχαρα κατά την διάρκεια της θέρμανσης, ή παρατεταμένης

αποθήκευσης των υδατανθράκων που περιέχονται σε τρόφιμα (Kwakman,2011). Η MGO στο μέλι Manuka σχηματίζεται από την μετατροπή διυδροξυακετόνης(DHA) που είναι παρούσα σε υψηλές συγκεντρώσεις στο νέκταρ των λουλουδιών Manuka (Adams, 2009). Είναι άγνωστο πώς το DHA σχηματίζεται στα δέντρα και γιατί είναι παρόν σε τόσο μεγάλες ποσότητες στο μέλι Manuka. Συγκεντρώσεις του MGO σε ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα, κρασί, μπύρα και ψημένος καφές έχουν αναφερθεί τιμές από 3 έως 47mg/kg, ενώ 828mg/kg έχουν βρεθεί στο μέλι Manuka (τόσο μεγάλες συγκεντρώσεις MGO δεν έχουν παρατηρηθεί σε κανένα άλλο τρόφιμο) (Kwakman,2011). Τώρα πλέον η MGO αναγράφεται στην συσκευασία του μελιού Manuka. Για παράδειγμα, MGO 100 σημαίνει ότι 100 mg μεθυλγλυοξάλης περιέχονται σε 1 Kg μελιού.



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 (Mavric,2008). 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). Το μέλι Manuka έχει εγκριθεί επίσημα για ιατρικούς σκοπούς (Sherlock, 2010). Υπάρχουν πολλές μελέτες που καταγράφουν την αντιβακτηριακή δράση του Manuka ενάντια σε κλινικά σημαντικά βακτήρια όπως το ανθεκτικό στη μεθικιλίνη *S.aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia Cepacia* ή στοματικά βακτήρια που προκαλούν τερηδόνα (Anthimidou and Mossialos,2012). Έχει παρατηρηθεί ότι ο *B. Subtilis* (βακτήριο που προκαλεί αλλοιώσεις στα τρόφιμα) είναι εξαιρετικά ευαίσθητος στο μέλι και ο *B. Cereus* σκοτώθηκε από το μέλι Manuka. Επιπλέον η *E. Coli* και η *Pseudomonas aeruginosa* είναι σαφώς λιγότερα ευαίσθητα στο μέλι Manuka σε σχέση με *S.aureus* και *B. Subtilis* (Kwakman, 2011).

Εκτός από το μέλι Manuka υπάρχουν και άλλα μέλια με αντιβακτηριακή δράση όπως το μέλι Revamil source (RS) (Kwakman et al., 2011).

Το μέλι Revamil source (RS) παράγεται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες σε θερμοκήπια. Οι παράγοντες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την αντιμικροβιακή δράση αυτού του μελιού είναι η υψηλή συγκέντρωση σε σάκχαρα, του υπεροξειδίου του υδρογόνου, η μεθυλγλυοξάλη, το χαμηλό pH και το κατιονικό αντιμικροβιακό πεπτίδιο η bee - defensin 1. Μαζί με το μέλι Manuka έχουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση και είναι εγκεκριμένα για

επάλειψη σε πληγές. Το μέλι Revamil source έδειξε πιο γρήγορη δράση ενάντια σε *B.subtilis* ,*E.coli* και *Pseudomonas aeruginosa*. Το μέλι Revamil source περιέχει υψηλά επίπεδα bee defensin-1 και υπεροξειδίου του υδρογόνου ενώ ισχύουν τα αντίστροφα για το μέλι Manuka(Kwakman , 2011)

### **1.6 *Pseudomonas aeruginosa***

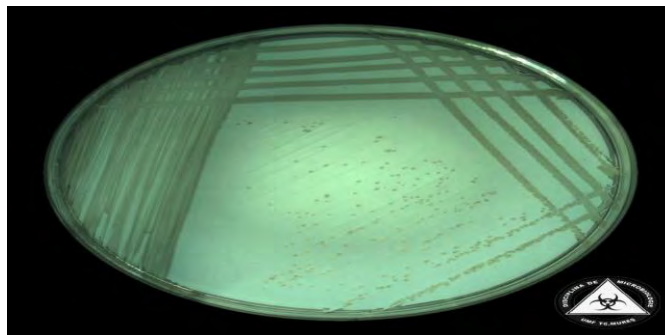
Είναι ένα Gram αρνητικό, αερόβιο, μη σπορογόνο, ραβδοειδές βακτήριο με πλάτος 0,5-0,8μm που ανήκει στη βακτηριακή οικογένεια *Pseudomonadaceae*. (Murali Putty, 2007). Αν και οι ψευδομονάδες ταξινομούνται στους αερόβιους μικροοργανισμούς ορισμένες από αυτές χρησιμοποιούν τα νιτρικά, αντί του οξυγόνου ,ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων. Αυτή η διαδικασία της αναερόβιας αναπνοής αποδίδει σχεδόν τόση ενέργεια, όση και η αερόβια αναπνοή (Tortora,2009). Μπορεί να αναπτύσσεται σε κοινά θρεπτικά υλικά και η ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης είναι μεταξύ 37°C μπορεί όμως να αναπτυχθεί και σε 42°C. Έχει μια χαρακτηριστική γλυκιά γεύση σαν σταφύλι (Patterson, 2009). Το 1882 ο Carle Gessard, ανακάλυψε την *Pseudomonas aeruginosa* κατά τη διάρκεια ενός πειράματος για την επιστημονική του μελέτη: «Από το μπλε και το πράσινο χρώμα των επιδέσμων»(Lister,2009) Στο πείραμα αυτό ταυτοποιήθηκε το βακτήριο μέσω των υδατοδιαλυτών χρωστικών ουσιών του, οι οποίες έδωσαν κυανοπράσινη χρώση μετά υπό την έκθεσή τους σε υπεριώδης ακτινοβολία (UV). Αργότερα, η χρώση αυτή αποδόθηκε στην πυοκυανίνη, μια χρωστική ουσία της *Pseudomonas aeruginosa*. Πολλά είδη ψευδομονάδων εκκρίνουν εξωκυτταρικές, υδατοδιαλυτές χρωστικές ουσίες που διαχέονται στα θρεπτικά υλικά. (Tortora ,2009). Η *Pseudomonas aeruginosa* εκκρίνει την χρωστική πυοκυανίνη (μπλε-πράσινο), την πυοβερδίνη (κίτρινο, πράσινο και φθορισμού), την πυομελανίνη (ανοικτό καφέ) και την πυορουβρίνη (κόκκινο- καφέ) (Murali Putty, 2007). Η *Pseudomonas aeruginosa* συχνά βρίσκεται σε υγρά περιβάλλοντα και μπορεί να βρεθεί στο νερό, στο έδαφος ακόμα και στα φρούτα, λαχανικά και λουλούδια (Patterson, 2009). Η *Pseudomonas aeruginosa* έχει πολύ απλές διατροφικές απαιτήσεις. Συχνά παρατηρείται «καλλιέργεια σε απεσταγμένο νερό», το οποίο είναι απόδειξη των ελάχιστων διατροφικών αναγκών της. Είναι ανθεκτική σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων και ήπιων αντισηπτικών(Murali Putty, 2007).



Η *Pseudomonas 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, 2013, Wang, 2012). Αυτό συμβαίνει διότι έχει την ικανότητα να σχηματίζει βιοφίλμ, τα οποία αυξάνουν την αντίστασή της σε θεραπευτικές αγωγές (Jensen, 2013). Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι από τους γνωστότερους παραγωγούς βιοφίλμ και τα κυριότερα σηματοδοτικά μόρια είναι οι λακτόνες της ομοσερίνης. Καθώς αυτά τα μόρια συσσωρεύονται, λειτουργούν ως χημειοτακτικοί παράγοντες που έλκουν άλλα κύτταρα της *Pseudomonas aeruginosa* από το άμεσο περιβάλλον μέσω ενός μηχανισμού που ονομάζεται αίσθηση μεγέθους πληθυσμού, γεγονός το οποίο καταλήγει στον σχηματισμό του βιοφίλμ. Η *Pseudomonas aeruginosa* συνδέεται με τη νόσο της κυστικής ένωσης, κατά την οποία σχηματίζεται ένα ιδιαίτερα ανθεκτικό βιοφίλμ στους πνεύμονες, που προκαλεί συμπτώματα πνευμονίας (Madigan, 2011).

Το QS (Quorum sensing) είναι ένας όρος που περιγράφει τη βακτηριακή επικοινωνία που χρησιμοποιείται από πολλά βακτηριακά είδη και βασίζεται στην παραγωγή και ανίχνευση διάχυτων μορίων σήματος (Atkinson & Williams, 2009). Αυτά τα μόρια ενεργοποιούν σήματα, με αποτέλεσμα συλλογικές αλλαγές στην συμπεριφορά. Παρεμπόδιση του QS διαταράσσει τα αμυντικά μέτρα και την ρύθμιση της παθογένειας, με αποτέλεσμα την αποδυνάμωση μιας λοίμωξης που καθιστά αυτά τα μόρια πιο ευάλωτα σε βακτηριοκτόνα στοιχεία. Επιπλέον, αφού το QS δεν είναι απαραίτητο για την επιβίωση, μια στρατηγική για αναστολή του θα μειώσει την μολυσματικότητα ελαχιστοποιώντας ταυτόχρονα την επιλογή για αντίσταση (Wang, 2012). Η *Pseudomonas aeruginosa* έχει δύο γνωστά QS συστήματα: το δίκτυο AHL, LasR/RhlR και το δίκτυο HAQs, MvfR (Solano, 2014). Σχετικά πρόσφατα, ταυτοποιήθηκε και ένα τρίτο σύστημα QS γνωστό ως PQS (McKnight, 2000).



