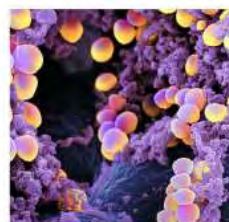


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



**«ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΜΕΛΙ
ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΜΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ»**



Προπτυχιακή εργασία του φοιτητή

Λαρυγγάκη Αλέξανδρου

ΛΑΡΙΣΑ 2018

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**«ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΜΕΛΙ
ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΜΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ»**

**«ISOLATION AND IDENTIFICATION FROM HONEY
OF BACTERIA WITH ANTIMICROBIAL ACTION»**

Λαρυγγάκης Αλέξανδρος

Μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής :

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 Γρηγόριος : Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΛΑΡΙΣΑ 2018

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Καταρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα επίκουρο καθηγητή κ. Δημήτρη Μόσιαλο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση της εργασίας αυτής, την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του σε όλη τη διάρκεια εκτέλεσης του πειράματος καθώς και για την υπομονή του ως την υλοποίηση της πτυχιακής αυτής εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα άλλα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη, καθηγητή του Π.Θ. καθώς και τον κ. Αμούτζια Γρηγόριο επίκουρο καθηγητή του Π.Θ.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω το προσωπικό του εργαστηρίου Μικροβιολογίας-Ιολογίας και κυρίως τους Νικολούλη Κατερίνα και Τηλέμαχο Δημητρίου για τη βοήθεια τους στις διάφορες τεχνικές και πειράματα καθώς και το Βύρωνα Γοργογιέτα για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τους γονείς μου τόσο για την οικονομική όσο και για την ψυχολογική στήριξη που μου προσέφεραν όλα τα χρόνια της φοίτησής μου στο πανεπιστήμιο.

*Στους γονείς μου
Βασίλη και Αλεξάνδρα*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6

1.Εισαγωγή	6
1.1 Μέλι: Ένα φυσικό προϊόν με πολλά οφέλη	7
1.2 Η ιστορία του μελιού	7
1.3 Η κοινωνία της μέλισσας	7
1.3.1 Η ανατομία της μέλισσας	8
1.3.2 Τα μέλη της κυψέλης	8
1.3.3 Αναπαραγωγή των μελισσών	9
1.4 Πως παράγεται το μέλι	9
1.5 Η χημική σύσταση του μελιού	9
1.5.1 Σάκχαρα (Υδατάνθρακες)	10
1.5.2 Οργανικά οξέα	10
1.5.3 Πρωτεΐνες και αμινοξέα του μελιού	11
1.5.4 Ένζυμα του μελιού	12
1.5.5 Νερό	12
1.5.6 Μέταλλα και ιχνοστοιχεία, τέφρα του μελιού	12
1.6 Τα είδη του μελιού	13
1.6.1 Είδη και χαρακτηριστικά ελληνικών μελιών	13
1.7 Προϊόντα που παράγονται από τις μέλισσες πέραν του μελιού	14
1.7.1 Γύρη.....	14
1.7.2 Πρόπολη.....	14
1.7.3 Κερί	15
1.7.4 Βασιλικός πολτός	15
1.8 Αντιοξειδωτική δράση του μελιού	15
1.9 Αντιμικροβιακή δράση του μελιού	15
1.9.1 Μέλι-πρότυπο με αντιμικροβιακές ιδιότητες: Manuka honey	16
1.10 Μικροοργανισμοί του μελιού.....	16
1.11 Σκοπός της εργασίας.....	16
1.11.1 Τα βακτήρια στόχοι: Staphylococcus aureus και Pseudomonas aeruginosa	16
2. Πειραματικό τμήμα	17
2.1 Δείγματα μελιών.....	17
2.2 Επίστρωση τριβλίων με χρήση θρεπτικών υποστρωμάτων Plate Count Agar (PCA) και Bacillus cereus medium με σκοπό την απομόνωση βακτηρίων από τα δείγματα μελιού.....	18
2.2.1 Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν	18

2.3 Απομόνωση βακτηριακών αποικιών από τα τριβλία και ανακαλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό μέσο.	20
2.3.1 Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν	20
2.4 Ανακαλλιέργεια των βακτηριακών αποικιών σε στερεό υπόστρωμα Nutrient agar	20
2.4.1 Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν	20
2.5 Screening των αποικιών για αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε <i>S. aureus</i> και <i>P. Aeruginosa</i>	21
2.5.1 Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν	21
2.6 Αποθήκευση σε stock γλυκερόλης στους -800C των βακτηριακών αποικιών που έδειξαν αντιμικροβιακή δράση.....	22
2.6.1 Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν	22
2.7 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA των βακτηρίων	22
2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	22
2.9 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης.....	25
2.10 Καθαρισμός προϊόντων PCR	26
2.11 Αλληλούχιση του 16s RNA τμήματος και ανάλυση των αποτελεσμάτων με σκοπό την ταυτοποίηση των βακτηρίων.....	26
3.Αποτελέσματα	26
3.1 Καταμέτρηση των βακτηριακών αποικιών που απομονώθηκαν	26
3.2 Αποτελέσματα αναστολής σε <i>S. aureus</i> και <i>P. aeruginosa</i>	27
3.3 Μοριακή ταυτοποίηση του απομονωμένου βακτηριακού στελέχους	28
3.4 Το γένος <i>Raenibacillus</i>	28
Συζήτηση.....	29
Παράρτημα	30
Χρόνος επώασης στερεών και υγρών καλλιιεργειών.....	30
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	35

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σύμφωνα με το Διεθνή Οργανισμό Τροφίμων (F.A.O.) ως «μέλι» ορίζεται το φυσικό προϊόν που παράγουν οι μέλισσες του είδους *Apis mellifera L.* από τη συλλογή νέκταρος, φυτικών χυμών και εκκρίσεων εντόμων από ζωντανά μέρη του φυτού (μελίτωμα), τα οποία μετατρέπουν και αποθηκεύουν στις κηρήθρες τους μέχρι να ωριμάσουν (Standard for honey codex stan)

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

Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η ύπαρξη βακτηριακών στελεχών σε μέλια που παράχθηκαν σε περιοχές κοντά στον Όλυμπο και έγινε προσπάθεια εύρεσης αυτών, τα οποία εμφάνιζαν αντιμικροβιακή δράση έναντι των παθογόνων βακτηρίων *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa*.

Χρησιμοποιήθηκαν 16 δείγματα μελιού από διάφορες περιοχές του Ολύμπου. Τα δείγματα ήταν από διαφορετικά είδη φυτών και η παραγωγή τους έγινε τα έτη 2012-2013.

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση βακτηριακών στελεχών που βρέθηκαν στα δείγματα των μελιών έπειτα από καλλιέργειά τους σε θρεπτικά υποστρώματα *Bacillus cereus* medium και PCA (Plate Count Agar) και από αυτά, έγινε διαλογή των βακτηριακών στελεχών που εμφανίζουν αντιβακτηριδιακή δράση. Ακολούθησε απομόνωση χρωμοσωμικού DNA και με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), ενισχύθηκε το 16S rRNA γονίδιο. Τα προϊόντα της PCR αλληλουχήθηκαν και αναλύθηκαν προκειμένου να γίνει η ταυτοποίηση των βακτηρίων.

Από τα δείγματα μελιών που εξετάστηκαν, απομονώθηκε μόνο ένα βακτηριακό στέλεχος που να εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση, το οποίο είχε αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι του *Staphylococcus aureus*. Με τη μέθοδο της PCR το προαναφερθέν στέλεχος ταυτοποιήθηκε και φάνηκε ότι ανήκει στο γένος *Paenibacillus*.

ABSTRACT

According to International Organism of Foods (F.A.O.) «honey» is defined as the natural product that is produced by bees of species *Apis mellifera L.*, from the collection of nectar, plant juices and excretions of insects from live parts of plant (honeydew), which they alter and store in their combs until they mature. (Standard for honey codex stan)

It is thus a product of the nature that doesn't admit any elaboration and consists of the following components: water, natural candies, organic acids, proteins, traces, enzymes,

vitamins, aromatic and coloring substances, just as other nutritious substances as well. It plays an important role in the metabolism and nutrition, to the components of the skeleton and the cells, it regulates the acidity of the stomach, has antiseptic attributes, is tonic, helps to the quickest restoration of the health and has antimicrobial and antioxidant action (National Honey Board 2010).

In the present study we evaluated the presence of bacteria strains in Greek honeys that came from the near areas of mount Olympus and which of them have antimicrobial activity against the pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

16 samples of honey from different regions of Olympus were used for this project. The samples were from different species of plants and their production happened at 2012-2013.

Isolation of bacterial strains that were found in the honey samples after their culture in the nutrient substrates Bacillus cereus medium and PCA (Plate Count Agar), was accomplished and from those, we screened for bacterial colonies that exhibit antibacterial activity. Isolation of the chromosomal DNA was followed and by using the polymerase chain reaction (PCR) method, the 16S rRNA gene was amplified. The PCR products were sequenced and analyzed in order to achieve the identification of the bacteria.

From the honey samples that were tested, just one bacterial strain was isolated that exhibits antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. By using the PCR method, the above strain was identified and it was found that it belongs to the *Paenibacillus* genus.

1.Εισαγωγή

1.1 Μέλι: Ένα φυσικό προϊόν με πολλά οφέλη

Σύμφωνα με το Διεθνή Οργανισμό Τροφίμων (F.A.O.) ως «μέλι» ορίζεται το φυσικό προϊόν που παράγουν οι μέλισσες του είδους *Apis mellifera L.* από τη συλλογή νέκταρος, φυτικών χυμών και εκκρίσεων εντόμων από ζωντανά μέρη του φυτού (μελίτωμα), τα οποία μετατρέπουν και αποθηκεύουν στις κηρήθρες τους μέχρι να ωριμάσουν (Standard for honey codex stan).

Το μέλι σαν τροφή του ανθρώπου είναι ένα από τα πολυτιμότερα, θρεπτικότερα και πιο υγιεινά τρόφιμα. Δίνει ενέργεια στους μύες, διαύγεια στο μυαλό, απολυμαίνει και ρυθμίζει το πεπτικό σύστημα. Σήμερα αναγνωρίζεται η θεραπευτική του αξία στην

δυσκοιλιότητα, στις καρδιοπάθειες, στην αναιμία, στην αδενοπάθεια καθώς και στις περιπτώσεις κατάπτωσης και αδυναμίας του οργανισμού.

1.2 Η ιστορία του μελιού

Η μέλισσα εμφανίστηκε στον πλανήτη μας την Τριτογενή περίοδο στην αρχή της Καινοζωϊκής εποχής, δηλαδή πριν 65 εκατομμύρια χρόνια, πολύ νωρίτερα από την εμφάνιση του ανθρώπου. Αν υποθέσουμε ότι μαζί με τις μέλισσες εμφανίστηκε και το μέλι, μπορούμε να συμπεράνουμε με σιγουριά ότι από τότε μέχρι σχεδόν το 16ο μ.Χ. αιώνα το μέλι ήταν το μοναδικό ζαχαρώδες μη παρασκευασμένο τρόφιμο στον τότε «γνωστό» κόσμο.

Κατά τη διάρκεια της προϊστορίας ο άνθρωπος υπήρξε κυνηγός και η τροφή ήταν αδιάρρηκτα δεμένη με τον τόπο που ζούσε. Σε βραχώδεις περιοχές οι μέλισσες εύκολα εύρισκαν καταφύγιο και έφτιαχναν τις φωλιές τους. Στις ίδιες αυτές περιοχές οι άνθρωποι ζωγράφισαν τη διαδικασία αυτού του εντυπωσιακού κυνηγιού. Κυνηγοί μελιού και όχι κυνηγοί «ζώου». Κυνηγοί δηλαδή τροφής χωρίς να θανατώνουν το ζώο που την παράγει και μάλιστα μιας πολύ γλυκιάς τροφής που όμοιας της δεν υπήρξε μέχρι την ανακάλυψη της ζάχαρης.

Στην Ισπανία έχουμε τις πρωιμότερες απεικονίσεις συλλογής μελιού μέχρι τώρα και βρίσκονται σε μεσολιθικές σπηλαιογραφίες την 6η χιλιετία π.Χ., δείχνοντας ανθρώπους σε θέσεις συλλογής μελιού, ενώ γύρω τους πετούν μέλισσες (εικόνα 1).



Εικόνα 1: Μεσολιθικές σπηλαιογραφίες στην Arana της Ισπανίας
Πηγή: Eva Crane. The world History of Beekeeping and honey hunting

Οι αρχαίοι Έλληνες είχαν δώσει μυθικές διαστάσεις στο μέλι καθώς το συνέδεαν με τους θεούς. Το χρησιμοποίησαν από πολύ νωρίς για ιατρική χρήση και το βρίσκουμε σε πολλά συγγράμματα του Ιπποκράτη που αναφέρονται στις ευεργετικές ιδιότητες του. Ο Ιπποκράτης χρησιμοποιούσε παρασκευάσματα με μέλι όπως το μελίκριτον (μέλι με νερό) και το οξυμέλι (μέλι με ξύδι), για να ανακουφίσει ασθενείς με οξέα νοσήματα. Επίσης έλεγε ότι το μέλι ζηρεύει το χρώμα του προσώπου και είναι ωφέλιμο σε αρρώστους αλλά και σε υγιείς.