Εικόνα 1 : *Pseudomonas aeruginosa* όπως φαίνεται κατά την ανάπτυξη σε θρεπτικό υλικό

Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο του ανθρώπου που σημαίνει ότι εκμεταλλεύεται κάποιο διάλειμμα στις άμυνες του ξενιστή για να ξεκινήσει μια μόλυνση. Παρατηρείται μια δυσκολία καταπολέμησης λοιμώξεων από την *Pseudomonas aeruginosa* με τα αντιβιοτικά λόγω πλασμιδίων R (αντοχής) που περιέχουν. Τα πλασμίδια αυτά φέρουν γονίδια που κωδικοποιούν αντοχή στα αντιβιοτικά. Από τον ανασυνδυασμό των πλασμιδίων R προκύπτουν νέα πλασμίδια πολλαπλής αντοχής σε διάφορα αντιβιοτικά. Έτσι, ο άνθρωπος γίνεται μέρος της δεξαμενής (και της αλυσίδας μετάδοσης) ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηριακών στελεχών (Αγγέλης, 2007). Προκαλεί μολύνσεις του ουροποιητικού (ουρολοιμώξεις) που είναι συνήθως ενδονοσοκομειακές και σχετίζονται με καθετηριασμό, όργανα ή χειρουργική επέμβαση του ουροποιητικού, μολύνσεις αναπνευστικού, λοιμώξεις δέρματος και μαλακών ιστών συμπεριλαμβανομένων των

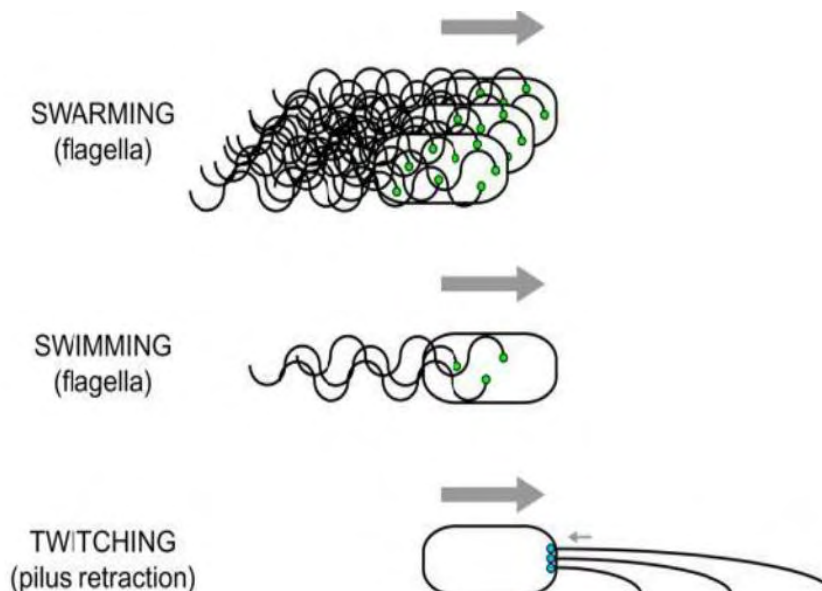
λοιμώξεων του τραύματος, πυώδεις δερματίτιδες και δερματίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, γαστρεντερικές μολύνσεις, λοιμώξεις των οστών και των αρθρώσεων, βακτηριακία και σηψαιμία, λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος όπως μηνιγγίτιδα. Επίσης προκαλεί μολύνσεις αυτιών, συμπεριλαμβανομένων εξωτερική ωτίτιδα. Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι το κυρίαρχο παθογόνο βακτήριο σε ορισμένες περιπτώσεις εξωτερικής ωτίτιδας, συμπεριλαμβανομένων του «αυτιού του κολυμβητή». Έχουν αναφερθεί μολύνσεις των ματιών και η *Pseudomonas aeruginosa* μπορεί να προκαλέσει καταστροφικές μολύνσεις στο ανθρώπινο μάτι. Είναι μια από τις πιο κοινές αιτίες βακτηριακής κερατίτιδας. (Murali Putty, 2007, Patterson, 2009).

## 1.7 Μολυσματικοί παράγοντες της *Pseudomonas aeruginosa*

### 1.7.1. Κινητικότητα-motility

Τα βακτήρια έχουν αναπτύξει ποικίλους μηχανισμούς ώστε να επιτυγχάνουν τον αποικισμό των διαφόρων φυσικών ενδιαιτημάτων. Ένας από τους σημαντικότερους μηχανισμούς είναι η μετακίνηση τους στις επιφάνειες και ο σχηματισμός βιούμενίων (Verstraeten, 2008)

Οι μηχανισμοί κινητικότητας υπηρετούνται από ένα εξελιγμένο χημειοταξικό σύστημα το οποίο δημιουργεί βαθμιδωτές συγκεντρώσεις, και έτσι βοηθά την *Pseudomonas aeruginosa* να διασχίζει διαφόρων τύπων επιφάνειες είτε συρρέοντας, είτε κολυμπώντας είτε συσπάζοντας, ανάλογα με τη σταθερότητα του περιβάλλοντός της (Roberts, 2015).



**Εικόνα 2 :** Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών μετακίνησης της *Pseudomonas aeruginosa* σε επιφάνειες

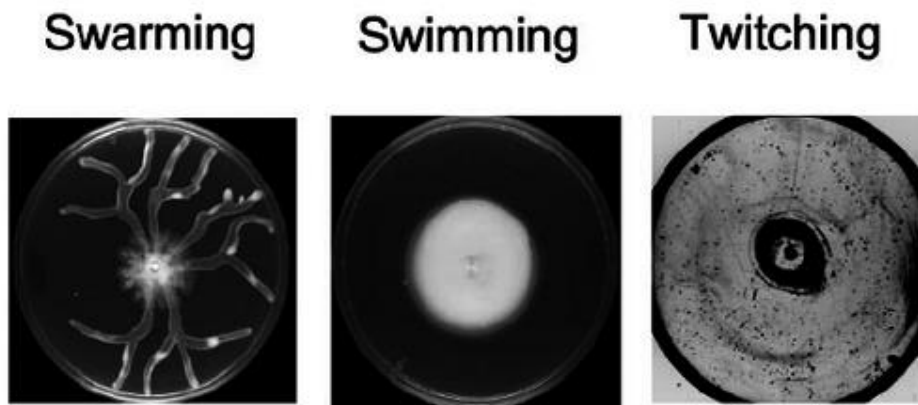
Η swimming (κολυμβητική) κίνηση αφορά τη μετακίνηση μεμονωμένων κυττάρων σε υγρά ενδιαιτήματα, η οποία πραγματοποιείται μέσω της περιστροφής των μαστιγίων. Η swarming (ομαδική) κίνηση αφορά την ταυτόχρονη μετακίνηση ομάδων κυττάρων πάνω σε επιφάνειες και όπως η κολυμβητική κινητικότητα εξαρτάται από την περιστροφή των μαστιγίων. Η twitching (τίναγμα) κινητικότητα εξαρτάται από την παρουσία και σύσπαση των τύπου IV ινιδίων (pili) (Harshey,2003).

Η κινητικότητα είναι αδιαμφισβήτητα ένα από τα πιο εντυπωσιακά χαρακτηριστικά στη μικροβιακή φυσιολογία και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Αρχικά οι συνθήκες υγρασίας και η ρευστότητα του μέσου δηλαδή η συγκέντρωση του άγαρ στο θρεπτικό μέσο επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την κινητικότητα της *Pseudomonas aeruginosa*. Η ομαδική κινητικότητα πραγματοποιείται σε ημιστερεά θρεπτικά μέσα που περιέχουν 0,4-0,7% άγαρ (Overhage,2008) ενώ το twitching σε στερεά θρεπτικά μέσα και σε υψηλές συγκεντρώσεις άγαρ (1-2 %) ενώ η κολυμβητική κίνηση σε υδάτινα περιβάλλοντα με χαμηλές συγκεντρώσεις άγαρ (0,3%)(Samuel,2011).

Η *Pseudomonas aeruginosa* κινείται με ένα μόνο πολικό μαστίγιο, το οποίο συμβάλλει στις μολύνσεις διευκολύνοντας τη βακτηριακή είσοδο και προσκόλληση σε κύτταρα ή υγρές επιφάνειες. Κατά τη διάρκεια της ομαδικής κίνησης η *Pseudomonas aeruginosa* διατηρεί το πολικό μαστίγιο αλλά διαθέτει και δύο συστήματα περιστροφής (mot AB, mot CD) που απαιτούνται για την ώθηση πάνω στις επιφάνειες αλλά και ενδιάμεσα από παχύρρευστα ενδιαιτήματα (Touatn,2005). Έτσι, η έκφραση των εναλλακτικών μηχανισμών περιστροφής του μαστίγιου είναι τουλάχιστον άλλος ένας τρόπος για να διευκολυνθεί η ομαδική κινητικότητα εκτός από τη χρήση του μαστίγιου. Ο Bradley πραγματοποίησε λεπτομερέστερες μικροσκοπικές μελέτες του άγριου τύπου της *Pseudomonas aeruginosa* και επιβεβαίωσε ότι τα ινίδια είναι υποχρεωτικά για την twitching κινητικότητα και η μηχανική βάση αυτής της διαδικασίας είναι η επέκταση των ινιδίων και η σύμπτυξη αυτών. (Semmler,1999)Τέλος, η κολυμβητική κινητικότητα εξαρτάται και αυτή όπως και στη ομαδική κινητικότητα από το μαστίγιο (Rashid,2000).

Πολλά στελέχη βακτηρίων που επιδεικνύουν ομαδική κίνηση βιοσυνθέτουν και εκκρίνουν επιφανειοδραστικές ουσίες. Οι επιφανειοδραστικές ουσίες είναι αμφίφιλα μόρια που μειώνουν την τάση μεταξύ του υποστρώματος και του κυττάρου και ως εκ τούτου καθιστούν δυνατή την εξάπλωση των βακτηρίων πάνω σε μια επιφάνεια. Η *Pseudomonas aeruginosa* χρησιμοποιεί ως επιφανειοδραστική ουσία τα ραμνολιπίδια (rhamnolipids). Τα ραμνολιπίδια (RLS) είναι αμφίφιλα γλυκολιπίδια που αποτελούνται από L-ραμνόζη και 3-υδροξυαλκανικό οξύ (Tremblay,2010).

Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα φωσφολιπίδια, η λακτοφερίνη, η αλβουμίνη και η γλυκοπρωτεΐνη (mucin) διεγείρουν την twitching κινητικότητα είναι δυνατό να επηρεάσουν την παθογένεια της *Pseudomonas aeruginosa* (Whitchurch,2006). Ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων της *Pseudomonas aeruginosa* κατά την ομαδική κινητικότητα έδειξε ότι υπήρχε μια αύξηση στην έκφραση των μολυσματικών παραγόντων όπως το εκκριτικό σύστημα τύπου III και οι εξωκυττάρια πρωτεάσες (Overhage,2008,Tremblay,2010).



Εικόνα3: Σχηματική απεικόνιση των τριών μορφών κινητικότητας της *Pseudomonas aeruginosa* ( Ramos-Aires,2003)

Στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζεται η σχηματική απεικόνιση των τριών μορφών κινητικότητας της *Pseudomonas aeruginosa* και παρατηρούμε ότι η ομαδική κινητικότητα επιδεικνύει ένα σχήμα τύπου δενδρίτη (dendrites). Η ανάπτυξη της κολυμβητικής κινητικότητας περιορίζεται στο κέντρο του τρυβλίου ενώ στην twitching κινητικότητα παρατηρούμε ότι η αποικία της *Pseudomonas aeruginosa* έχει "τρυπήσει" (stabbing) το υπόστρωμα και έχει φτάσει στον πάτο του τρυβλίου και έχει αναπτυχθεί μια άλω όπου εμφανίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ άγαρ και πλαστικού τρυβλίου (Whitchurch,2006).

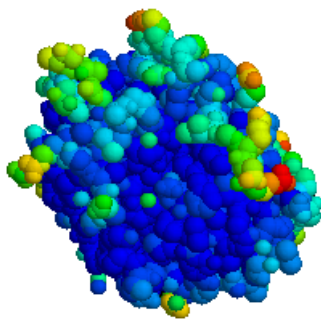
### 1.7.2 Η ελαστάση της *Pseudomonas aeruginosa*

Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένα εξαιρετικά προσαρμοστικό gram αρνητικό βακτήριο που προκαλεί ένα ευρύ φάσμα νόσων. Ο τρόπος με τον οποίο η *Pseudomonas aeruginosa* ασκεί την παθογόνο δράση της είναι πολύπλοκος και δεν έχει διευκρινισθεί επακριβώς. Διάφοροι κυτταρικοί παράγοντες αλλά και εξωκυττάρια προϊόντα θεωρούνται υπεύθυνα για την έκφραση της παθογόνου δράσης του μικροοργανισμού. Οι παράγοντες που καθορίζουν την τοξικότητα και παθογενετικότητα της ψευδομονάδας είναι τοξίνες(εξωτοξίνη A ), αιμολυσίνες , πρωτεάσες (ελαστάση S ,αλκαλική πρωτεάση),διάφορα ένζυμα(αλκαλική φωσφατάση), χρωστικές που διασπούν τους ιστούς του ξενιστή και δημιουργούν συνθήκες ευνοϊκές για τον πολλαπλασιασμό του βακτηριδίου, την εισβολή και τη βλάβη του ιστού (Holder,1989).

Η *Pseudomonas aeruginosa* παράγει μια εξωκυτταρική ελαστάση η οποία συνεισφέρει στην παθογένεια της (Gambello,1991). Η ελαστάση της *Pseudomonas aeruginosa* είναι μια από τις κύριες πρωτεΐνες και η κυρίαρχη πρωτεάση που εκκρίνεται στο περιβάλλον από πολλά στελέχη αυτού του ευκαιριακού παθογόνου (Kessler,1994). Η ελαστάση της *Pseudomonas aeruginosa* εμφανίζει ένα ευρύ φάσμα δράσης σε υποστρώματα με ισχυρή ελαστολυτική δραστηριότητα.

Έχει μοριακό βάρος 33kDa και κωδικοποιείται από το γονίδιο LasB της *Pseudomonas aeruginosa*. Επίσης είναι γνωστή και ως ψευδολυσίνη και έχει αναγνωρισθεί σαν ένας σημαντικός μολυσματικός παράγοντας (Kuang,2011).

Είναι μια μεταλλοπρωτεάση που επιδεικνύει μια ευρεία ειδικότητα υποστρώματος και συμπεριλαμβάνει πολλά βιολογικά μόρια-ξενιστές όπως ελαστίνη, κολλαγόνο, τρανσφερίνη, ανοσοσφαιρίνες και συμπληρωματικά συστατικά (Gambello,1991). Πιστεύεται ότι η ελαστάση βλάπτει τους ιστούς των ξενιστών διαμέσου της υδρόλυσης των συστατικών της εξωκυτταρικής μήτρας με το να παραβιάζει τα ενδοθηλιακά και επιθηλιακά φράγματα και να επιτίθεται στις στενές μεσοκυττάρειες διασταυρώσεις (Kuang,2011). Η δράση της ελαστάσης συνίσταται στη διάσπαση των πυρηνικών πρωτεϊνών των μορίων των πρωτεογλυκανών, του κολλαγόνου τύπου III, IV, της φμπρονεκτίνης και πολλών πρωτεϊνών του πλάσματος (Starcher, 1986). Η ελαστάση παράγεται από το 90% των στελεχών της *Pseudomonas aeruginosa* και αποτελεί ένα σημαντικό μολυσματικό παράγοντα για τις μολύνσεις του κερατοειδούς καθώς και για πνευμονικές μολύνσεις (Wretling,1983, Grobelny,1992,Nishino,1980).



Εικόνα 4 : Τρισδιάστατη εικόνα της ελαστάσης

Πολλά στελέχη της *Pseudomonas aeruginosa* παράγουν δύο πρωτεάσες, μια αλκαλική πρωτεάση και την ελαστάση. Εκείνα τα στελέχη με την ελαστάση έχουν δείξει ότι είναι πιο παθογόνα από εκείνα απουσία ελαστάσης και η ελαστάση είναι πιθανόν ο παράγοντας που είναι υπεύθυνος για την καταστροφή του κερατοειδούς ιστού και πιθανή αιμορραγία στους πνεύμονες, μολύνσεις οι οποίες είναι γνωστές ότι προκαλούνται από την *Pseudomonas aeruginosa*. Επίσης η ελαστάση της *Pseudomonas aeruginosa* είναι ικανή να αδρανοποιήσει τον αναστολέα α1- πρωτεάση, έναν από τους κύριους αναστολείς του πλάσματος ο οποίος ελέγχει την καταστροφή του ιστού από ενδογενείς πρωτεάσες σερίνης (Nishino,1980). Η ελαστάση της *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένας μολυσματικός παράγοντας ο οποίος ρυθμίζεται από το Las Quorum system αν και έχει δείξει ότι ρυθμίζεται και από το Rhl quorum system (Casilag F.,2016). Το QS (Quorum sensing) είναι ένας όρος που περιγράφει τη βακτηριακή επικοινωνία που χρησιμοποιείται από πολλά βακτηριακά είδη και βασίζεται στην παραγωγή και ανίχνευση διάχυτων μορίων σήματος (Atkinson & Williams, 2009). Επίσης η ελαστάση απαιτεί την παρουσία ασβεστίου για να μπορέσει να σταθεροποιηθεί και να λειτουργήσει Έχει δείξει ότι έχει πρωτεολυτική δραστηριότητα ενάντια σε διαφορετικού τύπου υποστρώματα και έχει την τάση να καταπολεμά τις ανοσοαποκρίσεις του ξενιστή (Casilag F.,2016).



## **1.8 Σκοπός της παρούσας μελέτης**

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της δράσης ελληνικών μελιών του Ολύμπου όσο αφορά την πιθανή αναστολή μολυσματικών παραγόντων της *Pseudomonas aeruginosa*. Στην παρούσα εργασία εξετάσθηκαν 19 δείγματα μελιού από την περιοχή του Ολύμπου ως προς την κινητικότητα (swarming, twitching, swimming) της *Pseudomonas aeruginosa* παρουσία αυτών και της δραστικότητας της ελαστάσης της *Pseudomonas aeruginosa*, συγκριτικά με το μέλι Manuka . Και στις 4 πειραματικές διαδικασίες μελετήθηκε αρχικά η ανάπτυξη της *Pseudomonas 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 μελιών

Για την εκπόνηση της εργασίας τα μέλια που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από περιοχές του Ολύμπου. Εξετάσθηκαν τα παρακάτω 19 δείγματα μελιών. Κάθε δείγμα κατείχε ένα συγκεκριμένο νούμερο καθώς και πληροφορίες για την φυτική του προέλευση. Τα δείγματα μελιού ήταν αποθηκευμένα σε γυάλινα ή πλαστικά δοχεία σε θερμοκρασία δωματίου σε κλειστό χώρο.

**Πίνακας 2.1** Χαρακτηριστικά Δειγμάτων μελιών του Ολύμπου

Κωδικός δείγματος	Τύπος Μελιού	Γεωγραφική προέλευση	Ημερομηνία παραγωγής
1	Μέλι Ανθέων	Καρυά Ολύμπου	Ιούλιος 2013
2	Αγριοτριφύλλι και ετήσια φυτά	Ελασσόνα Ολύμπου	Ιούλιος 2013
3	Μέλι Ανθέων	Συκεά Ελασσόνας	Ιούλιος 2013
4	Μελισσοκομικά φυτά, τριφύλλι, αγροσπαράγκι, κοντορίγανη, λαδανιά, μελιτώματα	Παλιαμπέλα	Ιούλιος 2013
5	Μέλι Ανθέων	Δομένικο Ελασσόνας	Ιούλιος 2013
6	Μέλι Ανθέων	Σκαμνιά	Ιούλιος 2013
7	Μέλι Ανθέων	Σαραντάπορο	Ιούλιος 2013
9	Μέλι Ανθέων	Άζωρο Ελασσόνας	Ιούλιος 2013
10	Μέλι Ανθέων	Βερδικούσια Λαρίσης	Ιούλιος 2013
11	Μέλι Ανθέων	Καλλιθέα Ελασσόνας	Ιούλιος 2013
12	Μέλι Ανθέων	Καρυά Ολύμπου	Ιούνιος 2012
13	Ανθέων και Καστανιάς	Άνω Λεχώνια -Βόλος	2013

14	Ανθέων και κωνοφόρων	Δομένικο Ελασσόνας	2012
15	Μέλι Ανθέων	Καρυά Ολύμπου	Ιούλιος 2014
17	Παλιούρι, Καβαλαριά, αγριοτριφύλλι, αγριοτριανταφυλλιά, αγριοσπάραγκο, πεύκο-καπνός, ακακία, κρινάκια, κιχύριο-φλόμος	Δρυμός Ελασσόνας	2014
18	ακακία, τσάι του βουνού, βατομουριές, έλατο	Καρυά Ολύμπου	Αύγουστος 2014
19	Ανθέων και κωνοφόρων	Άζωρο Ελασσόνας	Αύγουστος 2014
20	Ανθέων και κωνοφόρων	Γαλανόβρυση Ελασσόνας	2014
21	Ανθέων και κωνοφόρων	Καρυά Ολύμπου	Ιούλιος 2014

### 2.1.2 Μέλι *Manuka*

Το μέλι *Manuka* που χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση με τα Ελληνικά μέλια είναι της εταιρείας *Manuka Health New Zealand* με UMF 25+ και MGO 550. +. Περιέχει τουλάχιστον 550mg/kg μεθυλγλυοξάλη και ανήκει στην βαθμική κατηγορία *super high*.



### **2.1.3 Όργανα ,αναλώσιμα και θρεπτικά υποστρώματα**

- Τρυβλία Petri (100 mm)
- Αποστειρωμένα πλαστικά φιαλίδια τύπου falcon 50ml
- Θρεπτικό υλικό Nutrient Broth είναι της εταιρίας biolab και περιέχει : peptones 6g/lit, sodium chloride 5 g/lit
- Θρεπτικό υλικό LB agar 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
- Θρεπτικό υλικό BM2 glucose broth και περιέχει:10% (v/v) BM2, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 0,4% γλυκόζη, 10μM FeSO<sub>4</sub>
- Πιπέτες
- Eppendorfs
- Φασματοφωτόμετρο
- Επωαστήρας
- Φυγόκεντρος
- Vortex Καταψύκτης πολύ χαμηλών θερμοκρασιών
- Κρίκος εμβολιασμού
- Γυάλινα φιαλίδια (vials)
- Ογκομετρικός κύλινδρος
- Χάρακας
- Κυψελίδες

### **2.1.4 Βακτηριακό στέλεχος**

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι:  
*Pseudomonas aeruginosa* 1773 (Ανθεκτική στις καρβαπενέμες )

## 2.2 Μέθοδοι

### 2.2.1. Προετοιμασία καλλιέργειας της *Pseudomonas aeruginosa*

Για την προετοιμασία των καλλιεργειών της *Pseudomonas aeruginosa* χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες (glycerol stock) που διατηρούνται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Για την στερεή καλλιέργεια *Pseudomonas 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 nutrient 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 *Pseudomonas aeruginosa*, λαμβάνεται από το τρυβλίο που αναπτύχθηκε η *Pseudomonas aeruginosa* με μικροβιολογικό κρίκο και σε ασηπτικό περιβάλλον ένα κομμάτι από τις αποικίες και τοποθετείται σε vial με θρεπτικό υπόστρωμα nutrient Broth (5 ml). Έπειτα το vial τοποθετείται σε επωαστήριο υπό ανάδευση (incubator shaker) για 24 h στους  $37^{\circ}\text{C}$  στις 210 στροφές.