Ο Πυθαγόρας έκανε την διαπίστωση ότι το μέλι εξαφανίζει την κόπωση και ύστερα από έντονη πνευματική ή χειρονακτική εργασία λίγο μέλι με γάλα έδινε στον ταλαιπωρημένο οργανισμό νέες δυνάμεις. Οι παιδαγωγοί της Σπάρτης αποσύρονταν με τους εφήβους στρατιώτες για ένα μήνα στον Ταΰγετο, όπου τρέφονταν αποκλειστικά με μέλι (μήνας του μέλιτος).

Το αρχαιότερο πρόσωπο στον χώρο της μελισσοκομίας είναι ο Αρισταίος, ο οποίος αποτέλεσε τον καρπό της ένωσης του Απόλλωνα με την νύμφη Κυρήνη. Όταν γεννήθηκε, ο Αρισταίος, ο Ερμής τον παρέδωσε στη Γαία και στις Ώρες οι οποίες τον ανέθρεψαν στάζοντας στα χείλη του νέκταρ και αμβροσία (μέλι) για να γίνει αθάνατος. Ο μύθος του Αρισταίου μαρτυρεί την ύπαρξη εντατικής μελισσοκομίας στην αρχαιότητα

Στην Κρήτη κατά τις ανασκαφές στη Φαιστό βρέθηκαν πήλινες κυψέλες της Μινωικής Εποχής(3400 π.Χ.) πολύ αρχαιότερης της Ομηρικής. Στην αρχαία πόλη της Κνωσού βρέθηκε πινακίδα με την επιγραφή «Πάσι Θεοίς Μέλι: ΑΜΦΟΡΕΥΣ 1» που σημαίνει «Προσφέρεται σε όλους τους Θεούς μέλι: ένας αμφορέας». Η φράση είναι γραμμένη στο συλλαβικό αλφάβητο της Γραμμικής Β' τον 14^ο αιώνα π.Χ. και μεταφράστηκε από τον Βρετανό αρχιτέκτονα Μιχαήλ Βεντρ (Michael Ventris) το 1952.

Συνδυασμός μελιού και γάλακτος (μελίκρατον) αναφέρεται στην Οδύσσεια, ενώ τα συγγράμματα του Αριστοτέλη (322 π.Χ.) αποτέλεσαν σπουδαίο σταθμό για τη μελισσοκομία της αρχαίας Ελλάδας και του τότε πολιτισμένου κόσμου.

Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι χρησιμοποιούσαν θεραπευτικά σκευάσματα με μέλι. Περιγράφεται μεταξύ άλλων αλοιφή με μέλι για την χειρουργική πληγή της περιτομής, στοιχείο που μας δείχνει ότι γνώριζαν τη δράση του κατά των μολύνσεων. Αναφέρεται επίσης ότι πολλά καλλυντικά της Κλεοπάτρας είχαν για βασικό τους συστατικό το μέλι. Σύμφωνα με την αιγυπτιακή μυθολογία όταν ο θεός Ρα έκλαψε, τα δάκρυα του έπεσαν στο έδαφος και έγιναν μέλισσες. Το μέλι θεωρούνταν πολύτιμο στην αρχαία Αίγυπτο όπου προσφέρονταν στους θεούς, κηρήθρες με μέλι για να τους δείξουν την αφοσίωση τους. Το 12^ο αιώνα π.Χ. , ο Ραμσής Β' προσέφερε 15 τόνους μελιού στον θεό του Νείλου ενώ δοχεία με μέλι θάφτηκαν μαζί με τους νεκρούς ως τροφή για τη μετά θάνατον ζωή. Ποσότητες μελιού σε δοχεία βρέθηκαν και στον τάφο του Τουταγχαμών.

Μέχρι τα μέσα του 18^{ου} αιώνα ήταν η μοναδική γλυκαντική ουσία που είχε στην διάθεση του ο άνθρωπος και σε όλη την Ευρώπη ήταν τροφή κυρίως των βασιλιάδων και των πλουσίων. Στον λαό έδιναν να τρώει τον βασιλικό πολτό τον οποίο θεωρούσαν κατώτερο προϊόν και δεν ήξεραν καμία από τις ιδιότητες του. ^[1]

Η ευρωπαϊκή κυψέλη όπως την γνωρίζουμε σήμερα ανακαλύφτηκε το 1851 από τον Αμερικανό Λορέντζο Λορέιν Λάνγκστροθ. Ο εκσυγχρονισμός στην Ελλάδα έγινε με σημαντική καθυστέρηση το 1903. Σύμφωνα με τα επίσημα στοιχεία τη χρονιά εκείνη η χώρα είχε 201.314 μελίσινα σε εγχώριες κυψέλες (καλάθια) και μόνο 412 μελίσινα σε σύγχρονες κυψέλες. Δηλαδή μόνο το 0,2% του συνολικού των μελισσιών ήταν εγκατεστημένα σε ευρωπαϊκές κυψέλες. Το 1912 είχαν τοποθετηθεί 3.000 μελίσινα (1,19%) σε νέες κυψέλες. Μετά το τέλος του Β' Παγκοσμίου Πολέμου το Τμήμα Μελισσοκομίας του Υπουργείου Γεωργίας χορήγησε στους μελισσοκόμους δωρεάν 93.500 κυψέλες, 3.100 μελιτοεξαγωγείς και 3.000.000 τεχνητές κηρήθρες.

Με αυτόν τον τρόπο δόθηκε η ώθηση για την ανάπτυξη της μελισσοκομίας στη Ελλάδα και μέχρι σήμερα δεν έχει σταματήσει να εξελίσσεται και να εκσυγχρονίζεται. Η διαρκής ενημέρωση των μελισσοκόμων, μέσα από τα σεμινάρια ιδιωτών αλλά και του Υπουργείου, για νέες τεχνικές είναι ένα σημαντικό εργαλείο στα χέρια τους.

1.3 Η κοινωνία της μέλισσας

1.3.1 Η ανατομία της μέλισσας

Οι μέλισσες είναι έντομα με φτερά που ανήκουν στο γένος *Apis*. Το πιο γνωστό είδος μέλισσας είναι η ευρωπαϊκή μέλισσα που φέρει την επιστημονική ονομασία *Apis mellifera*. Η εξέλιξη των μελισσών υποστηρίζεται ότι έγινε από ένα είδος που έμοιαζε περισσότερο στις σφήκες, γι' αυτό και οι μέλισσες έχουν πολλά φυσικά κοινά χαρακτηριστικά με αυτές.

Το σώμα μιας μέλισσας έχει πολλά κοινά χαρακτηριστικά με το σώμα άλλων εντόμων. Μεγάλο μέρος της καλύπτεται από έναν εξωσκελετό, κατασκευασμένο από μικρά, κινητά «πιάτα» χιτίνης. Καλύπτεται επίσης σε πολλά μέρη του από ασαφές και διακλαδισμένο τρίχωμα, το οποίο τη βοηθά να συλλέγει τη γύρη αλλά και να ρυθμίζει τη θερμοκρασία του σώματός της. Το σώμα χωρίζεται σε 3 διακριτά τμήματα: το κεφάλι, το θώρακα και την κοιλιά.

Παρά το μικρό μέγεθος του εγκεφάλου της, η μέλισσα μπορεί να εκτελεί αρκετά πολύπλοκες διαδικασίες. Επίσης, στο κεφάλι της, έχει δύο αισθητήριες κεραίες και πέντε μάτια, τρία απλά και δύο σύνθετα, τα οποία επιτρέπουν την όραση στο πολωμένο φως, κάτι το οποίο είναι αδύνατον στον άνθρωπο. Στο στόμα της βρίσκεται μια μεγάλη προβοσκίδα, την οποία χρησιμοποιεί για την συλλογή νέκταρ ενώ στο θώρακα φέρει δύο ζευγάρια φτερά και τρία ζευγάρια πόδια. Το δηλητηριώδες κεντρί της μέλισσας βρίσκεται στην άκρη της κοιλιάς. [\[2\]](#)

1.3.2 Τα μέλη της κυψέλης

Οι μέλισσες είναι κοινωνικά έντομα. Ζουν σε οικογένειες μελίσινα που αριθμούν συνήθως 50.000 άτομα και αποτελούνται από μία βασίλισσα, πολλές χιλιάδες κηφήνες και εργάτριες.

Η βασίλισσα είναι η μητέρα όλου του μελισσιού. Είναι επίσης το μοναδικό «αληθινό» θηλυκό (μόνο αυτή μπορεί να γεννήσει). Η άκρα εξειδίκευσή της την κάνει μια ωτόκο μηχανή.

Οι εργάτριες, ατελή θηλυκά, κάνουν όλες τις δουλειές που χρειάζονται. Δηλαδή θρέφουν το γόνο, καθαρίζουν την κυψέλη και βέβαια συλλέγουν νέκταρ, γύρη, νερό και πρόπολη από το γύρω περιβάλλον.

Οι κηφήνες είναι τα αρσενικά άτομα του μελισσιού. Οι κηφήνες παράγουν θερμότητα και ζεσταίνουν το γόνο, αερίζουν την κυψέλη το καλοκαίρι κουνώντας τα φτερά τους, διαμοιράζουν το νέκταρ και γονιμοποιούν τη βασίλισσα.

Τόσο οι βασίλισσες, όσο οι εργάτριες και οι κηφήνες προέρχονται από το ίδιο αυγό. Αυγά που εξελίσσονται σε κηφήνες δεν είναι γονιμοποιημένα. Οι βασίλισσες και οι εργάτριες προέρχονται από γονιμοποιημένα αυγά. Το εάν από το γονιμοποιημένο αυγό θα προέλθει βασίλισσα ή εργάτρια, αυτό εξαρτάται από το είδος της τροφής που θα πάρει κατά τη διάρκεια της προνυμφικής και νυμφικής ζωής. Πάντως ακόμα και η προνυμφική τροφή είναι ίδια μέχρι και το τέλος της δεύτερης μέρας του σταδίου αυτού. Οι μέλισσες εργάτριες δίνουν στις νεαρές προνύμφες βασιλικό πολτό, μια αδενική έκκρισή τους. Μερικές φορές από τη δεύτερη κιόλας μέρα, αλλά κατά κύριο λόγο από τη τρίτη, η διαίτα

των προνυμφών που προορίζονται για εργάτριες αλλάζει σιγά-σιγά, δηλαδή προστίθεται μέλι και γύρη και η τροφή είναι κατά κάποιο τρόπο «ακατέργαστη».

Προνύμφες που προορίζονται για βασίλισσες, τρέφονται με βασιλικό πολτό σε όλη τη διάρκεια του προνυμφικού σταδίου. Κατά τη διάρκεια των πρώτων 24-36 ωρών της προνυμφικής τους ζωής, βασίλισσα και εργάτρια δεν ξεχωρίζουν. Η τροφή αυτή είναι υπεύθυνη για τη διαφοροποίηση σε βασίλισσα. Στο εργαστήριο, με τη χρησιμοποίηση προνυμφών διαφόρων ηλικιών και με έλεγχο της τροφοδότησής τους, μπορούμε να παράγουμε πλάσματα ενδιάμεσα βασιλισσών-εργατριών που πολλά μοιάζουν με βασίλισσες χωρίς όμως να ναι.

Η συνέχιση της τροφοδότησης με βασιλικό πολτό, όχι μόνο αλλάζει την κατεύθυνση της εξέλιξης αλλά και την επιταχύνει. Έτσι ενώ η εργάτρια αναπτύσσεται σε 21 μέρες, μόνο 16 είναι αρκετές για την έξοδο μιας βασίλισσας.

Βασίλισσες εκτρέφονται σε ένα μελίσι κάτω από τις ακόλουθες συνθήκες:

- 1) Όταν για κάποιο λόγο χαθεί η υπάρχουσα βασίλισσα
- 2) Όταν προετοιμάζεται σημιουργία (φυσικός πολλαπλασιασμός)
- 3) Όταν η βασίλισσα αντικαθίσταται από τις μέλισσες, γιατί είναι αρκετά ηλικιωμένη και δεν παράγει πια τις χημικές ουσίες αναγνώρισής της (φερομόνες)

Οι κηφήνες εκκολάπτονται από τα κελιά τους 24 μέρες αφότου τα αγονιμοποίητα αυγά τοποθετηθούν μέσα σε αυτά. Τρώνε σχεδόν αμέσως μετά την έξοδό τους, αλλά σύντομα μαθαίνουν να ζητούν τροφή από τις εργάτριες. Μόλις μάθουν έτσι, φαίνονται ανήμποροι να μπορούν να ξαναθρέψουν μόνοι τους εαυτούς τους. Το φθινόπωρο, όταν οι εργάτριες σταματήσουν να θρέφουν τους κηφήνες, αυτοί δεν αυτοτρέφονται, αλλά πεθαίνουν της πείνας.

ΣΤΑΔΙΟ	ΚΗΦΗΝΑΣ	ΕΡΓΑΤΡΙΑ	ΒΑΣΙΛΙΣΣΑ
ΑΥΓΟ	3	3	3
ΠΡΟΝΥΜΦΗ(ΣΚΟΥΛΗΚΙ)	6,5	6	5,5
ΝΥΜΦΗ	14,5	12	7,5
ΣΥΝΟΛΟ	24	21	16

Πίνακας 1: Χρόνος ανάπτυξης (σε μέρες) για τις βασίλισσες εργάτριες και κηφήνες (ROGER A. MORSE : Παραγωγή και εκτροφή βασιλισσών)

Μια παρθένα βασίλισσα «αναδύεται» από το κελί της κατά το τέλος της 16ης μέρας, αφότου γεννήθηκε το αυγό σε αυτό. Μια βασίλισσα που μόλις εκκολάφτηκε δεν παράγει καμιά χημική ουσία σαν και αυτές που εκκρίνουν οι ώριμες βασίλισσες και αναγνωρίζονται. Αυτές οι ουσίες παράγονται αργότερα και συνήθως μετά ή κατά την τρίτη ημέρα, όπου οι εργάτριες έλκονται και αρχίζουν να γλείφουν και να υπηρετούν τη βασίλισσα.