### 2.2.2 Κινητικότητα Βακτηρίων

#### 2.2.2.1 Twitching κινητικότητα

Η κινητικότητα της *Pseudomonas aeruginosa* μελετήθηκε σε τρυβλία με LB broth, 1% άγαρ, όπου με τη βοήθεια ενός κρίκου εμβολιασμού παίρνουμε μια ποσότητα από την υγρή καλλιέργεια της *Pseudomonas aeruginosa* και την απλώνουμε σε μια συνεχή γραμμή ζικζακ από το αρχικό σημείο εκκίνησης μέχρι το απέναντι. Η σταγόνα απλώνεται σε δέσμες παραλλήλων γραμμών και κάθε μια απ' αυτές τις δέσμες ξεκινάει τέμνοντας το τέλος της προηγούμενης. Τα τρυβλία, αφέθηκαν για 24 h σε θερμοκρασία  $37^{\circ}\text{C}$  ώστε να σχηματιστούν αποικίες και με τη βοήθεια ενός tip παίρνουμε μια αποικία και την τοποθετούμε στο κέντρο ενός τρυβλίου με LB broth και 1,5% άγαρ και 4,5% μέλι μέχρι να ακουμπήσει το tip την κάτω επιφάνεια του τρυβλίου. Τα τρυβλία, αφέθηκαν για 24 h σε θερμοκρασία  $37^{\circ}\text{C}$  και μετρήθηκε η ζώνη κινητικότητας. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα και δοκιμάστηκαν τρυβλία που περιείχαν LB broth και 2% άγαρ και LB broth και 1% άγαρ σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες  $30^{\circ}\text{C}$  για 24-48 h και  $37^{\circ}\text{C}$  για 24 h για τη διαδικασία του stabbing (τρύπημα τρυβλίου) αλλά καταλήξαμε ότι τα βέλτιστα αποτελέσματα μας τα έδωσαν τα τρυβλία που περιείχαν 1,5% άγαρ. Και στις τρεις μεθόδους χρησιμοποιήσαμε τρία τρυβλία για το κάθε μέλι ξεχωριστά. Τέλος το εμβαδόν των ζωνών κινητικότητας μετρήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Image J το οποίο είναι μια πλατφόρμα για επιστημονική ανάλυση εικόνων και το χρησιμοποιήσαμε για να μετρήσουμε αναλυτικά το εμβαδόν της κάθε ζώνης κινητικότητας χωριστά (Schindelin J, 2015)

### **2.2.2.2 Ομαδική κινητικότητα(Swarming motility)**

Η ομαδική κινητικότητα μελετήθηκε με αρκετά πειράματα χρησιμοποιώντας διάφορα πρωτόκολλα ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες που μας δίνουν το επιθυμητό αποτέλεσμα . Αρχικά χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο που ακολούθησαν οι Samuel C. et al., 2011 σε τρυβλία με BM2 γλυκόζη (62 mM potassium phosphate buffer, pH 7 0.5%, casamino acids, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 10μM FeSO<sub>4</sub> 0,4% (w/v) γλυκόζη) τα οποία περιέχουν 0,5 % άγαρ. Η καλλιέργεια της *Pseudomonas aeruginosa* αναπτύχθηκε σε BM2 glyucose broth (10% (v/v) BM2, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 0,4% γλυκόζη, 10μM FeSO<sub>4</sub>) για 24 h στους 37°C και στη συνέχεια μετρούσαμε απορρόφηση στα 600nm (ύστερα από αραιώσεις) και όποια τιμή απορρόφησης ήταν πιο κοντά στην οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>) 0,4-0,5 χρησιμοποιούσαμε 2 μl και το εμβολιάζαμε στα BM2 τρυβλία και τα αφήναμε να επωαστούν για 18 h στους 37°C. Επίσης ένα άλλο πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν των Murray T.S. et al.,2010 στο οποίο τα τρυβλία που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα M8 τρυβλία τα οποία περιείχαν 0,4% γλυκόζη ,0,5% άγαρ και 0,05% glutamate. Η καλλιέργεια της *Pseudomonas aeruginosa* αναπτύχθηκε σε nutrient broth και σε BM2 glyucose broth για 24 h στους 37°C και μετρήθηκε η απορρόφηση (ύστερα από αραιώσεις) στα 600nm και επιλέχθηκε η τιμή της απορρόφησης που ήταν πιο κοντά στην οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>) 0,4-0,5 . Ύστερα εμβολιάστηκαν 2μl υγρής καλλιέργειας *Pseudomonas aeruginosa* στα M8 τρυβλία και επώαστηκαν για 24 h στους 30°C και στη συνέχεια τα αφήσαμε να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου για 24-48 h πριν τη μέτρηση τους . Τέλος η κινητικότητα της *Pseudomonas aeruginosa* μελετήθηκε σε τρυβλία με nutrient broth 8gr/lit, glyucose 5gr/lit και 0.5% bacteriological agar και 4,5% μέλι όπου εμβολιάστηκαν 2μl υγρής καλλιέργειας *Pseudomonas aeruginosa*. Συγκεκριμένα, ο εμβολιασμός της έγινε στο κέντρο των τρυβλίων, μέσα στη μάζα του υποστρώματος. Τα τρυβλία, αφέθηκαν για 72 h σε θερμοκρασία 37 °C και μετρήθηκε η ζώνη κινητικότητας. Η τελευταία μέθοδος θεωρήθηκε η καταλληλότερη με τα καλύτερα αποτελέσματα . Και στις τρεις μεθόδους χρησιμοποιήσαμε τρία τρυβλία για το κάθε μέλι ξεχωριστά .

### **2.2.2.3 Κολυμβητική κινητικότητα ( Swimming motility)**

Η κολυμβητική κινητικότητα μελετήθηκε με αρκετά πειράματα από διάφορα πρωτόκολλα ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες που μας δίνουν το επιθυμητό αποτέλεσμα. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο που ακολούθησαν οι Rashid et al.,2000 στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με 1,5 % άγαρ τα οποία επώαστηκαν στους 37°C για 24 h. Ύστερα με τη βοήθεια μιας αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας παίρνουμε μια ποσότητα από τα τρυβλία με 1,5 % άγαρ και τα εμβολιάζουμε σε tryptone τρυβλία ( 1%(w/v) tryptone, 0,5 % (w/v) NaCl 0,3% άγαρ )και τα αφήσαμε να επωαστούν στους 37°C για 24 h και μετρήθηκε η ζώνη κινητικότητας. Η καλλιέργεια της *Pseudomonas aeruginosa* αναπτύχθηκε σε nutrient

broth και σε tryptone broth (10g/l tryptone ,5 g/l NaCl) και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 600nm ύστερα από αραιώση και επιλέχθηκε η τιμή της απορρόφησης που ήταν πιο κοντά στην οπτική πυκνότητα ( $OD_{600}$ ) 0,4-0,5 . Τέλος η κινητικότητα της *Pseudomonas aeruginosa* μελετήθηκε σε τρυβλία με LB broth, 0.3% άγαρ και 4% μέλι, όπου εμβολιάστηκαν 5μl υγρής καλλιέργειας *Pseudomonas aeruginosa*. Συγκεκριμένα, ο εμβολιασμός της έγινε στο κέντρο των τρυβλίων. Τα τρυβλία, αφέθηκαν για 48 h σε θερμοκρασία 37 °C και μετρήθηκε η ζώνη κινητικότητας. Η τελευταία μέθοδος που εφαρμόστηκε μας έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα και αυτή χρησιμοποιήσαμε στα πειράματά μας. Και στις δύο μεθόδους πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για το κάθε μέλι χωριστά.

### **2.2.3 Προσδιορισμός της δραστηριότητας ελασάσης της *Pseudomonas aeruginosa* παρουσία μελιών**

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας ελασάσης της *Pseudomonas aeruginosa* χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση μελιού 4% και για τα 19 μέλια που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα . Σαν θετικό control λαμβάνεται από το τρυβλίο που αναπτύχθηκε η *Pseudomonas aeruginosa* (με μικροβιολογικό κρίκο και σε ασηπτικό περιβάλλον) ένα κομμάτι από τις αποικίες και τοποθετείται σε vial με θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Broth (2 ml). Έπειτα το vial τοποθετείται σε επωαστήρα υπό ανάδευση (incubator shaker) για 18 h στους 37°C στις 210 στροφές. Στη συνέχεια παίρνουμε 1 ml από την υγρή καλλιέργεια της *Pseudomonas aeruginosa* και την μεταφέρουμε σε erpendorf και πραγματοποιούμε φυγοκέντριση για 3min στις 18000 rpm. Σε ένα άλλο erpendorf προσθέτουμε 20 mg elastin congo red, 1ml  $Na_2HPO_4$  pH=7 και μεταφέρουμε 50 μl από το προηγούμενο erpendorf που πραγματοποιήσαμε φυγοκέντριση, το κάνουμε vortex και το τοποθετούμε σε επωαστήρα υπό ανάδευση για 4h στους 37°C. Ύστερα πραγματοποιείται φυγοκέντριση και απομακρύνεται το αδιάλυτο elastin congo red και το υπερκείμενο μετρήθηκε φωτομετρικά στα 495 nm.

Για κάθε δείγμα μελιού έγιναν τρεις επαναληπτικές μετρήσεις με συγκέντρωση 4% .Για την παρασκευή των δειγμάτων μελιού χρησιμοποιήσαμε erpendorfs και προσθέσαμε στο καθένα 0,5ml nutrient broth και 50% συγκέντρωση του κάθε μελιού. Για τη συγκέντρωση μελιού 4% προσθέτουμε 1840μl nutrient broth σε αποστειρωμένα falcon και 160μl από το κάθε μέλι για να έχω τελικό όγκο 2ml και με τη βοήθεια ενός κρίκου εμβολιασμού παίρνουμε ένα κομμάτι από τις αποικίες που έχουν αναπτυχθεί στο τρυβλίο σε ασηπτικό περιβάλλον και το τοποθετούμε μέσα στο falcon με το μέλι. Έπειτα το falcon τοποθετείται σε επωαστήρα για 18h στους 37°C. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η ίδια διαδικασία όπως αναφέρθηκε παραπάνω με το θετικό control.

### 3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Αποτελέσματα της επίδρασης της παρουσίας μελιών του Ολύμπου στην κινητικότητα της *Pseudomonas aeruginosa* .

##### 3.1.1 Twitching κινητικότητα

Για τη μελέτη της επίδρασης της twitching κινητικότητα της *Pseudomonas aeruginosa* μελετήθηκαν 19 δείγματα μελιού από την περιοχή του Ολύμπου, τα χαρακτηριστικά των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1 Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο που ακολούθησαν οι Murray et al.,2010. Αρχικά παρασκευάστηκαν τρυβλία με 1,5% άγαρ για τον σχηματισμό αποικιών της *Pseudomonas aeruginosa*. Δηλαδή σε κάθε τρυβλίο υπήρχε 4,5% μέλι και 1,5% άγαρ . Από τα αποτελέσματα παρατηρήσαμε ότι όλα τα μέλια εμπόδισαν την εξάπλωση του βακτηρίου . Το μέλι Manuka εμποδίζει σε αρκετά μεγάλο βαθμό την κινητικότητα της *Pseudomonas aeruginosa*,όμως παρατηρείται ότι και τα 19 δείγματα μελιών του Ολύμπου, παρουσίασαν αξιόλογη αναστολή της twitching κινητικότητας σε σχέση με το Manuka.

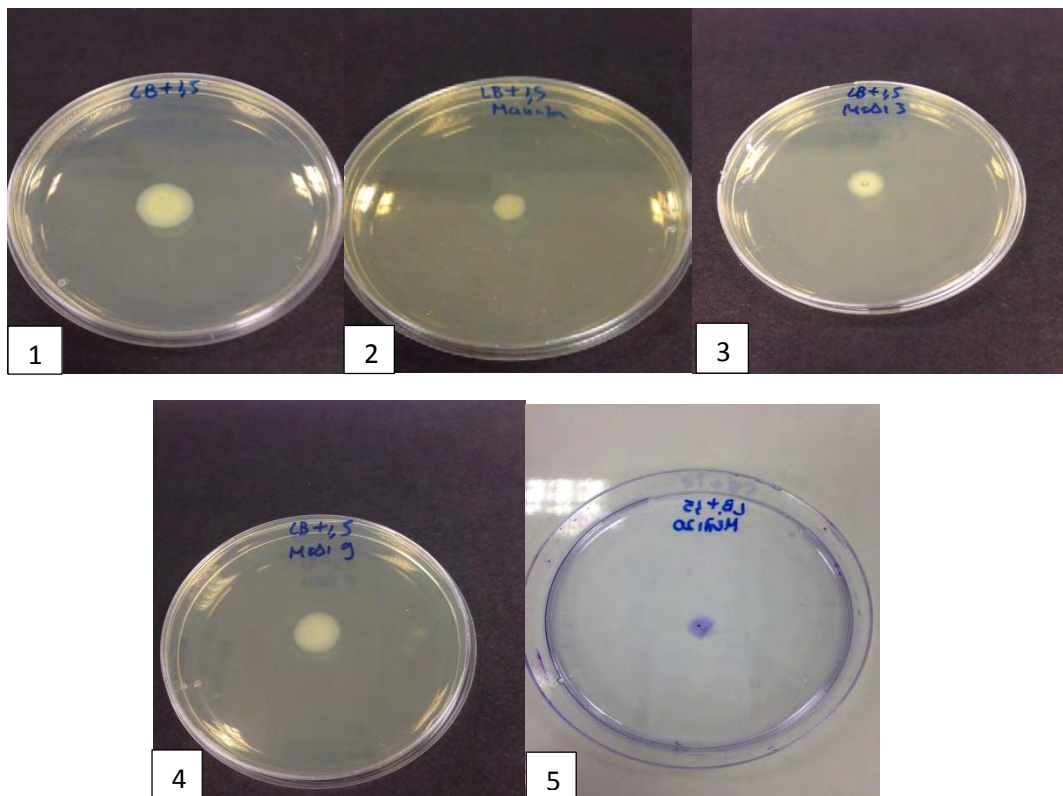
Πίνακας 3.1.1 Αποτελέσματα επίδρασης των μελιών στην κινητικότητα της *Pseudomonas aeruginosa* (twitching motility)

Δείγματα	Εμβαδόν ζώνης κινητικότητας(mm <sup>2</sup> )
1,5% άγαρ	188,2± 23,8
Manuka	47,53± 3,7
1	73,75± 3,2
2	74,71± 2,8
3	80,0± 4,2
4	61,35± 4,7
5	64,45± 5,0
6	108,95± 23,7
7	133,45± 27,0
9	126,4± 7,2
10	73,49± 11,3
11	131,8± 16,4
12	77,02± 11,2
13	59,13± 8,6
14	73,49± 5,9
15	61,0± 1,6
17	61,9± 6,4
18	53,2± 4,6



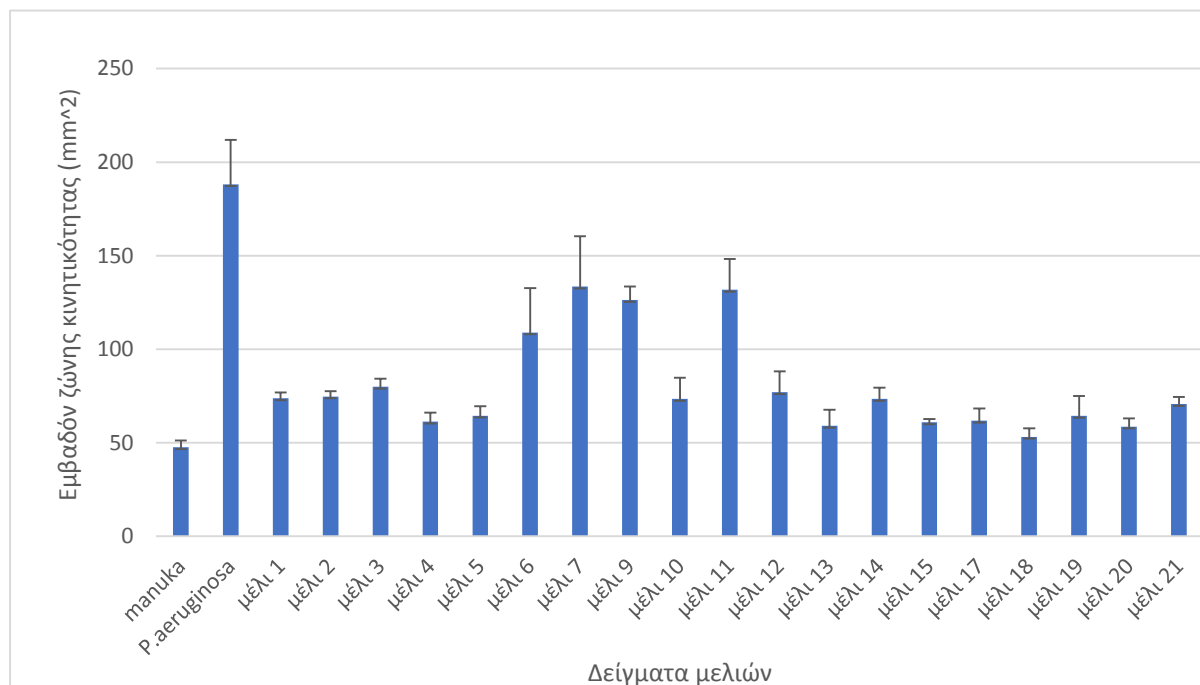
19	64,38± 10,6
20	58,65± 4,4
21	70,71± 3,9

**Εικόνες 3.1.1(1, 2, 3, 4,5):** Twitching motility της *Pseudomonas aeruginosa* σε ημιστερεό υπόστρωμα, όπου στην 1 η παρουσία της *Pseudomonas aeruginosa* χωρίς μέλι , στην 2 η παρουσία του μελιού Manuka , στην 3 το μέλι του Ολύμπου 3, στην 4 το μέλι Ολύμπου 9 και στην 5 το μέλι του Ολύμπου 20 ύστερα από χρώση με crystal violet



Παρατηρούμε ότι τα μέλια του Ολύμπου μειώνουν την κινητικότητα της *Pseudomonas aeruginosa* αλλά σε όχι τόσο μεγάλο βαθμό όσο το μέλι Manuka. Στην 5 εικόνα πραγματοποιήσαμε χρώση με crystal violet για να διαπιστώσουμε ότι όντως τα twitching κύτταρα έχουν προσκολληθεί στο κατώτατο τμήμα του τρυβλίου .

**Διάγραμμα 3.1.1** Διαγραμματική απεικόνιση της επίδρασης των μελιών του Ολύμπου στην κινητικότητα τύπου twitching της *Pseudomonas aeruginosa*

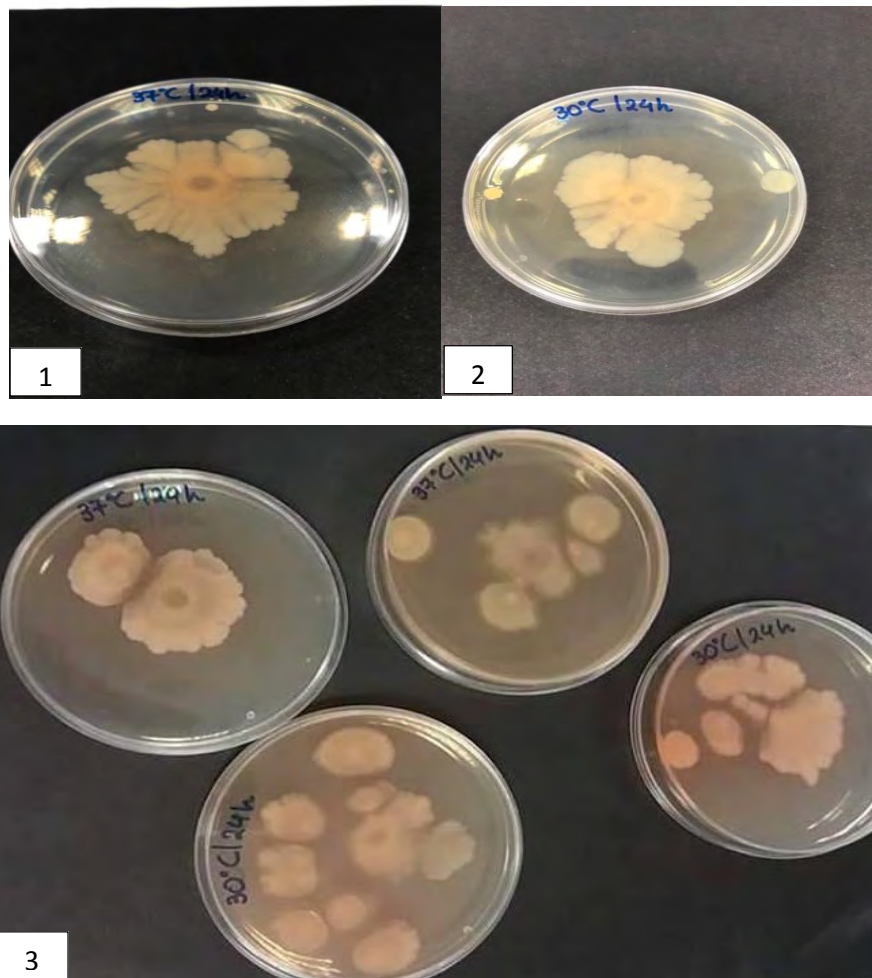


### 3.1.2 Ομαδική κινητικότητα (Swarming motility)

Για τη μελέτη της επίδρασης της ομαδικής κινητικότητας (swarming motility) της *Pseudomonas aeruginosa* μελετήθηκαν 19 δείγματα μελιού από την περιοχή του Ολύμπου, τα χαρακτηριστικά των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.2 Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο που ακολούθησαν οι Deziel et al.,2001 με τη διαφορά ότι αντί για δεξτρόζη χρησιμοποιήσαμε γλυκόζη και αντί για 30°C θερμοκρασία επώασης χρησιμοποιήσαμε 37°C.