Βασίλισσες που πρόσφατα εκκολάφτηκαν είναι γενικά πιο δραστήριες από τις εργάτριες της ίδιας ηλικίας. Κινούνται συνέχεια στην περιοχή του γόνου και ψάχνουν για άλλες παρθένες βασίλισσες ή βασιλικά κελιά. Παρθένες βασίλισσες θα πολεμήσουν μεταξύ τους μέχρις ότου μία επιβιώσει. Αν βρεθούν βασιλικά κελιά στο διάβα της η βασίλισσα τους κάνει μια τρύπα στο πλάι. Συχνά αλλά όχι πάντα κεντρίζει και σκοτώνει τις βασίλισσες που αναπτύσσονται μέσα σε αυτά. Το άνοιγμα της τρύπας στο πλαϊνό κάθε βασιλοκελίου

αποτελεί προφανώς ένα σημάδι για τις εργάτριες, που θα συνεχίσουν το «γκρέμισμα» του κελιού. Οι παρθένες βασίλισσες δεν δίνουν καμία προσοχή στα ανοιχτά βασιλικά κελιά, που περιέχουν βασιλικές προνύμφες σε εξέλιξη. Η παρουσία μιας παρθένας βασίλισσας στην κυψέλη φαίνεται ότι ενεργοποιεί τις εργάτριες να σταματήσουν την τροφοδότησή τους και να καταστρέψουν τα κελιά και το περιεχόμενό τους, αν και αυτό μπορεί να μη συμβεί αμέσως. Μια και οι εργάτριες, φαίνεται ότι, δεν μπορούν να αναγνωρίσουν μια βασίλισσα τις πρώτες μέρες ζωής της, δεν είναι απόλυτα ξεκαθαρισμένο πως παίρνεται αυτό το μήνυμα.

Οι κηφήνες ωριμάζουν αργά. Δεν είναι σε θέση να γονιμοποιήσουν αν δεν έχουν ηλικία 8-12 ημερών. Η τροφή, η θερμοκρασία και η φυλετική προέλευση φαίνεται να επηρεάζουν το χρόνο της σεξουαλικής ωριμότητας. Οι κηφήνες ζουν στα άκρα της γονοφωλιάς. Μάλλον οι εργάτριες δεν θα τους ανεχτούν στα μέσα της γονοφωλιάς και θα τους διώξουν. Οι πτήσεις των κηφήνων διαρκούν μέχρι και 55' αν και συνήθως είναι διάρκειας 30'. Οι κηφήνες δεν σταματούν για ξεκούραση αλλά επιστρέφουν στην κυψέλη όταν εξαντληθούν τα αποθέματα των τροφών τους. Ποτέ δεν βρέθηκε ώριμος και κανονικός κηφήνας να ξεκουράζεται στους αγρούς. Γέροι και πεινασμένοι κηφήνες μπορούν να βρεθούν πάνω στα φυλλώματα (σπάνια σε λουλούδια), κοντά στις κυψέλες, αργά το φθινόπωρο, αφού μάλλον πετάχτηκαν έξω από τις κυψέλες, από τις εργάτριες, που ετοιμάζονται για ξεχειμώνιασμα. ^[3]

1.3.3 Αναπαραγωγή των μελισσών

Περίπου στις 3-5 μέρες μετά την εκκόλαψη, η παρθένα βασίλισσα θα πετάξει φυσιολογικά για πρώτη φορά. Οι πτήσεις μπορεί να διαρκέσουν 2-20 λεπτά. Αν η πτήση είναι μικρής διάρκειας, τότε είναι πτήση προσανατολισμού μόνο. Περίπου οι μισές από τις παρθένες βασίλισσες γονιμοποιούνται με τη πρώτη πτήση. Ο Stephen Tober κατέδειξε το 1954, ότι οι βασίλισσες γονιμοποιούνται από 6-7 κηφήνες, σε δύο ή τρεις πτήσεις γονιμοποιήσεων, σε μια περίοδο μιας ή δύο ημερών.

Μετά τη γονιμοποίηση οι κηφήνες πεθαίνουν. Ένας κηφήνας μπορεί να βρεθεί πεθαμένος μόλις ένα γονιμοποιημένο ζευγάρι πέσει στο έδαφος. Συνήθως οι βασίλισσες αποσπώνται από τους κηφήνες αμέσως μετά τη συμπλήρωση της γονιμοποίησης και μερικές φορές μπορούν να γυρίσουν στην κυψέλη έχοντας πάνω τους τα γεννητικά όργανα του κηφήνα, σημείο γονιμοποίησης.

Η γονιμοποίηση στις μέλισσες γίνεται σε ειδικές περιοχές γνωστές σαν περιοχές συγκέντρωσης κηφήνων. Υπάρχουν συνήθως αρκετές τέτοιες περιοχές στην πτητική ακτίνα κάθε μελισσοκομείου. Αυτές οι περιοχές παραμένουν ίδιες κάθε χρόνο. ^[3]

1.4 Πως παράγεται το μέλι

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

Οι μέλισσες μετατρέπουν τα διάφορα σάκχαρα σε μέλι με τη μέθοδο της παλινδρόμησης, μια διαδικασία που επαναλαμβάνεται συνεχώς, έως ότου χωνεύεται

μερικώς. Οι μέλισσες κάνουν την παλινδρόμηση και τη πέψη ταυτόχρονα. Μετά την τελευταία παλινδρόμηση, το υδατικό διάλυμα έχει ακόμη υψηλή περιεκτικότητα σε νερό, έτσι ώστε η διαδικασία να συνεχίζεται με εξάτμιση του μεγαλύτερου μέρους του ύδατος και με ενζυμική επεξεργασία. Στη συνέχεια τα φυσικά σάκχαρα του μελιού αφυδατώνονται με προσθήκη ενζύμων που τροποποιούν και επηρεάζουν τη χημική σύνθεση και το pH του, γεγονός που εμποδίζει τη ζύμωσή τους. Ινβερτάσες και πεπτικά οξέα υδρολύουν σακχαρόζη για να παραχθούν γλυκόζη και φρουκτόζη που είναι μονοσακχαρίτες. Η ινβερτάση είναι ένα ένζυμο που συντίθεται από το σώμα του εντόμου.

Το μέλι που παράγεται από τις μέλισσες αποτελεί τη τροφή τους. Σε κρύο καιρό ή όταν δεν υπάρχουν φρέσκες πηγές τροφής, οι μέλισσες χρησιμοποιούν το αποθηκευμένο μέλι τους ως πηγή ενέργειας. Με την επινόηση του ανθρώπου να χρησιμοποιεί τεχνικές κυψέλες ώστε να φωλιάζουν σμήνη, οι άνθρωποι ήταν σε θέση να εκμεταλλευτούν τα έντομα, με αποτέλεσμα τη μεγάλη παραγωγή μελιού. ^[4]

1.5 Η χημική σύσταση του μελιού

Το μέλι είναι ένα πυκνό, υπέρκορο υδατικό διάλυμα απλών και σύνθετων σακχάρων, και μεγάλης ποικιλίας άλλων ουσιών, συμπεριλαμβανομένων ανόργανων ιόντων, ιχνοστοιχείων, ουσιών που βρίσκονται σε κolloειδή διασπορά όπως είναι οι μακρομοριακές ενώσεις πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών, ενζύμων, οργανικών οξέων, αρωματικών ουσιών, γυρεοκόκκων, κ.α. Το σύνολο των ουσιών αυτών αποτελούν τα κύρια συστατικά του μελιού και είναι οι ουσίες που συναντούμε σε όλα τα μέλια σε μεγαλύτερες ή μικρότερες συγκεντρώσεις. Η μέση σύσταση του ελληνικού μελιού φαίνεται στον πίνακα 2:

Πίνακας 2: Μέση σύσταση του ελληνικού μελιού, με βάση 144 δείγματα από μέλια ανθέων και 30 μελιτώματων (Thrasynoulou and Manikis, 1995).

Συστατικό	Μέλι ανθέων		Μέλι από μελιτώματα	
	Μέση τιμή	Διακύμανση	Μέση τιμή	Διακύμανση
Υγρασία (%)	17,2	14,9-23,0	15,9	13,0-18,9
Φρουκτόζη (%)	38,52	28,0-46,1	28,35	22,2-33,9
Γλυκόζη (%)	31,98	23,4-39,2	22,5	13,4-31,9
Σουκρόζη (%)	3,29	0,0-7,0	3,68	0,01-12,0
Μαλτόζη (%)	-	-	6,24	0,5-11,2
pH	4,0	3,3-5,4	4,9	4,5-5,9
Αγωγιμότητα (mS/cm)	0,64	0,15-2,06	1,33	1,01-1,69
Τέφρα (%)	0,32	0,1-1,2	0,75	0,4-1,1
HMF (mg/Kg)	5,1	0,0-11,9	2,4	0,0-8,2
Διαστάση (DU)	22,92	8,6-51,0	23,45	10,4-37,2
Προλίνη (mg/Kg)	550	264-1205	452	290-673

Για την παραγωγή, ωρίμανση, συγκομιδή και μετασυλλεκτική μεταχείριση του μελιού, συντελούν πλήθος παραγόντων που μπορεί να επηρεάσουν τα συστατικά του ως

προς τις συγκεντρώσεις στις οποίες ανιχνεύονται μέσα στο τελικό προϊόν. Κάποιοι από τους παράγοντες αυτούς είναι το φυτικό είδος από το οποίο τρέφεται και το είδος της τροφής του μελισσιού (νέκταρ, γύρη, μελιτώδεις εκκρίσεις ή τεχνητή τροφή που παρέχεται από το μελισσοκόμο), η περιοχή στην οποία βρίσκεται το μελίσσι, οι συνθήκες συγκομιδής του μελιού (θέρμανση κατά τον τρύγο του μελιού, καθαριότητα και υγρασία του χώρου), οι συνθήκες αποθήκευσης του μελιού. Για παράδειγμα, τα μέλια ανθέων είναι πλουσιότερα σε απλά σάκχαρα, φτωχότερα σε δισακχαρίτες και ανώτερα σάκχαρα και περιέχουν πολύ λιγότερα οξέα. Η αυξημένη ποσότητα της τέφρας στο μέλι από μελιτώματα του δίνει υψηλότερο pH, ενώ έχει και υψηλότερα ποσά αζώτου.

Στο πλήθος και τη φύση των συστατικών του μελιού, οφείλονται μία σειρά από χαρακτηριστικές φυσικές ιδιότητες που σχετίζονται άμεσα με την εμφάνιση, τα οργανοληπτικά και τα μικροσκοπικά χαρακτηριστικά του. Αυτό συμβαίνει γιατί τα συστατικά του μελιού βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία μέσα στο μέλι και αλληλοεπιδρούν με την πάροδο του χρόνου, μεταβάλλοντας τη φύση και τη δομή του μελιού. Έτσι, ένα μέλι που αμέσως μετά την παραγωγή του είναι ρευστό, αργότερα μπορεί να κρυσταλλώσει σε χρόνο που εξαρτάται από τη χημική του σύνθεση και την περιεκτικότητά του σε γυρεόκοκκους, κομμάτια από κεριά κ.α.

Η μελέτη των συστατικών του μελιού μας δίνει πολλές πληροφορίες για την ταυτότητα του μελιού και την ποιοτική του ταξινόμηση, παράμετροι που αυξάνουν ή μειώνουν την εμπορική και ποιοτική του αξία, πάντα σε συνδυασμό με τις ρήτρες της τοπικής και της Διεθνούς Νομοθεσίας. [\[5\]](#)

1.5.1 Σάκχαρα (Υδατάνθρακες)

Το μέλι αποτελείται κατά 83% περίπου από σάκχαρα (βλ. πίνακα 2) Τα σάκχαρα είναι οργανικές ενώσεις μικρού μέχρι μεγάλου μοριακού βάρους, που παρέχουν σημαντικό ποσοστό της ενέργειας που χρειάζονται οι ζωντανοί οργανισμοί για την εκτέλεση ζωτικών λειτουργιών, ενώ αποτελούν δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και των κυττάρων σε ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς. Σε αναλύσεις στο μέλι, έχουν βρεθεί τουλάχιστον 22 διαφορετικά σάκχαρα.

Τα σάκχαρα που συναντάμε σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις στο μέλι είναι οι μονοσακχαρίτες φρουκτόζη και γλυκόζη, καθώς και σάκχαρα που δεν υπάρχουν στο νέκταρ ή τα μελιτώματα των φυτών, αλλά προέχονται από την ιμπερτοποίηση (υδρόλυση) της σουκρόζης στον πρόλοβο των μελισσών. Κατά την διαδικασία παραγωγής του μελιού, οι μέλισσες εκκρίνουν το ένζυμο ιμπερτάση (invertase) από τους υποφαρυγγικούς τους αδένες, το οποίο διασπά τη σουκρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη. Λόγω της υψηλότερης διαλυτότητας της γλυκόζης από τη σουκρόζη στη θερμοκρασία κυψέλης, παράγεται ένα διάλυμα σακχάρων μεγαλύτερης συγκέντρωσης σε φρουκτόζη (Crane, 1990).