Καταλήξαμε σε αυτό το πρωτόκολλο γιατί ήταν το μόνο που μας έδωσε έστω και μια φορά το αποτέλεσμα που θέλαμε . Επίσης πραγματοποιήσαμε διάφορα πειράματα από διάφορα πρωτόκολλα αλλά δυστυχώς κανένα δεν μας έδωσε τα επιθυμητά αποτελέσματα . Προσπαθήσαμε να επαναλάβουμε το ίδιο πείραμα που μας είχε δώσει το επιθυμητό αποτέλεσμα αλλά δυστυχώς δεν μπορέσαμε να βγάλουμε το ίδιο αποτέλεσμα . Χρησιμοποιήσαμε διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνο επώασης , διαφορετική μέθοδο ανάπτυξης της *Pseudomonas aeruginosa* έτσι ώστε να βρίσκεται στη φάση ανάπτυξης της αλλά δυστυχώς δεν είχαμε το αποτέλεσμα που θέλαμε.

**Εικόνες 3.1.2(1, 2, 3,):** Ομαδική κίνηση(Swarming motility) της *Pseudomonas aeruginosa* σε ημιστερέο υπόστρωμα, όπου στην 1 η παρουσία της *Pseudomonas aeruginosa* χωρίς μέλι στους 37°C , στην 2 η παρουσία της *Pseudomonas aeruginosa* χωρίς μέλι στους 30°C και στην 3 η παρουσία της *Pseudomonas aeruginosa* χωρίς μέλι στους 37°C και 30°C χωρίς το επιθυμητό αποτέλεσμα



Δυστυχώς τα πειράματα μας δεν έδωσαν το επιθυμητό αποτέλεσμα όσον αφορά την ομαδική κινητικότητα της *Pseudomonas aeruginosa* .

### 3.1.3 Κολυμβητική κινητικότητα (Swimming motility)

Για την μελέτη της επίδρασης των μελιών του Ολύμπου στην κινητικότητα της *Pseudomonas aeruginosa* ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο 2.2.2.3. Παρασκευάστηκαν τρυβλία με 1,5% και 0,3% άγαρ, για να δούμε τη διαφορά που προκαλεί στην κινητικότητα της *Pseudomonas aeruginosa* η παρουσία μελιού. Αφού διαπιστώθηκε η μεγάλη διαφορά της “κολύμβησης” 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. Το μέλι Manuka εμποδίζει σε αρκετά μεγάλο βαθμό την κινητικότητα της ψευδομονάδας, όμως παρατηρείται ότι παρουσία πολλών από τα 19 δείγματα μελιών του Ολύμπου, παρουσιάζει πολύ μικρότερη κινητικότητα (τύπου swimming). Επομένως, τα μέλια μπορούν να ταξινομηθούν σε 3 κατηγορίες :

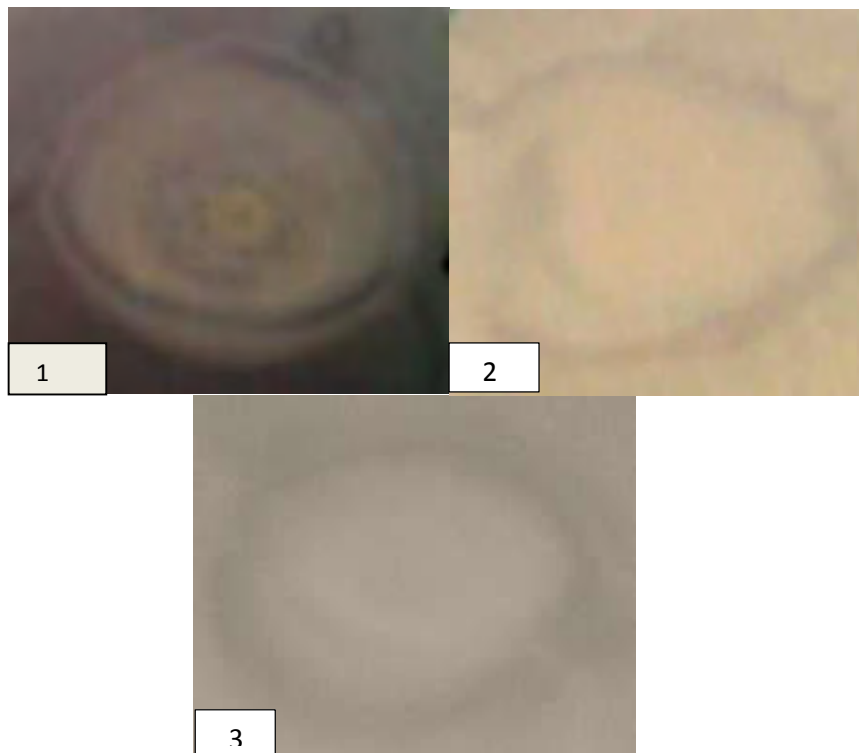
- Μέλια που μειώνουν περισσότερο τη κινητικότητα από το Manuka με τιμές διαμέτρου < 39 mm: 2,4,6,10,12,17,18
- Μέλια με παρόμοια δράση με το Manuka με τιμές διαμέτρου 39-45 mm: 1,3,5,11,13,14,15,19,20,21
- Μέλια με μικρότερη δράση από το Manuka με τιμές διαμέτρου > 45 mm: 7,9

**Πίνακας 3.1.3:** Αποτελέσματα επίδρασης των μελιών στην κινητικότητα της *Pseudomonas aeruginosa* (swimming motility)

Δείγματα	Διάμετρος ζώνης κινητικότητας (mm)
1,5% άγαρ	26,7± 2
0,3 % άγαρ	54± 5
Manuka	39± 5
1	40± 2
2	36± 1
3	40± 2
4	29,4± 2
5	45±3
6	31,7± 2
7	50,3±2
9	50± 2
10	22,7± 1
11	45± 1
12	35,3± 3
13	41,3±5
14	42,3± 5
15	39± 1
17	30± 3
18	27± 3

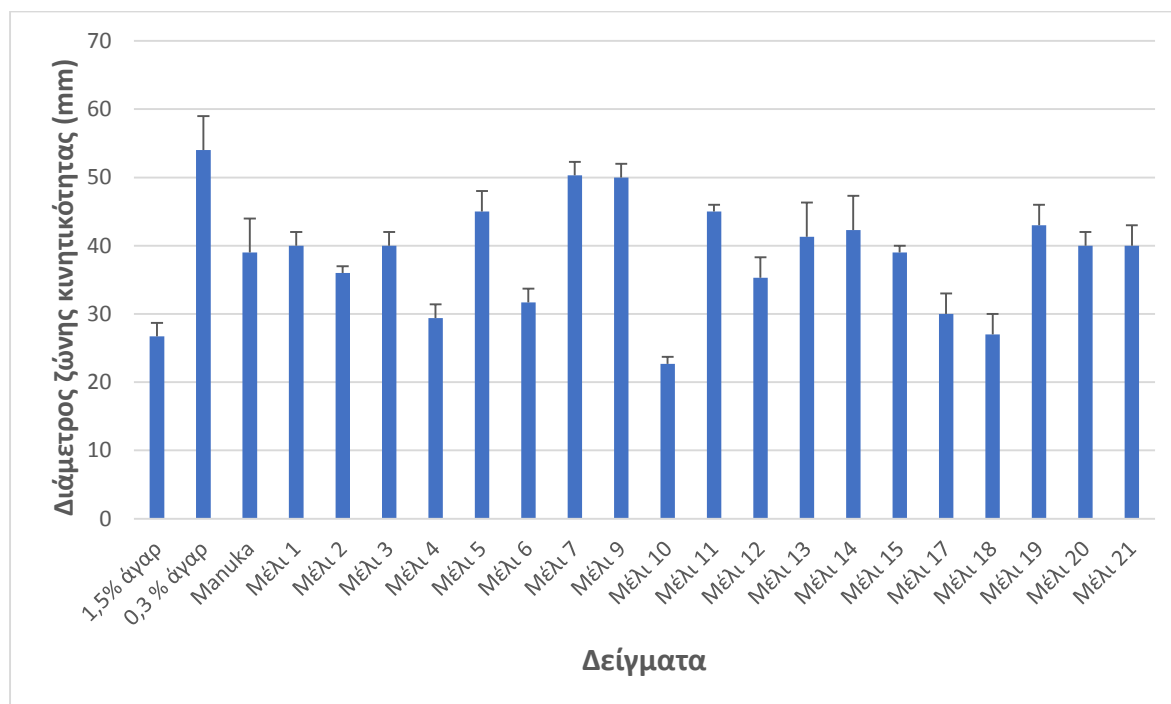
19	43± 3
20	40± 2
21	40± 3

**Εικόνες 3.1.3(1, 2, 3, ):** Κολυμβητική κινητικότητα (swimming motility) της *Pseudomonas aeruginosa* σε ημιστερέο υπόστρωμα, όπου στην 1 η παρουσία του μελιού 2 Ολύμπου, στην 2 το μέλι του Ολύμπου 6 και στην 3 το μέλι Ολύμπου 21.



Τελικώς, συμπεραίνεται ότι τα μέλια του Ολύμπου έδειξαν καλή μείωση στην κολυμβητική κινητικότητα. Το μέλι Manuka, εμφάνισε δράση παρόμοια με τη δράση πολλών άλλων μελιών του Ολύμπου (Διάγραμμα 3.1.3).