Η σουκρόζη (δισακχαρίτης) είναι το βασικότερο σάκχαρο που περιέχεται στο νέκταρ και τα μελιτώματα των φυτών, ενώ αποτελεί και συστατικό του μελιού σε μικρή συγκέντρωση (2,5%). Η μαλτόζη, η μελεζιτόζη και άλλοι δισακχαρίτες, βρίσκονται στο μέλι σε ποσοστό 7,3%. Το μέλι περιέχει επίσης πολλά σε αριθμό άλλα σάκχαρα, γνωστά ως ολιγοσακχαρίτες. Οι ολιγοσακχαρίτες είναι μέσου μεγέθους σύνθετα σάκχαρα, που περιέχουν πάνω από τρία απλά σάκχαρα, ενώ συχνά απαρτίζονται από μονοσακχαρίτες και δισακχαρίτες. Ενίοτε αναφέρονται και ως ανώτερα σάκχαρα. Η ισομαλτόζη, η ραφινόζη, η τρεχαλόζη, η καλοβιόζη, η νιγερόζη, η τυρανόζη, η κεστόζη, η κεντοβιόζη, η τρεαλόζη, η δεξτρίνη είναι κάποια από τα περιεχόμενα στο μέλι σάκχαρα που αναφέρονται ενδεικτικά.

Συγκριτικά με τα άλλα σάκχαρα, η γλυκόζη είναι σχετικά αδιάλυτη και το ποσοστό της στο μέλι, καθορίζει την τάση του μελιού για κρυστάλλωση. Η φρουκτόζη είναι ένα πολύ γλυκό σάκχαρο, καθώς επίσης και υγροσκοπικό, απορροφώντας υγρασία από την ατμόσφαιρα. Αντίθετα η γλυκόζη και η σουκρόζη είναι κατά πολύ λιγότερο υγροσκοπικά σάκχαρα, συνεπώς οι υγροσκοπικές ιδιότητες του μελιού οφείλονται εξ ολοκλήρου στη φρουκτόζη. Πολύ λίγα μέλια είναι πλουσιότερα σε γλυκόζη παρά σε φρουκτόζη σύμφωνα με την μέση σύσταση του μελιού. Αυτό συμβαίνει στις περιπτώσεις της ελαιοκράμβης (*Brassica napus*), του ραδικιού (*Taraxacum officinale*) και της μέντας (*Trichostema lanceolatum*).

Η μέση σύσταση των σακχάρων σε ένα μέλι διαφέρει ανάλογα με το αν αυτό είναι ανθόμελο, ή είναι μέλι από μελιτώματα (Thrasynoulou and Manikis, 1995). Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2, τα μέλια ανθέων είναι πλουσιότερα σε απλά σάκχαρα (γλυκόζη και φρουκτόζη) απ' ό,τι τα μέλια από μελιτώματα, αλλά φτωχότερα σε δισακχαρίτες και ανώτερα σάκχαρα. Η μαλτόζη, ως συστατικό των μελιτωμάτων παρουσιάζεται μόνο στα μέλια μελιτωμάτων και εμπεριέχεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση συγκριτικά με τη σουκρόζη. Στα αμιγή μέλια ανθέων η μαλτόζη δεν αποτελεί συστατικό.

Περίπου το 95% των σακχάρων του μελιού είναι ζυμώσιμα, χαρακτηριστικό που είναι σημαντικό για τις βιομηχανίες που παράγουν μύρα και κρασί από μέλι, καθώς επίσης και για την αρτοποιία.

Οι υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων στο μέλι του προσδίδουν χαρακτηριστικές φυσικές ιδιότητες, όπως υψηλό ιξώδες, υψηλή πυκνότητα, τάση για κρυστάλλωση, υγροσκοπικότητα και αντιβακτηριακές ιδιότητες.

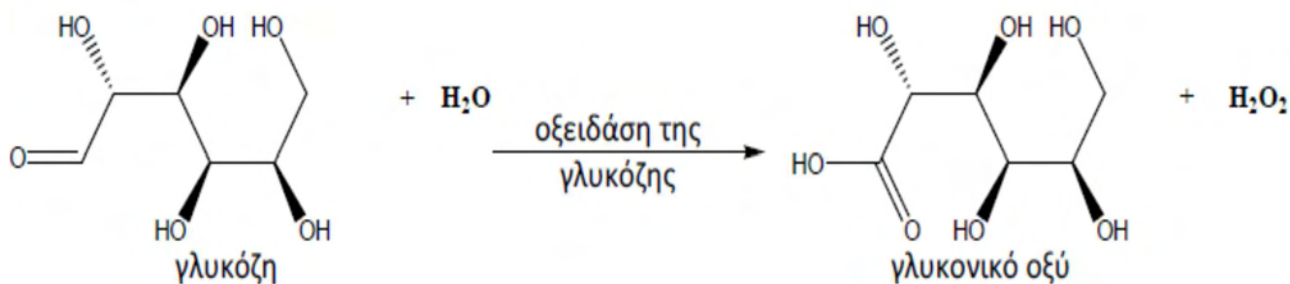
Στη μεγάλη ποικιλία, αλλά και το είδος των σακχάρων του μελιού οφείλεται το γεγονός ότι δεν πρόκειται απλά για μια γλυκαντική τροφή. Η ικανότητά του να κρατά χαμηλή την υγρασία και να παρατείνει τη διάρκεια ζωής σχετίζεται με τους υδατάνθρακες, ενώ είναι καταλυτική και η συνεισφορά αυτών στο χρώμα και τη γεύση. ^{[6], [7]}

1.5.2 Οργανικά οξέα

Ως οργανικά οξέα ορίζονται οι οργανικές ενώσεις που έχουν όξινες ιδιότητες. Πιο κοινά είναι τα καρβοξυλικά οξέα, τα οποία έχουν καρβοξυλική ομάδα στο μόριό τους (-COOH). Πολλά καρβοξυλικά οξέα βρίσκουν χρήση στη χημεία τροφίμων ως συντηρητικά, ενισχυτικά της γεύσης κλπ.

Το μέλι περιέχει έναν αριθμό 20 περίπου οργανικά οξέων, σε μέση συγκέντρωση 0,57% (διακύμανση 0,17-1,17%). Μερικά από αυτά είναι το γλυκονικό οξύ, το κιτρικό, το οξικό, το βουτυρικό, το ταρταρικό, το οξαλικό, το μαλεϊκό, το μηλικό, το μυρμηγκικό κ.α. Τα οργανικά οξέα, παίζουν καθοριστικό ρόλο τόσο στην όξινη φύση και στη γεύση του μελιού, όσο και στην αντιβακτηριακή του δράση. Το μέσο pH του μελιού κυμαίνεται μεταξύ 3,3 και 5,9. Η ολική οξύτητα του μελιού είναι 29,12 meq/Kg, με την τιμή να κυμαίνεται μεταξύ 8,68 και 59,49 meq/kg και την τυπική απόκλιση να έχει τιμή 10,33 meq/Kg.

Από τα οργανικά οξέα που περιέχονται στο μέλι, το σημαντικότερο είναι το γλυκονικό οξύ, το οποίο παράγεται στο μέλι από την επίδραση του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης στη γλυκόζη, αντίδραση κατά την οποία σχηματίζεται και υπεροξειδίο του υδρογόνου (Εικόνα 2). Στο υπεροξειδίο του υδρογόνου και σε άλλες ενώσεις, όπως κάποια καρβοξυλικά οξέα, οφείλεται μεγάλο μέρος της αντιβακτηριακής δράσης που έχει το μέλι. Το γλυκονικό οξύ, επίσης, ανάλογα με την συγκέντρωσή του σε ένα μέλι, έχει την ιδιότητα να εντείνει τη γεύση του.



Εικόνα 2: Αντίδραση της γλυκοξειδάσης

Ανάμεσα στα οργανικά οξέα του μελιού, περιλαμβάνονται και κάποια αλειφατικά και αρωματικά οξέα, με τα τελευταία να συνεισφέρουν σημαντικά στη γεύση αυτού.

Η παρουσία των οξέων στο μέλι είναι σημαντική για τους εξής λόγους:

- Τα οξέα αποτελούν σημαντικά συστατικά της γεύσης και του αρώματος των μελιών
- Το χαμηλό pH παρεμποδίζει την ανάπτυξη μικροοργανισμών στο μέλι.

Τα ανθόμελα έχουν χαμηλότερο μέσο pH 4(με διακύμανση pH 3,3-5,4), από τα μέλια μελιτωμάτων που είναι ίσο με 4,9 (μεδιακύμανση pH 4,5-5,9). Αυτό εξηγείται εν μέρει από την παρουσία μεγαλύτερης ποσότητας γλυκόζης (και ως εκ τούτου γλυκονικού οξέος) στα μέλια ανθέων. [\[6\]](#)

1.5.3 Πρωτεΐνες και αμινοξέα του μελιού

Το μέλι διαθέτει περίπου 20 πρωτεΐνες και 18 αμινοξέα, συστατικά που ανιχνεύονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις στο μέλι. Οι πρωτεΐνες αποτελούν το 0,2% 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. Οι πρωτεΐνες αποτελούν σημαντικότερη τροφή για τις μέλισσες. Χωρίς αυτές ο γόνος δεν αναπτύσσεται και το μέλισσι τελικά πεθαίνει. Οι περισσότερες πρωτεΐνες του μελιού είναι πεπτόνες, αλβουμίνες, γλοβουλίνες και νουκλεοπρωτεΐνες με κυριότερη την αλβουμίνη.

Υπάρχουν περιπτώσεις μελιών που περιέχουν πρωτεΐνες σε μεγάλη συγκέντρωση, με αποτέλεσμα τα μέλια αυτά να είναι θιξοτροπικά. Αυτό συμβαίνει γιατί το μεγάλο μοριακό βάρος των πρωτεϊνών δίνει στο μέλι μεγαλύτερο ιξώδες. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα είναι το μέλι ερείκης που περιέχει 1,5% πρωτεΐνες και αυτό από *Leptospermum* με 1-1,2% πρωτεΐνες, ενώ το φυσιολογικό ποσό πρωτεϊνών είναι 0,2%. Και τα δύο αυτά μέλια παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλό ιξώδες, με αποτέλεσμα να μη δύναται να τρυγηθούν με το συνηθισμένο τρόπο και να απαιτείται ειδικός χειρισμός συγκομιδής.

Τα αμινοξέα του μελιού προέρχονται από τις μέλισσες και είναι κοινά σε όλα τα μέλια, ενώ άλλα βρίσκονται στα φυτά (White, 1975). Αυτό δίνει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί το σύνολο των αμινοξέων των μελιών με στόχο τη διαφοροποίηση τους όσον αφορά στη βοτανική, αλλά και στη γεωγραφική προέλευσή τους. Τα ελεύθερα αμινοξέα υπάρχουν στο μέλι σε μικρές ποσότητες (0,05-0,1%) και με μικρή θρεπτική συνεισφορά. Μερικά είναι η προλίνη, η λυσίνη, η βαλίνη, η αλανίνη, η φαινοαλανίνη, η τυροσίνη, η λευκίνη, η ισολευκίνη, το γλουταμινικό το ασπαραγινικό, κ.α.

Το σημαντικότερο από τα αμινοξέα είναι η προλίνη, η οποία βρίσκεται και σε μεγαλύτερη αφθονία. Η προλίνη κατέχει το 50-85% του συνόλου των αμινοξέων του

μελιού. Εκκρίνεται από τους υποφαρυγγικούς αδένες των μελισσών και έχει ως σκοπό τη ρύθμιση της προσθήκης ιμπερτάσης στο νέκταρ (Χαριζάνης, 1996).

Πίνακας 3: Τα σημαντικότερα αμινοξέα του μελιού (από Bosi & Battaglini, 1978).

AMINOΞΕΑ	ΜΕΛΙ ΑΠΟ ΝΕΚΤΑΡ (ppm)	ΜΕΛΙ ΑΠΟ ΜΕΛΙΤΩΜΑΤΑ (ppm)
Ελεύθερα αμινοξέα		
προλίνη	850	1057
φαινυλαλανίνη	559	110
ασπαρτικό οξύ+ασπαραγίνη	55	113
γλουταμινικό οξύ+γλυκίνη	49	195
Σύνολο	1746 (0,17 %)	1784 (0,18 %)
Πρωτεϊνικά αμινοξέα		
Ασπαρτικό οξύ	252	177
Γλουταμινικό οξύ	139	101
λευκίνη	115	79
φαινυλαλανίνη	86	69
βαλίνη	84	67
ισολευκίνη	80	62
Σύνολο	1204 (0,12 %)	858 (0,09 %)

Τα ελεύθερα αμινοξέα βρίσκονται σε μεγαλύτερες συνολικές συγκεντρώσεις στο μέλι απ' ό τι τα πρωτεϊνικά αμινοξέα. Όσον αφορά δε, την ποσότητα και την ποιότητα των αμινοξέων ανάλογα με την φυτική προέλευση των μελιών, τα μέλια ανθέων περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες σε πρωτεϊνικά αμινοξέα, έναντι των μελιών μελιτωμάτων, ενώ συμβαίνει το αντίθετο για τα ελεύθερα αμινοξέα, με εξαίρεση την φαινυλαλανίνη, που βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα ανθόμελα.

Από τα υπόλοιπα προϊόντα της κυψέλης, ο βασιλικός πολτός, ο γόνος και η γύρη περιέχουν σχετικά υψηλές ποσότητες αμινοξέων, το μέλι και το δηλητήριο μικρότερες, ενώ το κερύ καθόλου. [{6}](#), [{45}](#), [{21}](#)

1.5.4 Ένζυμα του μελιού

Τα κύρια ένζυμα που περιέχονται στο μέλι είναι, η ιμπερτάση, η γλυκοξειδάση και η διαστάση, που προέρχονται από τους υποφαρυγγικούς αδένες των μελισσών και η καταλάση και η οξική φωσφατάση που είναι φυτικής προέλευσης.

Πίνακας 4: Τα ένζυμα του μελιού από Crane 1990

Ένζυμα από τους υποφαρυγγικούς αδένες των μελισσών	
Ιμβερτάση	Διασπά τη σουκρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη, είναι πιο θερμοευαίσθητη από την αμυλάση
Γλυκοξειδάση	Οξειδώνει τη γλυκόζη σε γλουκονικό οξύ και υπεροξειδίο του υδρογόνου παρουσία νερού, πιο θερμοευαίσθητη από την ιμβερτάση
Διαστάση (Αμυλάση)	Διασπά το άμυλο, θερμοευαίσθητη, δεν έχει βρεθεί ο ρόλος της στην παραγωγή μελιού-πιθανόν να βοηθά στην πέψη της γύρης από τις μέλισσες
Ένζυμα από τα φυτά (νέκταρ-μελιτώματα)	
Καταλάση	Ρυθμίζει τη δράση της γλυκοξειδάσης με το να ελέγχει την ισορροπία του H ₂ O ₂
Οξική φωσφατάση	Υπάρχει στη γύρη, στο νέκταρ και το μέλι
Διαστάση (Αμυλάση)	Ένα μικρό ποσό αυτής προέρχεται από τα φυτά

Είναι από τα πιο ενδιαφέροντα και συνάμα τα πιο σημαντικά από τα συστατικά του μελιού, επειδή παίζουν ζωτικό ρόλο στην παραγωγή του ώριμου μελιού από το αρχικό ανώριμο υλικό, τον φυτικό χυμό. Κάθε ένα από αυτά λαμβάνει μέρος ως καταλύτης σε μία σειρά χημικών αντιδράσεων μεταξύ των συστατικών της τροφής της μέλισσας και των ουσιών που εκκρίνονται από αυτή και λαμβάνουν χώρα από την πρώτη στιγμή που η μέλισσα συλλέξει την τροφή της, μέχρι τη στιγμή που το ώριμο μέλι σφραγιστεί στις κερήθρες. Κάποιες χημικές αντιδράσεις δε, εξακολουθούν να πραγματοποιούνται και μετά την συλλογή του μελιού, κατά την αποθήκευσή του, επιδρώντας στις φυσικοχημικές ιδιότητές του.

Αναλυτικά, τα ένζυμα του μελιού δρουν ως εξής (Crane, 1990, Χαριζάνης, 1996):

i. Η **ιμβερτάση** (α -γλυκοσειδάση) υδρολύει τη σουκρόζη που υπάρχει στο νέκταρ και τα μελιτώματα, σε φρουκτόζη και γλυκόζη. Ορισμένη ποσότητα αυτής παραμένει στο μέλι, κάτι που σημαίνει ότι η διάσπαση συνεχίζεται τόσο μετά την εξαγωγή του μελιού όσο και κατά την αποθήκευση. Το 1986 αναφέρθηκε η ύπαρξη της β -γλυκοσειδάσης από τους Low και συνεργάτες, όμως δεν έχει διευκρινιστεί αν προέρχεται από τις μέλισσες ή τα φυτά.

ii. Η **γλυκοξειδάση** δρα μόνο σε διαλυμένο ή ανώριμο μέλι και είναι πιο δραστική όταν τα σάκχαρα είναι σε συγκέντρωση 25-30%. Αυτό το ένζυμο οδηγεί στην παραγωγή του γλουκονικού οξέος, που είναι το κυρίαρχο οξύ στο μέλι, και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂), ουσία για την οποία έχουμε ήδη αναφέρει τις αντιμικροβιακές της ιδιότητες. Το H₂O₂ διασπάται σε νερό και οξυγόνο. Η διάσπαση και επανασύνθεσή του λαμβάνουν χώρα καθ' όλη τη διάρκεια της μετατροπής του νέκταρος σε μέλι. Η συγκέντρωση του H₂O₂ παραμένει σταθερή υπό καθορισμένες συνθήκες, παρέχοντας έτσι προστασία στο μέλι από διάφορους μικροοργανισμούς. Για αυτό το λόγο, υδατικό διάλυμα μελιού μπορεί να επαλειφθεί σε ανοιχτές πληγές και να έχει θετική επίδραση. Η δράση της γλυκοξειδάσης μειώνεται καθώς αυξάνουν τα σάκχαρα κατά την ωρίμαση του μελιού, έως ότου σταματήσει με την ολοκλήρωση της ωρίμανσης.

iii. Η **διαστάση (αμυλάση)** διασπά το άμυλο. Δε φαίνεται να λαμβάνει μέρος σε χημικές διεργασίες κατά την παραγωγή του μελιού. Η σημασία της στις αναλύσεις μελιών έγκειται στο γεγονός ότι είναι πολύ θερμοευαίσθητη, οπότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης θερμικής επεξεργασίας του μελιού, κάτι που προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Gothe το 1914. Γενικά, όταν σε μία κυψέλη υπάρχει μεγάλη ροή νέκταρος ή μελιτωμάτων το μέλι περιέχει μικρότερες ποσότητες ενζύμων, καθώς οι μέλισσες έχουν λιγότερο χρόνο

για να το εμπλουτίσουν. Αντίστοιχα, νέκταρ με μεγάλη περιεκτικότητα σε σάκχαρα χρειάζεται λιγότερη επεξεργασία για να γίνει μέλι, οπότε περιέχει μικρότερες ποσότητες σε διασάση και ιμπερτάση.

iv. Η **καταλάση**, η οποία είναι φυτικής προέλευσης και βρίσκεται στο νέκταρ και τη γύρη, διασπά το H₂O₂. Μερικά μέλια δεν περιέχουν καταλάση, και ως εκ τούτου έχουν ισχυρές αντιμικροβιακές ιδιότητες. Παράδειγμα αποτελούν το μέλι από λευκό τριφύλλι (*Trifolium repens*) και το πευκόμελο (*Pinus sylvestris*).

v. Η **οξική φωσφατάση** είναι ένα ένζυμο που προέρχεται από το νέκταρ. Η δράση του στη διαδικασία παραγωγής του μελιού δεν είναι γνωστή, και μάλλον η παρουσία του στο μέλι θεωρείται τυχαία.

Τέλος, το μέλι από μελιτώματα συνεισφέρει σημαντικά σε ιμπερτάση, ενώ το νέκταρ παρέχει μικρές ποσότητες διασάσης. Τα ένζυμα είναι θερμοευαίσθητα, οπότε χαμηλό επίπεδο αυτών μπορεί να οφείλεται σε θερμική επεξεργασία. Πρέπει να πούμε ότι κάποια μέλια έχουν από φυσικού τους χαμηλό ενζυμικό δυναμικό, κάτι που πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη πριν εξαχθούν οποιαδήποτε συμπεράσματα για τυχόν θερμική επεξεργασία του μελιού. [\[6\]](#), [\[45\]](#), [\[21\]](#)

1.5.5 Νερό

Η φυσική υγρασία του μελιού αποτελεί το 'υπόλειμμα' του νερού που υπήρχε στο νέκταρ προ της έναρξης της διαδικασίας της ωρίμασης. Το ποσό αυτής είναι σημαντικός παράγοντας που καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ανθεκτικότητα του μελιού στις ζυμώσεις. Το μέλι περιέχει νερό σε ποσοστό 17% (κυμαίνεται από 13-25%). Οι μέλισσες, άλλωστε, σφραγίζουν το μέλι στις κηρήθρες όταν η υγρασία του φτάσει το 15-17%.

Υπάρχει ένα κατώτερο όριο περιεκτικότητας σε νερό ώστε να διατηρούνται τα σάκχαρα εν διαλύσει. Υπάρχει επίσης και ένα ανώτερο όριο, αυτό του 20%, το οποίο έχει θεσπιστεί με την με την οδηγία 2001/110/EK του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου, και αφορά στην προστασία του μελιού από τυχόν ζυμώσεις. Η περιεκτικότητα σε νερό μπορεί να αλλάξει με έκθεση του μελιού σε ξηρή ή υγρή ατμόσφαιρα κατά τη διαδικασία του τρυγητού. Η απορρόφηση υγρασίας από ένα υγρό περιβάλλον είναι ταχύτερη από ότι η απώλεια υγρασίας σε ένα ξηρό περιβάλλον. Ακόμα, η υγρασία αλλάζει κατά την αποθήκευση, ανάλογα με τις συνθήκες αυτής, λόγω της υγροσκοπικότητας του μελιού. Σε περιοχές με υψηλή ατμοσφαιρική υγρασία, οι μέλισσες δε μπορούν να μειώσουν την περιεκτικότητα σε νερό σε ασφαλή επίπεδα.

Η υγρασία (νερό) στο μέλι είναι καθοριστικός παράγοντας που επηρεάζει πολλά από τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του μελιού και παίζει σημαντικό ρόλο στις φυσικοχημικές του ιδιότητες και την «συμπεριφορά» του μελιού μετά την συγκομιδή και τη συσκευασία του. Ιδιότητες όπως το χρώμα, η κρυστάλλωση, η ζύμωση, το ιξώδες, εξαρτώνται άμεσα από το νερό που περιέχεται στο μέλι. [\[6\]](#), [\[21\]](#)

1.5.6 Μέταλλα και ιχνοστοιχεία, τέφρα του μελιού

Το μη πτητικό, ανόργανο υπόλειμμα του μελιού, έπειτα από καύση αυτού, καλείται τέφρα (ash) και αποτελείται από μέταλλα, μακροστοιχεία, ή ιχνοστοιχεία (Πίνακας 5). Η ολική τέφρα στο μέλι κυμαίνεται από 0,02-1%, συνήθως δε βρίσκεται μεταξύ 0,1% και 0,3%. Το στοιχείο που βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στο μέλι είναι το Κάλιο (K) και ακολουθεί το Θείο (S), το Χλώριο (Cl), το Ασβέστιο (Ca) και ο Φώσφορος (P). Τα υπόλοιπα ανόργανα συστατικά του μελιού βρίσκονται σε πολύ μικρότερες ποσότητες. Συγκριτικά,

συνήθως τα ανοιχτόχρωμα μέλια έχουν μικρότερη περιεκτικότητα σε ανόργανα συστατικά, από τα σκουρόχρωμα.

Πίνακας 5: Τα ανόργανα συστατικά του μελιού σε ppm (από Crane, 1990).

Μακροστοιχεία	Μ.ό. σε ανοιχτόχρωμα μέλια	Μ.ό. σε σκουρόχρωμα μέλια	Ιχνοστοιχεία	
Κάλιο	205	1676	Χρώμιο	Άργυρος
Χλώριο	52	113	Λίθιο	Βάριο
Θείο	58	100	Νικέλιο	Γάλλιο
Νάτριο	18	76	Μόλυβδος	Βισμούθιο
Ασβέστιο	49	51	Κασσίτερος	Χρυσός
Φωσφόρος	35	47	Ψευδάργυρος	Γερμάνιο
Μαγνήσιο	19	35	Όσμιο	Στρόντιο
Σίδηρος	2,4	9,4	Βηρύλλιο	
Μαγγάνιο	0,3	4,1	Βανάδιο	
Χαλκός	0,3	0,6	Ζιρκόνιο	
Πυρίτιο (σαν SiO ₂)	9	14		

Τα μέταλλα αρχικά βρίσκονται στο έδαφος, προσλαμβάνονται από τα φυτά και καταλήγουν στο μέλι μέσω του νέκταρος ή των μελιτωμάτων, που οι μέλισσες συλλέγουν από αυτό. Το ποσοστό των ανόργανων συστατικών που περιέχει ένα μέλι, μπορεί να επηρεάσει το χρώμα του μελιού, και εξαρτάται από τη βοτανική προέλευση του φυτού από το οποίο τράφηκαν οι μέλισσες.

Τα πολύ ανοιχτόχρωμα μέλια περιέχουν μικρές ποσότητες σε μέταλλα σε σχέση με τα σκουρόχρωμα, αν και αυτό δεν ισχύει πάντα, καθώς υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν το χρώμα και οι οποίοι είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Για παράδειγμα, χαμηλής περιεκτικότητας σε τέφρα είναι τόσο τα ανοιχτόχρωμα μέλια από ελαιοκράμβη και μηδική, όσο και τα μέσης σκουρότητας μέλια τριφυλλιού και δενδρολίβανου, αλλά και το σκούρο μέλι από *Fagopyrum esculentum*. Τα σκουρόχρωμα μέλια που έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε τέφρα περιλαμβάνουν το μέλι ερείκης και κυρίως μέλια από μελιτώματα. [\[6\]](#), [\[7\]](#)

1.6 Τα είδη του μελιού

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

- **Μέλια ανθέων:** Πορτοκαλιάς, θυμαριού, ευκαλύπτου, δενδρολίβανου, 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 από τα μελιτώματα των αντίστοιχων φυτών. Στην Κύπρο δεν παράγονται μέλια μελιτώματος.