**Διάγραμμα 3.1.3:** Διαγραμματική απεικόνιση της επίδρασης των μελιών του Ολύμπου στην κινητικότητα τύπου swimming της *Pseudomonas aeruginosa*



### **3.2 Αποτελέσματα της επίδρασης της παρουσίας των μελιών του Ολύμπου στη δραστικότητα της ελαστάσης της *Pseudomonas aeruginosa*.**



Για τη μελέτη της δραστικότητας της ελαστάσης της *Pseudomonas aeruginosa* μελετήθηκαν 19 δείγματα μελιού από την περιοχή του Ολύμπου, τα χαρακτηριστικά των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 2,1. Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο που ακολούθησαν οι Gambello et al.,1991. Εμείς πραγματοποιήσαμε τη μέθοδο με το elastin congo red το οποίο είναι ένα ειδικό υπόστρωμα για την εκτίμηση της ελαστάσης. Χρησιμοποιήσαμε σαν θετικό control την καλλιέργεια της *Pseudomonas aeruginosa*. Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα παρατηρήσαμε ότι η δραστικότητα της ελαστάσης μειώθηκε και στα 19 μέλια. Το μέλι Manuka εμποδίζει σε αρκετά μεγάλο βαθμό τη δραστικότητα της ελαστάσης, όμως παρατηρείται ότι παρουσία και των 19 μελιών του Ολύμπου, παρουσιάζει πολύ μικρότερη

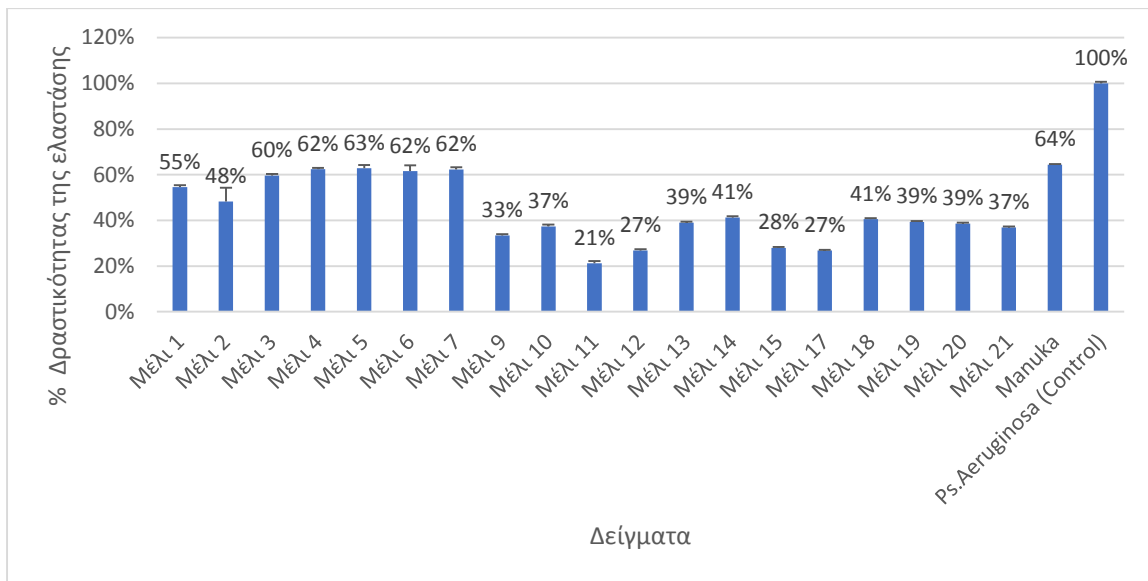
δράση ενάντια στην ελαστάση . Επομένως, τα μέλια μπορούν να ταξινομηθούν σε 2 κατηγορίες :

- Μέλια που μειώνουν περισσότερο τη δραστικότητα της ελαστάσης από το Manuka με ποσοστό < 64%: 1,2,9,10,11,12,13,14,15,17,18,19,20,21
- Μέλια με παρόμοια δράση με το Manuka με τιμές ποσοστού 60-63%: 3,4,5,6,7

**Πίνακας 3.2** :Αποτελέσματα επίδρασης των μελιών στη δραστικότητα της ελαστάσης *Pseudomonas aeruginosa*

Δείγματα	Τιμή δραστικότητας ελαστάσης
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.458± 0,007 (100%)
Manuka	0,295± 0,002 (64%)
1	0,250± 0,008 (55%)
2	0,221± 0,06 (48%)
3	0,273± 0,007 (60%)
4	0,286± 0,006 (62%)
5	0,288± 0,014 (63%)
6	0,282± 0,025 (62%)
7	0,285± 0,01 (62%)
9	0,153± 0,006 (33%)
10	0,171± 0,008 (37%)
11	0,097± 0,01 (21%)
12	0,123± 0,005 (27%)
13	0,179± 0,004 (39%)
14	0,189± 0,006 (41%)
15	0,128± 0,004 (28%)
17	0,123± 0,002 (27%)
18	0,186± 0,004 (41%)
19	0,180± 0,004 (39%)
20	0,177± 0,004 (39%)
21	0,169± 0,004 (37%)

**Διάγραμμα 3.2:** Αποτελέσματα της επίδρασης των μελιών στη δραστικότητα της ελαστάσης της *Pseudomonas aeruginosa*



Από τα πειραματικά αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι τα μέλια αναστέλλουν τη δραστικότητα της ελαστάσης σε πολύ καλό βαθμό. Παρατηρούμε από το παραπάνω διάγραμμα ότι όλα τα μέλια του Ολύμπου έδειξαν πολύ μεγάλη μείωση της δραστικότητας της ελαστάσης της *Pseudomonas aeruginosa* σε σχέση με το βραβευμένο μέλι Manuka και το θετικό μας control και αυτό είναι πολύ ενθαρρυντικό για τα μέλια του Ολύμπου.



#### 4. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Τις τελευταίες δεκαετίες η κακή χρήση ή η κατάχρηση αντιβιοτικών και χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, ιδιαίτερα όταν αυτή γίνεται για λόγους πρόληψης, οδηγεί στην εμφάνιση ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών, τα οποία δεν είναι εύκολο να καταπολεμηθούν πλέον (Mandal,2010). Ένα παράδειγμα ανθεκτικού βακτηρίου στα αντιβιοτικά αποτελεί η *Pseudomonas aeruginosa* η οποία είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο και προκαλεί μολύνσεις κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα (Deziel,2000). Η ανθεκτικότητα ορισμένων μικροβίων και το γεγονός ότι τα φυσικά προϊόντα έχουν λιγότερες πιθανότητες να διαταράξουν τη φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα του οργανισμού είναι βασικοί λόγοι για να στραφούμε σε εναλλακτικές θεραπείες για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων. Η χρήση του μελιού αποτελεί μια τέτοια θεραπεία καθώς βοηθά στην επούλωση πληγών, εγκαυμάτων και έχει γίνει γνωστό για την αντιμικροβιακή του δράση ήδη από το 1892. (Alvarez-Suarez , 2010,Kwakman,2012).

Η αντιβακτηριακή δράση του μελιού, όπως αναφέρθηκε, είναι γνωστή εδώ και πολλά χρόνια. Η δράση του αυτή οφείλεται σε ένα εύρος παραγόντων, όπως η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων , το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, η μεθυγλυοξάλη, το πεπτίδιο bee defensin-1, το χαμηλό pH και φαινολικές ενώσεις (Kwakman,2012,Alvarez-suarez ., 2010). Η αντιβακτηριακή δράση ενός μελιού εξαρτάται από το είδος του. Δεν αποτελεί βιομηχανικό προϊόν και για το λόγο αυτό, η χημική του σύσταση διαφοροποιείται ανάλογα με την πηγή του νέκταρ ή του μελιτώματος που συλλέγουν οι μέλισσες.

Το μέλι Manuka αποτελεί ένα μέλι γνωστό για τις αντιβακτηριακές, αντιβιοτικές και θεραπευτικές του ιδιότητες και έχει εγκριθεί επίσημα για ιατρικούς σκοπούς (Sherlock , 2010). Σύμφωνα με μελέτη είναι αποτελεσματικό έναντι βακτηρίων όπως η *Pseudomonas aeruginosa* όπου μείωσε την κινητικότητα του συγκεκριμένου βακτηρίου (Roberts, 2015) . Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι ο *B. Subtilis* είναι εξαιρετικά ευαίσθητος στο Manuka και ο *B. Cereus* σκοτώθηκε από το μέλι Manuka (Kwakman, 2011).

Σύμφωνα με το CDC (Centers of disease control and prevention) η *Pseudomonas aeruginosa* αποτελεί το πέμπτο συχνότερα απομονωμένο νοσοκομειακό παθογόνο βακτήριο , προκαλώντας περίπου το 9% των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων (Lister , 2009). Η *Pseudomonas aeruginosa* κινείται με ένα μόνο πολικό μαστίγιο, το οποίο συμβάλλει στις μολύνσεις διευκολύνοντας τη βακτηριακή είσοδο και προσκόλληση σε κύτταρα ή υγρές επιφάνειες.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της δράσης ελληνικών μελιών του Ολύμπου όσο αφορά την πιθανή αναστολή μολυσματικών παραγόντων της *Pseudomonas aeruginosa*.

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν 19 δείγματα μελιού από την περιοχή του Ολύμπου ως προς την κινητικότητα(*swarming,twitching,swimming*) της *Pseudomonas aeruginosa*

παρουσία αυτών και της δραστικότητας της ελαστάσης της *Pseudomonas aeruginosa*, συγκριτικά με το μέλι Manuka .

Ένας μηχανισμός κινητικότητας, η twitching motility (τίναγμα) της *Pseudomonas aeruginosa* μελετήθηκε παρουσία 19 δειγμάτων μελιών του Ολύμπου, σε σύγκριση με το μέλι Manuka το οποίο έχει ερευνηθεί επανειλημμένως ως προς την ικανότητα του να αναστέλλει την κινητικότητα της *Pseudomonas aeruginosa*. Από τα αποτελέσματα διαπιστώσαμε ότι τα μέλια του Ολύμπου μείωσαν την κινητικότητα της *Pseudomonas aeruginosa* σε καλό βαθμό αλλά όχι τόσο μεγάλη μείωση όσο το μέλι Manuka . Το μέλι Manuka εμποδίζει σε αρκετά μεγάλο βαθμό την κινητικότητα της *Pseudomonas aeruginosa*, όμως παρατηρείται ότι και τα 19 δείγματα μελιών του Ολύμπου, παρουσίασαν αξιόλογη μείωση στην twitching κινητικότητα σε σχέση με το Manuka.

Επίσης μελετήθηκε ένας ακόμα μηχανισμός κινητικότητας, η κολύμβηση (swimming motility), χρησιμοποιώντας πάλι το μέλι Manuka αλλά και τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς παρουσία μελιού. Τα μέλια μείωσαν αρκετά την κινητικότητά της *Pseudomonas aeruginosa* σε σχέση με το μέλι Manuka το οποίο είναι ένα αναγνωρισμένο μέλι για τις θεραπευτικές του ιδιότητες και κάποια μέλια έδειξαν μεγαλύτερη μείωση κινητικότητας της *Pseudomonas aeruginosa* σε σχέση με Manuka.