Θεωρητικά, οι μέλισσες παράγουν τόσα μέλια όσα είναι και τα φυτά που δίνουν νέκταρ και μελίτωμα. Στην πράξη όμως, δεν έχουμε τόσα πολλά μέλια διότι οι ποσότητες που παράγονται δεν είναι μεγάλες. Κάθε περιοχή παράγει τα δικά της μέλια ανάλογα με την ανθοφορία της. Όταν στην περιοχή δεν υπάρχει μια επικρατούσα ανθοφορία, π.χ. πορτοκαλιάς ή θυμαριού, το μέλι που θα παραχθεί θα είναι μέλι ποικίλης ανθοφορίας. Αντίστοιχα, όταν υπάρχει μια επικρατούσα ανθοφορία, το μέλι θα πάρει τα χαρακτηριστικά της, δηλαδή τη γεύση, το άρωμα και το χρώμα και θα ονομαστεί ανάλογα, π.χ. μέλι θυμαριού ^[5]

1.6.1 Είδη και χαρακτηριστικά ελληνικών μελιών

➤ **Πευκόμελο**

Αποτελεί περίπου το 65% της συνολικής παραγωγής μελιού στην Ελλάδα και προέρχεται από τις μελιτώδεις εκκρίσεις του εντόμου *Marchalina hellenica* (γνωστό ως «Βαμβακάδα», «Εργάτης»), όταν παρασιτεί στη Χαλέπιο και Τραχεία πεύκη. Οι κυριότερες περιοχές παραγωγής πευκόμελου είναι η βόρεια Εύβοια, η Χαλκιδική, η Θάσος, η Σκόπελος, η Ζάκυνθος και η Ρόδος. Από τα μέσα Αυγούστου ξεκινούν σε μεγάλες ποσότητες οι μελιτοεκκρίσεις και διαρκούν έως την επόμενη άνοιξη. Ωστόσο οι περίοδοι των εκκρίσεων που αξιοποιούνται για την παραγωγή του πευκόμελου είναι από τον Αύγουστο μέχρι τον Οκτώβριο.

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

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

Χρώμα: Το χρώμα του πευκόμελου είναι χαρακτηριστικό και πιο σκούρο από το θυμαρίσιο. Εκείνο μάλιστα που παράγεται την άνοιξη είναι πιο ανοιχτόχρωμο και πιο διαυγές από εκείνο που παράγεται το φθινόπωρο.

Κρυστάλλωση: Η κρυστάλλωση του πευκόμελου γίνεται με αρκετά βραδύ ρυθμό, αφού η φυσική περιεκτικότητά του σε γλυκόζη είναι χαμηλή. Πιο συγκεκριμένα, τα αμιγή πευκόμελα παραμένουν ρευστά, δηλαδή χωρίς να κρυσταλλώσουν, για περισσότερο από ενάμιση χρόνο.

Θρεπτική αξία: Το πευκόμελο θεωρείται μέλι υψηλής θρεπτικής αξίας κάτι που είναι ενδεικτικό από το υψηλό ποσοστό τέφρας που διαθέτει. Αυτό οφείλεται κυρίως στο μεγάλο αριθμό διαφορετικών ουσιών που υπάρχουν στη σύστασή του. Από τις ουσίες αυτές επικρατούν τα μέταλλα και τα ιχνοστοιχεία (το ασβέστιο, το μαγνήσιο, ο ψευδάργυρος, ο σίδηρος, ο χαλκός κλπ.), τα οποία βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα ελληνικά πευκόμελα.

➤ **Ελατήσιο**

Υπολογίζεται ότι το 5% περίπου του μελιού που παράγεται στην Ελλάδα είναι ελατήσιο. Προέρχεται κυρίως από τις ορεινές περιοχές της Ευρυτανίας, της Πίνδου, του Ολύμπου, της Βοιωτίας από τα βουνά Μαίναλο, Πάρνωνα, Ελικώνα και Χελμό στην Πελοπόννησο και από την Πάρνηθα στην Αττική. Υπάρχουν έντομα που παρασιτούν στα έλατα και παράγουν μελιτώδεις εκκρίσεις όπως τα *Cinara confinis* και *Physokermes hemicryfus*.

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

Άρωμα: Δεν παρουσιάζει έντονο άρωμα.

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

Κρυστάλλωση: Λόγω του χαμηλού ποσοστού γλυκόζης, δεν κρυσταλλώνει.

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

➤ **Μέλι καστανιάς**

Η καστανιά είναι δέντρο διαδεδομένο σε ολόκληρη την ορεινή ζώνη της χώρας μας. Θεωρείται σπουδαίο μελισσοκομικό φυτό και αυτό αποδεικνύεται από την εξαιρετικής ποιότητας γύρη καθώς και από το υψηλής διατροφικής αξίας νέκταρ που παράγει. Παράλληλα η καστανιά δίνει και μελιτώδεις εκκρίσεις από την αφίδα *Myzocallis castanicola*, οι οποίες αρχίζουν το Μάιο και συνεχίζονται μέχρι τον Ιούλιο.

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

Άρωμα: Έντονα αρωματικό μέλι.

Χρώμα: Ποικίλλει ανάλογα με την προέλευσή του από ανοιχτό καφέ μέχρι σκούρο καφέ και συχνά κοκκινωπό, αν πρόκειται για μελίτωμα.

Κρυστάλλωση: Κρυσταλλώνει σε λεπτούς κόκκους και αργά μετά από 1-2 χρόνια.

Θρεπτική αξία: Πλούσιο σε ιχνοστοιχεία και αμινοξέα. Έχει εφιδρωτικές ιδιότητες και ενθαρρύνει την κυκλοφορία του αίματος. Διαθέτει στυπτικές και απολυμαντικές ιδιότητες των ουρικών οδών.

➤ **Μέλι εσπεριδοειδών**

Το μέλι των εσπεριδοειδών σε συνδυασμό με το μέλι των άλλων οπωροφόρων αποτελεί το 25% της ελληνικής περιοχής. Τα εσπεριδοειδή καλλιεργούνται κυρίως στην Ήπειρο, Πελοπόννησο, Κρήτη και σε διάφορα νησιά.

Γεύση: Εξαιρετικά ιδιαίτερη γεύση.

Άρωμα: Έντονο, υπέροχο άρωμα.

Χρώμα: Ανοιχτό κίτρινο.

Κρυστάλλωση: Κρυσταλλώνει πολύ γρήγορα, γι' αυτό καλό είναι να καταναλώνεται σε

σύντομο χρονικό διάστημα.

Θρεπτική αξία: Το μέλι των εσπεριδοειδών έχει την υψηλότερη περιεκτικότητα ψευδαργύρου συγκριτικά με τα υπόλοιπα μέλια. Για να διατηρηθεί η θρεπτική αξία αυτού του τύπου μελιού, θα πρέπει να καταναλώνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα και να προφυλάσσεται από υψηλές θερμοκρασίες.

➤ **Μέλι θυμαρίσιο**

Η παραγωγή του ανέρχεται περίπου στο 10% της συνολικής παραγωγής μελιού της Ελλάδος. Η άνθηση του θυμαριού διαρκεί 30 με 40 μέρες ανάλογα με τη διαμόρφωση του εδάφους και τις καιρικές συνθήκες. Οι καλύτερες περιοχές παραγωγής θυμαρίσιου μελιού θεωρούνται τα ελληνικά νησιά και ιδιαίτερα η Κρήτη τα Κύθηρα καθώς και τα Δωδεκάνησα.

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

Άρωμα: Έντονα αρωματικό μέλι.

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

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

Θρεπτική αξία: Το θυμαρίσιο μέλι θεωρείται ότι έχει τονωτικές και αντισηπτικές ιδιότητες καθώς επίσης συνιστάται για την πρόληψη - αντιμετώπιση λοιμωδών, πεπτικών και αναπνευστικών παθήσεων. Είναι πλούσιο σε μέταλλα όπως ο χαλκός και ο σίδηρος, ενώ περιέχει και βόριο.

➤ **Μέλι ερείκης**

Διακρίνεται στην ανοιξιάτικη και την φθινοπωρινή ερείκη (ή σούσουρα), είναι από τα πιο σημαντικά μελισσοκομικά φυτά της Ελλάδας. Η διαφορά ανάμεσα στα δύο είδη μελιού ερείκης έγκειται στη γεύση και το χρώμα .

Γεύση: Το ανοιξιάτικο μέλι ερείκης είναι πιο εύγευστο από αυτό της φθινοπωρινής αλλά συνολικά διακρίνεται για τη χαρακτηριστική δυνατή γεύση του.

Άρωμα: Χαρακτηριστικό, λεπτό άρωμα.

Χρώμα: Κοκκινωπό-σκουρόχρωμο της φθινοπωρινής και πιο ανοιχτόχρωμο της ανοιξιάτικης.

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

Θρεπτική αξία: Το ερεικόμελο (κυρίως το φθινοπωρινό) θεωρείται ένα πολύ θρεπτικό είδος μελιού και ιδιαίτερα τονωτικό για τον ανθρώπινο οργανισμό ,γιατί περιέχει δεκάδες φυσικά θρεπτικά στοιχεία ,βιταμίνες ,ένζυμα και αμινοξέα , γι' αυτό και πωλείται κυρίως σε καταστήματα υγιεινής διατροφής. ^[8]

1.7 Προϊόντα που παράγονται από τις μέλισσες πέραν του μελιού

1.7.1 Γύρη

Είναι το προϊόν που συγκεντρώνουν οι μέλισσες από διάφορα λουλούδια. Η γύρη αποτελείται κυρίως από πρωτεΐνες, λιπίδια, σάκχαρα, μεταλλικά άλατα, αμινοξέα, βιταμίνες και φαινολικές ενώσεις. Η γύρη είναι σημαντική ως διατροφικό συμπλήρωμα όταν έχει υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, απαραίτητων αμινοξέων, κορεσμένα και ακόρεστα λίπη, και ιχνοστοιχείων όπως Zn, Cu, Fe και υψηλή αναλογία K/Na.

Χρησιμοποιείται στη φαρμακοβιομηχανία, στη βιομηχανία καλλυντικών, στη διατροφή του ανθρώπου και των οικιακών ζώων, στην κατασκευή υποκατάστατων γύρης για τη διατροφή των μελισσών, σε διάφορες έρευνες για τις αλλεργίες, σε προγράμματα βελτίωσης φυτών και στην επικονίαση φρούτων και λαχανικών. [\[9\]](#)

1.7.2 Πρόπολη

Είναι κολλώδης ουσία, που παράγουν οι μέλισσες από την συλλογή ρητινωδών εκκρίσεων από τους φλοιούς φυτών, και την οποία εμπλουτίζουν με κερί, γύρη, ένζυμα και άλλες ουσίες. Η πρόπολη χρησιμοποιείται από τις μέλισσες για να στεγανοποιήσουν και να απολυμάνουν το εσωτερικό της κυψέλης.

Η χημική σύσταση της πρόπολης όπως και οι φυσικές της ιδιότητες εξαρτάται άμεσα από την χλωρίδα της κάθε περιοχής, καθώς διαφορετικά φυτά δίνουν και διαφορετικές δυνατότητες στις μέλισσες για συλλογή ρητινωδών εκκρίσεων. Η χημική της σύσταση είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη καθώς σε αυτήν έχουν ανιχνευθεί περισσότερες από 300 χημικές ενώσεις. Αποτελείται κυρίως από ρητίνη (50%), κερί (30%), αιθέρια έλαια (10%), γύρη (5%). Τα υπόλοιπα συστατικά της είναι αρωματικές ουσίες, ζάχαρα, βάλσαμα, τερπένια, αλειφατικά οξέα και οι εστέρες τους, φλαβόνες, ανόργανες ουσίες, βιταμίνες, ιχνοστοιχεία και άλλα γνωστά και άγνωστα συστατικά.

Οι θεραπευτικές ιδιότητες της πρόπολης ήταν γνωστές από την αρχαιότητα, κατά τη διάρκεια της οποίας αναφερόταν και ως «μαύρο κερί». Οι κυριότερες ερευνητικά τεκμηριωμένες ιδιότητες της πρόπολης είναι: αντιφλεγμονώδης δράση, αντιμυκητιακές ιδιότητες, αντιοξειδωτική δράση, ενίσχυση του ανοσοποιητικού, αντιισταμινική δράση.

Η πρόπολη μπορεί να φτάσει στο εμπόριο υπό την μορφή ακατέργαστης στερεής πρόπολης ή με την μορφή σκευασμάτων πρόπολης. Τέτοια είναι η σκόνη πρόπολης, πάστες, αλοιφές, γαλακτώματα πρόπολης, αλκοολικά ή γλυκολικά βάμματα και εκχυλίσματα πρόπολης, σιρόπια πρόπολης, αλοιφές πρόπολης, έλαια πρόπολης, χάπια και ταμπλέτες πρόπολης. Επίσης, σκευάσματα πρόπολης μπορούν να συνδυαστούν με άλλα προϊόντα της μέλισσας, όπως η γύρη και το μέλι, ή ακόμη και με άλλα βοτανικά σκευάσματα. [\[10\]](#)

1.7.3 Κερί

Είναι το προϊόν που παράγουν σε μικρά λέπια οι νεαρές εργάτριες από 4 ζεύγη κηρογόνων αδένων. Για την παραγωγή ενός κιλού κεριού οι μέλισσες καταναλώνουν 8 κιλά

μέλι. Το κερι είναι ένα μίγμα από 300 περίπου ουσίες (υδρογονάνθρακες, μονοϋδρικές αλκοόλες, λιπαρά οξέα, υδροξυοξέα, διόλες) που είναι απίθανο να συνθέσει ο άνθρωπος.

Το κερι αποτελεί μετά το μέλι, το δεύτερο οικονομικής σημασίας προϊόν για το μελισσοκόμο. Το προϊόν αυτό έχει ευρεία χρήση στη φαρμακοβιομηχανία στη βιομηχανία καλλυντικών και κεριών. Χρησιμοποιείται επίσης σε τοπικά αναισθητικά, σε αποσμητικά χώρου, σε οδοντόπαστες, σε αντιηλιακά λάδια, σε κρέμες ξυρίσματος, σε βερνίκια για δάπεδα, έπιπλα και αυτοκίνητα, σε μαστίχες, σε εντομοκτόνα και μπογιές ζωγραφικής και σε πολλά άλλα προϊόντα καθημερινής χρήσης. [\[11\]](#)

1.7.4 Βασιλικός πολτός

Ο βασιλικός πολτός είναι μια έκκριση των αδενών των εργατριών με τον οποίο τρέφουν τις νεαρές εργατονύμφες, τις βασιλονύμφες και τις βασίλισσες. Ο βασιλικός πολτός είναι η τροφή που κάνει τις βασίλισσες να διαφέρουν από τις μέλισσες.

Η χημική σύσταση του βασιλικού πολτού δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως, καθώς έχει αναλυθεί το 97% των συστατικών του, αλλά παραμένει άγνωστο το 3%. Ο βασιλικός πολτός περιέχει βιταμίνες, μεταλλικά στοιχεία, αμινοξέα, ένζυμα. Συγκεκριμένα, περιέχει νερό σε ποσοστό 67% , πρωτεΐνες και αμινοξέα σε ποσοστό 12,5% , 11% απλά σάκχαρα (μονοσακχαρίτες) και 5% λιπαρά οξέα. Επίσης περιέχει πολλά ιχνοστοιχεία, ένζυμα, αντιβακτηριακά και αντιβιοτικά στοιχεία και ίχνη βιταμίνης C. Δεν περιέχει καμιά από τις λιποδιαλυτές βιταμίνες A, D, E και K. Επίσης περιέχει και μία αναλογία ενεργών ουσιών, όπως η ακετυλοχολίνη που βρίσκεται σε ποσότητα πάνω από 1 mg/g και η οποία έχει αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες, χρήσιμες για τη θεραπεία κυκλοφορικών διαταραχών. Έχουν βρεθεί ίχνη τεστοστερόνης αλλά η ποσότητά τους είναι αμελητέα, σε σχέση με την ημερήσια παραγωγή τεστοστερόνης ενός άνδρα

Είναι διαδεδομένη η αντίληψη ότι έχει ευεργετική επίδραση στον άνθρωπο. [\[12\]](#)

1.8 Αντιοξειδωτική δράση του μελιού

Ως οξειδωτικές ουσίες χαρακτηρίζονται οι ισχυρά δραστικές ουσίες οι οποίες δέχονται ηλεκτρόνια σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και οδηγούν τελικά στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, δηλαδή ουσιών με ένα ελεύθερο μονήρες ηλεκτρόνιο. Μεταξύ των ουσιών αυτών κυρίαρχο ρόλο φαίνεται να έχουν οι ενεργές (δραστικές) μορφές (είδη) του οξυγόνου (ROS), όπως το μονήρες οξυγόνο, η σουπεροξειδική ανιονική ρίζα, το υπεροξείδιο υδρογόνου, η ρίζα υδροξυλίου, καθώς επίσης και το όζον και το νιτροξειδίο, που συμπεριφέρονται όπως οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί πλήρως η ύπαρξη τους στα βιολογικά συστήματα.

Η κατάσταση κατά την οποία οι χημικές αυτές μορφές απαντούν στο κύτταρο πέρα από μια ορισμένη συγκέντρωση αναφέρεται ως οξειδωτική καταπόνηση, γεγονός που σχετίζεται άμεσα με τις περισσότερες ασθένειες του ανθρώπου. Σε μοριακό επίπεδο η επιβλαβής τους δράση αποδίδεται στην ικανότητά τους να αντιδρούν με τις πρωτεΐνες οι οποίες καταβυθίζονται, με τα λιπίδια των μεμβρανών που μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες και με τελικό αποτέλεσμα την καταστροφή της μεμβράνης και με το DNA στο οποίο προκαλούν «πληγές».

Ο κάθε οργανισμός έχει αναπτύξει ένα ενδογενές σύστημα άμυνας κατά των ελευθέρων ριζών, που συνίστανται από ένζυμα, ουσίες που συμπλοκοποιούν τα μέταλλα

(κυρίως το σίδηρο) και από ουσίες που δεσμεύουν ή εκμηδενίζουν τη δράση τους. Γενικότερα οι ουσίες αυτές αναφέρονται ως αντιοξειδωτικές ουσίες. Ως αντιοξειδωτική ουσία ορίζεται κάθε ουσία η οποία ενώ βρίσκεται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις σε σχέση με μια ουσία που μπορεί να οξειδωθεί, επιβραδύνει ή και μηδενίζει τη δυνατότητα οξείδωσης αυτής της ουσίας. Τελικώς με την δράση τους αυτή περιορίζουν τη συσσώρευση των οξειδωτικών ουσιών, ή γενικότερα των ελευθέρων ριζών.

Έρευνες έχουν δείξει ότι το μέλι έχει αντιοξειδωτική δράση. Η αντιοξειδωτική δράση του μελιού συμβάλλει στην πρόσληψη αρκετών οξειών και χρόνιων παθήσεων όπως ο διαβήτης, οι φλεγμονώδεις διαταραχές, καρδιαγγειακές παθήσεις, ο καρκίνος. Τα φαινορικά οξέα και φλαβονοειδή είναι σε σημαντικό βαθμό υπεύθυνα για την αντιοξειδωτική δράση του μελιού. Καθημερινή κατανάλωση του μελιού μπορεί σε ποσότητα 1.2 g/kg βάρους σώματος έχει δείχθει να ανυψώνει τα επίπεδα και τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών παραγόντων όπως τη βήτα-καροτίνη, τη βιταμίνη C, την αναγωγή της γλουταθειόνης, και του ουρικού οξέος. [\[13\]](#), [\[14\]](#), [\[15\]](#), [\[16\]](#), [\[17\]](#)

Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί ότι πρόσφατες έρευνες του τμήματος βιοχημείας και βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που πραγματοποιήθηκαν έχοντας ως υπεύθυνο καθηγητή τον κ. Δημήτριο Κουρέτα ανέδειξαν πως μέλια από τις γύρω περιοχές του Ολύμπου είχαν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες (βλ. Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης δειγμάτων μελιού της περιοχής Ολύμπου, Νικόλαος Δ. Σουλτσιώτης, 2014)

1.9 Αντιμικροβιακή δράση του μελιού

Το μέλι έχει σημαντική αντιμικροβιακή δράση. Η ιδιότητά του αυτή έχει καταγραφεί σε αρκετές επιστημονικές μελέτες και αποδίδεται στην υψηλή ωσμωτικότητα, το χαμηλό pH, την περιεκτικότητά του σε υπεροξειδίο του υδρογόνου καθώς και σε μη υπεροξειδικά συστατικά, δηλαδή την παρουσία συστατικών όπως η μεθυλογλυοξάλη (MGO).

Ο κύριος αντιμικροβιακός παράγοντας στο μέλι είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου, του οποίου η συγκέντρωση καθορίζεται από τα σχετικά επίπεδα της γλυκοξειδάσης, (που συντίθεται από τη μέλισσα) και της καταλάσης (που προέρχεται από τη γύρη των λουλουδιών). Οι περισσότεροι τύποι μελιού παράγουν H₂O₂ όταν αραιωθούν, λόγω της ενεργοποίησης του ενζύμου γλυκοξειδάσης που οξειδώνει τη γλυκόζη προς το γλυκονικό οξύ και H₂O₂, γεγονός που αποδίδει την αντιμικροβιακή του δράση. Σε ορισμένες, όμως, περιπτώσεις, η δραστηριότητα του υπεροξειδίου του υδρογόνου στο μέλι μπορεί εύκολα να καταστραφεί από τη θερμότητα ή την παρουσία καταλάσης.

Εκτός από το H₂O₂, το οποίο παράγεται στα περισσότερα συμβατικά μέλια από το ενδογενές ένζυμο γλυκοξειδάση, διαπιστώθηκε ότι αρκετοί άλλοι μη υπεροξειδικοί παράγοντες ευθύνονται για τη μοναδική αντιβακτηριακή δράση του μελιού. Το μέλι μπορεί να διατηρήσει την αντιμικροβιακή του δράση ακόμη και μόνο με την παρουσία καταλάσης (απουσία γλυκοξειδάσης) και έτσι αυτό το είδος μελιού θεωρείται ως «μέλι χωρίς υπεροξειδίο». Πολλά συστατικά είναι γνωστό ότι συμβάλλουν στη μη υπεροξειδική δραστηριότητα, όπως κυρίως η παρουσία της μεθυλογλυοξάλης, τα οποία έχουν μελετηθεί εκτενώς στο μέλι manuka που προέρχεται από το δέντρο manuka (*L. scoparium*). Σε αντίθεση με το μέλι manuka, η δραστηριότητα του μελιού ulmo οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην παραγωγή H₂O₂: το διάλυμα μελιού ulmo 25% (ο / ο) δεν είχε ανιχνεύσιμη αντιβακτηριακή δράση όταν δοκιμάστηκε παρουσία καταλάσης, ενώ στην ίδια συγκέντρωση το μέλι manuka διατήρησε αντιβακτηριακή δράση παρουσία καταλάσης (απουσία H₂O₂).

Το μέλι έχει χαρακτηριστικό όξινο pH μεταξύ 3,2 και 4,5, το οποίο είναι αρκετά χαμηλό ώστε να είναι ανασταλτικό για την ανάπτυξη πολλών βακτηριακών παθογόνων. Οι ελάχιστες τιμές pH για την ανάπτυξη ορισμένων κοινών παθογόνων βακτηρίων είναι: *E. coli* (4.3), *Salmonella spp.* (4.0), *P. aeruginosa* (4.4), *S. pyogenes* (4.5), και έτσι στο μη αραιωμένο μέλι η οξύτητα είναι ένας σημαντικός αντιβακτηριακός παράγοντας.

Η αντιβακτηριακή δραστηριότητα του μελιού προέρχεται επίσης από την οσμωτική επίδραση της υψηλής περιεκτικότητας του σε σάκχαρα και της χαμηλής περιεκτικότητας του σε υγρασία, μαζί βέβαια με τις όξινες ιδιότητες του γλυκονικού οξέος και τις αντισηπτικές ιδιότητες του H₂O₂. Μια πρόσφατη μελέτη που εξέτασε τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του μελιού in vitro διαπίστωσε ότι τα H₂O₂, το MGO και ένα αντιμικροβιακό πεπτίδιο, το bee defensin-1, είναι ξεχωριστοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη βακτηριοκτόνο δράση του μελιού. [\[18\]](#)

Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί ότι πρόσφατες έρευνες του τμήματος βιοχημείας και βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που πραγματοποιήθηκαν έχοντας ως υπεύθυνο καθηγητή τον κ. Δημήτριο Μόσιαλο ανέδειξαν πως μέλια από διάφορες περιοχές της Ελλάδας είχαν ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση έναντι των παθογόνων βακτηρίων *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa* (βλ Αντιμικροβιακή δράση ελληνικών τύπων μελιού έναντι βακτηρίων κλινικής σημασίας, Οικονόμου Κωνσταντίνα, 2013 - Αντιμικροβιακή δράση ελληνικών τύπων μελιού έναντι βακτηρίων κλινικής σημασίας, Ανθιμίδου Ελένη, 2011 – Αναστολή της παραγωγής μολυσματικών παραγόντων της *Pseudomonas aeruginosa* παρουσία μελιών Ολύμπου, Τζήκα Παρασκευή, 2015 – Ανίχνευση αντιβακτηριακών ουσιών σε μέλια του Ολύμπου, Δάμτσιας Θεοφάνης, 2016 – Αναστολή της παραγωγής μολυσματικών παραγόντων της *Pseudomonas aeruginosa* παρουσία μελιών Ολύμπου, Αδαμοπούλου Άννα, 2018)

1.9.1 Μέλι-πρότυπο με αντιμικροβιακές ιδιότητες: Manuka honey

Το μέλι Manuka προέρχεται από το φυτό *Leptospermum scoparium*, ένα γηγενές φυτό της νότιας Ζηλανδίας και νοτιοανατολικής Αυστραλίας. Είναι θάμνος ή μικρό δέντρο ιδιαίτερα γνωστό στη φυλή Maori, οι οποίοι το χρησιμοποιούσαν για αιώνες στην παραδοσιακή ιατρική τους. Το χρησιμοποιούσαν επίσης για τις θεραπευτικές, αντιβιοτικές και αντιβακτηριδιακές του ιδιότητες. Το φυτό αυτό βρίσκεται σήμερα σε ολόκληρη τη Ν. Ζηλανδία αλλά είναι ιδιαίτερα κοινό στις ξηρότερες ανατολικές ακτές του Βορείου και του Νοτίου νησιού, στην Αυστραλία, στην Τασμανία, στην Βικτώρια και στη Νέα Νότια Ουαλία. Η μοντέρνα ιατρική ανέπτυξε μια μέθοδο για να μετράει την αντισηπτική ισχύ αυτού του μοναδικού στον κόσμο μελιού, το Unique Manuka Factor (UMF). Η μονάδα μέτρησης UMF κατηγοριοποιεί το μέλι με βάση την αντιβακτηριδιακή του δύναμη. Κάθε παρτίδα ελέγχεται συστηματικά από εγκεκριμένο εργαστήριο και ταξινομείται κατά αύξουσα σειρά αποδοτικότητας σε κλίμακα από το 0 μέχρι το 25. Όσο πιο υψηλότερο το επίπεδο, τόσο πιο αποδοτική είναι η αντισηπτική δράση του Manuka honey. Η UMF, η μοναδική αξιόπιστη μονάδα μέτρησης αποδοτικότητας του μελιού Manuka, έχει προκύψει από τη σύγκριση της αντισηπτικής του ιδιότητας με αυτή του διαλύματος καρβοξυλικού οξέος, το οποίο είναι ένα πανίσχυρο αντισηπτικό μόριο που χρησιμοποιείται ευρέως στη μοντέρνα ιατρική. Το 2008, αναγνωρίστηκε η δραστική ουσία του Manuka honey, η μεθυλογλυοξάλη (MGO), η οποία ανιχνεύεται σε υψηλά επίπεδα. [\[19\]](#)

1.10 Μικροοργανισμοί του μελιού

Παρότι το μέλι έχει αντιμικροβιακή δράση, μερικοί μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν σε αυτό, κάποιοι από αυτούς σε ληθαργική κατάσταση.