Προσπαθήσαμε να μελετήσουμε και την ομαδική κινητικότητα (swarming motility) της *Pseudomonas aeruginosa* χρησιμοποιώντας διάφορα πειραματικά πρωτόκολλα αλλά δυστυχώς κανένα δεν μας έδωσε το αποτέλεσμα που επιθυμούσαμε. Σύμφωνα με τον Roberts και τους συνεργάτες του (2015), η *Pseudomonas 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 FlhC που είναι δομική πρωτεΐνη του μαστιγίου μειώνει την έκφρασή του με την παρουσία του μελιού (Roberts ., 2015).

Τέλος μελετήσαμε την δραστικότητα της ελαστάσης της *Pseudomonas aeruginosa* και καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι και τα 19 μέλια του Ολύμπου αναστέλλουν τη δραστικότητα της ελαστάσης σε πολύ καλό βαθμό και με μεγαλύτερη αναστολή της δραστικότητας της ελαστάσης της *Pseudomonas aeruginosa* σε σχέση με το βραβευμένο μέλι Manuka και αυτό είναι πολύ ενθαρρυντικό για τα μέλια του Ολύμπου.

Συμπερασματικά, τα μέλια ασκούν την αντιμικροβιακή δράση μέσω της αναστολής των μολυσματικών παραγόντων της *Pseudomonas aeruginosa* και ήδη 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.
- Alnaqdy A, Al-jabri A, Al-Mahrooqi Z, Nzeako B, Nsanze H. (2005). *Inhibition effect of honey on the adherence of Salmonella to intestinal epithelial cells in vitro*. Int. J. Food Microbiol, 103: 347-351
- 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. (2013). *Antibacterial Activity of Greek and Cypriot Honeys against Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa in Comparison to Manuka Honey*. Journal of Medicinal Food 16 (1): 42-47.
- Atkinson, S. and Williams, P. (2009). *Quorum sensing and social networking in the microbial world*. Journal of the Royal Society Interface 6 (40), 959-978.
- Bradley, D. E. (1980). *A function of Pseudomonas aeruginosa PAO pili: twitching motility*. Can J Microbiol 26, 146–154.
- Déziel E. Comeau Y. Villemur R. (2001). *Initiation of biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities*. Journal of bacteriology. 183(4):1195-204
- Gambello M.J. Iglewski B.H. (1991). *Cloning and characterization of the Pseudomonas aeruginosa lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression*. American society for microbiology. 173:3000-3009
- Gheldof N, Wang XH, Engeseth NJ. (2002). *Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources*. J. Agric. Food Chem., 50: 5870-5877.
- Gheldof N, Wang XH, Engeseth NJ. (2003). *Buckwheat honey increases serum antioxidant capacity in humans*. J. Agric. Food Chem., 51: 1500-1505
- Grobelny D. Poncz L. Galardy RE. (1992). *Inhibition of human skin fibroblast collagenase, thermolysin, and Pseudomonas aeruginosa elastase by peptide hydroxamic acids*. Department of Biochemistry, University of Kentucky, Lexington (31):7152-4
- Hamzaoglu I, Saribeyoglu K, Durak H. (2000). *Protective covering of surgical wounds with honey impedes tumor implantation*. Arch Surg 135–142
- Harshey RM. (2003). *Bacterial motility on a surface: Many ways to a common goal*. Annu Rev. Microbiol. 57:249-273
- Holder I.A. Neely A.N. (1989). *Pseudomonas elastase acts as a virulence factor in burned hosts by Hageman factor- dependent activation of the host kinin cascade*. American society for microbiology.57:3345-3348

- 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
- Kessler E. Safrin M. (1994). *The propeptide of Pseudomonas aeruginosa elastase acts as an elastase inhibitor*. American society for microbiology.269:22725-22731
- Krochmal Connie. (1994).*The healing powers of honey*. Am. BeeJ. 134(7):470
- Kuang. Z., Hao. Y., Walling B.E., Jeffries J.L., Ohman.D.E. Lau. G.W. (2011). *Pseudomonas aeruginosa Elastase Provides an Escape from Phagocytosis by Degrading the Pulmonary Surfactant Protein-A*. United States of America.
- Kwakman, P. and Zaat, S. (2012). *Antibacterial Components of Honey*. IUBMB Life 64 (1), 48-55
- 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
- Lister P.D., Wolter D.J., Hanson N.D, (2009). *Antibacterial –resistant Pseudomonas aeruginosa: Clinical complex regulation of chromosomally encode resistance mechanisms*. American society for microbiology
- Malika N, Mohammed F, Chakib EA. (2004). *Antimicrobial activity of natural honey from aromatic and medicinal plants on antibio resistant strains of bacteria*. Int. J. Agric. Biol., 6(2): 289-293.
- Mandal M, Mandal S. (2011). Honey: Its medicinal property and antibacterial activity. Asian Pac J Trop Biomed, 154-160
- Mavric, E., Wittmann, S., Barth, G. and Henle, T. (2008). *Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (Leptospermum scoparium) honeys from New Zealand*. Molecular Nutrition & Food Research 52, 483-489.
- 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
- Molan, P. (1999). *The role of honey in the management of wounds*. Journal of Wound Care 8 (8), 415-418
- Molan PC. (2002). *Re-introducing honey in the management of wounds and ulcers-theory and practice*. Ostomy. Wound Manage. 48: 28-40.
- Murali Putty. (2007). *Pseudomonas Aeruginosa*, EMLab, 5 (3)
- Murray T.S. Ledizet M, Kazmierczak BI. 2010. *Swarming motility, secretion of type 3 effectors and biofilm formation phenotypes exhibited within a large cohort of Pseudomonas aeruginosa clinical isolates*. Journal of medical microbiology. 511-20
- National Honey Board (2003). *Honey-Health and Therapeutic Qualities*, National honey Board, Longmont, Co
- Nishino N.Powers JC. (1980). *Pseudomonas aeruginosa elastase. Development of a new substrate, inhibitors, and an affinity ligand*. The journal of biological chemistry. 255(8):3482-6.

- Olszowy D. (1977). *Of bees, rhododendrons and honey*. Am. BeeJ. 117(8):498-500
- Overhage J, Lewenza S, Marr AK, Hancock RE. (2008). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance .J.Bacterial.190:2671-2679
- Patterson D.L., Kim BN., (2009). *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mayers D.L. (EDS). *Antimicrobial Drug Resistance*. Infectious Disease. Humana Press
- Ramos-Aires J. Plesiat P. Kocjancic-Curty L. Kohler T. (2003). *Selection of an antibiotic – Hypersusceptible mutant of Pseudomonas aeruginosa: Identification of the GlmR transcriptional regulator*. American society for microbiology.843-851
- Rashid M.H. Kornberg A. (2000). *Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming and twitching motilities of Pseudomonas aeruginosa*. PNAS. 97:4885-4890
- 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
- Samuel Chow, Gu Kevin, Jiang Lucy, Nassour Anthony.2011. *Salicylic acid affects swimming ,twitching and swarming motility in Pseudomonas aeruginosa ,resulting in decreased biofilm formation*. Journal of experimental microbiology and immunology. Vol 15:22-29
- Santas L. (1983). *Insects producing honeydew exploited by bees in Greece*. Apidologie14 (2):93-103
- Santas L. (1988). *Physokermes hemicryphus (Dalman) a fir scale insect useful to apiculture in Greece*. Entom. Hellenica 6:11-22
- Schindelin J., Rueden C.T., Hiner M.C., Eliceiri K.W.(2015). *The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis*. Molecular reproduction and development.82:518-529
- Semmler A.B.T.Whitchurch C.B. Mattick J.S. (1999). *A re-examination of twitching motility in Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology. 145:2863–2873
- 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
- Solano Cristina, Echeverz Maite and Lasa Inigo, (2014). *Biofilm dispersion and quorum sensing*, Current Opinion in Microbiology 18: 96–104
- Starcher B.C. (1986). *Elastin and the lung*.Usa.41:577-585
- Toutain CM, Zegans Me, O’Toole GA. (2005). *Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of Pseudomonas aeruginosa* J.Bacteriol. 187:771-777
- Tremblay J. Deziel E.2010. *Gene expression in Pseudomonas aeruginosa swarming motility*. BMC Genom.11:587
- Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, Fauvart M, Fransaeer J, Vermant J, Michiels J.2008. *Living on a surface: Swarming and biofilm formation*. Trends Microbiol.16:496-506

- 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
- Weston, R. (2000). *The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. Food Chemistry* 71 (2), 235-239.
- White, J.W.Jr., (1993). *Honey, in the hive and the honey bee. Dadant and Sons Publication Hamilton Illinois: 869-895.*
- Whitchurch C.B. (2006). *Biogenesis and function of type IV pili in Pseudomonas species. Springer.*
- Wretling B. Pavloskis O.R. (1983). *Pseudomonas aeruginosa elastase and its role in Pseudomonas infections .Reviews of infectious diseases. Vol 5.*

## **Ελληνική Βιβλιογραφία**

- Αγγέλης Γ. (2007). *Μικροβιολογία και μικροβιακή τεχνολογία .Εκδόσεις Αθ. Σταμούλη*
- Αλεξιάκης Α.(2003). *Το μέλι. εκδ. Μιχάλη Σιδέρη*
- Γούναρη Σ., Η ωφελιμότητα των προϊόντων της μέλισσας στον άνθρωπο.(2004). Από το 2<sup>ο</sup> Επιστημονικό συνέδριο Μελισσοκομίας-Σηροτροφίας.
- Ζερφυρίδης, Γ. (1998). *Διατροφή του Ανθρώπου. Τέταρτη Έκδοση. Εκδόσεις Γιαχούδη. Θεσσαλονίκη, Ελλάδα.*
- Θρασυβούλου, Α.( 2012). *Πρακτική Μελισσοκομία, Προβλήματα αιτίες και λύσεις, εκδόσεις Μελισσοκομική Επιθεώρηση, Θεσσαλονίκη, σελ 262-272*
- Θρασυβούλου, Α. και Μανίκης, Ι. (1990). *Κατηγορίες Ελληνικού Μελιού. Μελισσοκομική Επιθεώρηση 6, 158-160.*
- Clement H. (2002). *Σύγχρονη Μελισσοκομία. Εκδόσεις Ψυχάλου. Αθήνα*
- Thrasivoulou A., Manikis I., Tanakaki X., Tsellios D., Karamprognioti S., Dimou M., (2002), *Η Ταυτότητα του Ελληνικού Μελιού Α. Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά που στηρίζουν την ποιότητα του Προϊόντος, Πρακτικά 1ου Επιστημονικού Συνεδρίου Μελισσοκομίας-Σηροτροφίας, Αθήνα.*
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. (2011). *Βιολογία των μικροοργανισμών .Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης .Τόμος II*
- Tortora G. J, Funke B.R., Case C.L. (2009). *Εισαγωγή στην μικροβιολογία , Εκδόσεις Πασχαλίδη , Αθήνα*