Στο μέλι απαντώνται κυρίως οσμοφιλικές ζύμες, ανθεκτικές στις υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων. Οι περισσότερες από αυτές ανήκουν στα γένη *Nηματοσπόρα*, *Σακχαρομύκητες*, *Ζυγοσακχαρομύκητες*, *Σχίζοσακχαρομύκητες* και *Τορούλα*. Μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα, ειδικά σε περιπτώσεις που οι συνθήκες ευνοούν τον πολλαπλασιασμό τους, οπότε προκαλούν ζυμώσεις.

Οι μικροοργανισμοί του μελιού μπορεί να προέρχονται από το νέκταρ και τη γύρη. Οι ζύμες βρίσκονται στο νέκταρ, είτε ως συστατικά του χυμού του φυτού, είτε ως αποτέλεσμα επιμόλυνσης από σπόρια που μεταφέρονται σ' αυτό μέσω του αέρα. Άλλη πηγή μικροοργανισμών για το μέλι είναι η ίδια η μέλισσα, που καθώς συλλέγει, μεταφέρει και επεξεργάζεται το νέκταρ, το επιβαρύνει με μύκητες που είτε βρίσκονται στο σώμα της, είτε βρίσκονται στην κυψέλη στα λουλούδια και στον περιβάλλοντα χώρο της. Οι συσκευές και τα σκεύη που χρησιμοποιεί ο μελισσοκόμος για την συλλογή, επεξεργασία και διατήρηση του μελιού, συμβάλλουν σημαντικά στην επιμόλυνση του μελιού με ζυμομύκητες όπως και άλλες τυχαίες πηγές, όπως τη σκόνη και ο αέρας. Όλες αυτές οι πηγές είναι δύσκολο να ελεγχθούν.

Εκτός αυτών υπάρχουν και οι μετασυλλεκτικές πηγές, οι οποίες μπορεί να ευθύνονται για μόλυνση από μικρόβια και οι οποίες δύναται να ελεγχθούν. Αυτές περιλαμβάνουν τον αέρα, την ανάμειξη υγιών με μολυσμένα δείγματα (διασταυρωτή μόλυνση), τον εξοπλισμό και τις κτιριακές εγκαταστάσεις, πηγές που δύναται να ελεγχθούν με σωστή πρακτική και χρήση της θερμότητας για αποστείρωση.

Η γνώση της υγρασίας και της θερμοκρασίας που ευνοούν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών χρησιμοποιείται για να κρατηθεί ο πληθυσμός αυτών σε χαμηλά επίπεδα. Οι μικροοργανισμοί που ενδιαφέρουν τους μετασυλλεκτικούς χειρισμούς του μελιού είναι αυτοί που βρίσκονται συνήθως στο μέλι (ζύμες και σπορογόνα βακτήρια), αυτοί που καθορίζουν την υγιεινή ή την εμπορική ποιότητα του μελιού (ζύμες και κολοβακτηρίδια) και αυτοί που υπό συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να προκαλέσουν ασθένεια στον άνθρωπο. Η ποσότητα αυτών στο μέλι μπορεί να ποικίλει από μηδέν έως δεκάδες χιλιάδες άτομα ανά γραμμάριο μελιού. Τα περισσότερα δείγματα περιέχουν ανιχνεύσιμο αριθμό ατόμων. Παρότι σε μερικά μέλια ο αριθμός των ζυμών είναι χαμηλός, αυτός μπορεί να αυξηθεί ραγδαία εάν το ευνοήσουν οι συνθήκες.

Ένας μικροβιολογικός έλεγχος ρουτίνας στο μέλι μπορεί να περιλαμβάνει πολλές δοκιμές. Ο αριθμός των ατόμων των μικροοργανισμών δίνει γενικές πληροφορίες. Χρησιμοποιείται για να γίνει σύγκριση με άλλα δεδομένα και σαν γενικός δείκτης της μικροβιακής ποιότητας του μελιού. Απαιτούνται όμως επιπρόσθετες μετρήσεις γιατί μπορεί ένα μέλι, με υψηλό αριθμό ατόμων (10000 /gr), να έχει αποδεκτό αριθμό άλλων μικροβίων, οπότε να είναι αποδεκτής ποιότητας. Ειδικές δοκιμές για τη μέτρηση των ατόμων των ζυμών και των σπορογόνων βακτηρίων είναι επίσης ωφέλιμες. Τα άτομα αυτά βρίσκονται υπό κανονικές συνθήκες στο μέλι, ενώ η συγκέντρωσή τους ελέγχεται με κατάλληλη βιομηχανική πρακτική. Μια μέτρηση του αριθμού των ζυμών μπορεί να δείξει την ποιότητα του μελιού, αλλά και να προβλέψει τη διάρκεια ζωής του. Από τα σπορογόνα βακτήρια, είδη του γένους *Bacillus* βρίσκονται συνήθως σε συγκέντρωση 200 CFU (colony

forming units)/gr, ενώ συχνά υπάρχει και το *Clostridium botulinum* σε συγκέντρωση 1 CFU/gr.

Ο προσδιορισμός των κολοβακτηριδίων μπορεί να αποτελέσει έναν δείκτη της υγιεινής του μελιού. Συχνά μπορεί να απαιτούνται επιπρόσθετες δοκιμές για να εξηγήσουν ασυνήθεις υψηλούς πληθυσμούς μικροοργανισμών. Τέλος, η χρήση του μελιού σε προϊόντα στα οποία γίνεται μικρή ή καμία θερμική μεταχείριση χρειάζεται επιπρόσθετες δοκιμές. [\[20\]](#), [\[21\]](#)

1.11 Σκοπός της εργασίας

Όπως προαναφέρθηκε, παρότι το μέλι έχει αντιμικροβιακή δράση, κάποιοι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν σε αυτό. Σκοπός της εργασίας αποτέλεσε η εύρεση βακτηριακών στελεχών σε δείγματα μελιών που προέρχονταν από περιοχές του Ολύμπου με αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι ενός Gram⁺ βακτηρίου (*Staphylococcus aureus*) και ενός Gram⁻ βακτηρίου (*Pseudomonas aeruginosa*). Τα βακτήρια αυτά εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά μεθικιλίνη και καρβαπενέμες αντίστοιχα. Η ταυτοποίηση των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα μέλια αυτά, βασίστηκε στο 16S rRNA γονίδιο.

1.11.1 Τα βακτήρια στόχοι: *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa*



Εικόνα 3: Αποικίες της *P. aeruginosa* (στα δεξιά) και του *S. aureus* (στα αριστερά) ύστερα από καλλιέργεια σε Trypticase soy agar.

- *Staphylococcus aureus* (χρυσίζων σταφυλόκοκκος)

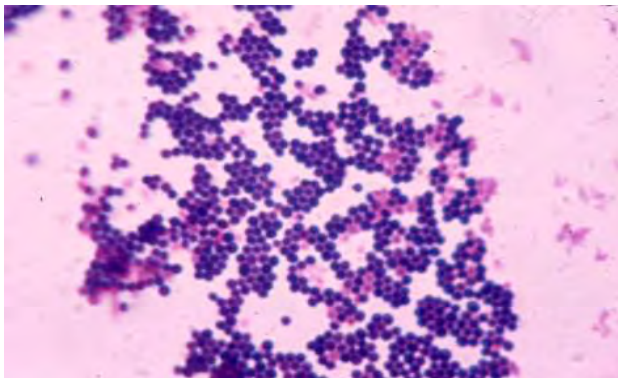
Ο *Staphylococcus aureus* είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο Gram-θετικό, στρογγυλού σχήματος βακτήριο που είναι μέλος των Firmicutes. Η χαρακτηριστική εμφάνιση των αποικιών του στο μικροσκόπιο (μοιάζουν με τσαμπιά σταφυλιών) του δίνει και το όνομά του.

Είναι μέλος της φυσιολογικής χλωρίδας του σώματος και συχνά βρίσκεται στη μύτη, στην αναπνευστική οδό και στο δέρμα. Παρόλο που ο *S. aureus* δεν είναι πάντοτε παθογόνος, αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά αίτια, δερματικών λοιμώξεων συμπεριλαμβανομένων των αποστημάτων, αναπνευστικών λοιμώξεων όπως η ιγμορίτιδα και της τροφικής δηλητηρίασης. Τα παθογόνα στελέχη συχνά προκαλούν μολύνσεις προάγοντας λοιμογόνους παράγοντες όπως ισχυρές πρωτεΐνες τοξίνες καθώς και την

έκφραση μίας πρωτεΐνης που δεσμεύεται στην κυτταρική επιφάνεια και η οποία έχει την ικανότητα να δεσμεύει και να απενεργοποιεί τα αντισώματα. Η εμφάνιση ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών του *S. aureus*, όπως ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA), αποτελεί παγκόσμιο πρόβλημα στην κλινική ιατρική. Παρά την μεγάλη έρευνα και ανάπτυξη, δεν έχει εγκριθεί κανένα εμβόλιο για το *S. aureus*.

Ο σταφυλόκοκκος εντοπίστηκε για πρώτη φορά το 1880 στο Aberdeen της Σκωτίας από τον χειρουργό Sir Alexander Ogston στο πύον από ένα χειρουργικό απόστημα σε άρθρωση του γόνατος. Το όνομα αυτό μετατράπηκε αργότερα σε *Staphylococcus aureus* από τον Friedrich Julius Rosenbach, ο οποίος πιστώθηκε από το επίσημο σύστημα ονοματολογίας εκείνης της εποχής. Εκτιμάται ότι το 20% έως 30% του ανθρώπινου πληθυσμού είναι μακροχρόνιοι φορείς του *S. aureus* που μπορεί να βρεθεί ως τμήμα της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος, στα ρουθούνια ενώ αποτελεί και «κανονικό κάτοικο» της χαμηλότερης αναπαραγωγικής οδού των γυναικών.

Ο *S. aureus* μπορεί να προκαλέσει μια σειρά μεγάλου εύρους ασθενειών, από απλές μολύνσεις του δέρματος (όπως εξανθήματα, εκζέματα προσώπου, πυώδη εξανθήματα, κυτταρίτιδα, θυλακίτιδα), μέχρι και σε ασθένειες απειλητικές για τη ζωή, (όπως η πνευμονία, η μηνιγγίτιδα, η οστεομυελίτιδα, η ενδοκαρδίτιδα, η βακτηριαμία και η σηψαιμία). Είναι μία από τις πέντε πιο συχνές αιτίες νοσοκομειακών λοιμώξεων και αποτελεί μία από τις πιο συχνές αιτίες επιμόλυνσης τραυμάτων μετά από χειρουργική επέμβαση. [\[22\]](#), [\[23\]](#), [\[24\]](#)



Εικόνα 4: Ο *Staphylococcus aureus* στο μικροσκόπιο (x1000) ύστερα από χρώση κατά gram (φωτογραφία από Umair Ahmad)

-*Pseudomonas aeruginosa* (Ψευδομονάδα η αεριογόνος)

Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένα Gram-αρνητικό βακτήριο, ραβδοειδούς σχήματος που μπορεί να προκαλέσει ασθένειες σε φυτά και ζώα, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων. Αποτελεί είδος ιδιαίτερης ιατρικής σημασίας, μιας και η *P. aeruginosa* είναι ένα ανθεκτικό σε πολλαπλά φάρμακα παθογόνο που αναγνωρίζεται για την πανταχού παρουσία του, τους εγγενώς προηγμένους μηχανισμούς αντίστασης σε αντιβιοτικά και τη σύνδεσή του με σοβαρές ασθένειες - νοσοκομειακές λοιμώξεις όπως η πνευμονία καθώς και διάφορα σύνδρομα σήψης.

Ο οργανισμός θεωρείται ευκαιριακός δεδομένου ότι συχνά εμφανίζεται σοβαρή λοίμωξη κατά τη διάρκεια υφιστάμενων ασθενειών ή καταστάσεων - κυρίως κυστικής ίνωσης και σοβαρών εγκαυμάτων. Η θεραπεία των μολύνσεων από *P. aeruginosa* μπορεί να είναι δύσκολη λόγω της φυσικής αντοχής της στα αντιβιοτικά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη χρήση πιο εξελιγμένων αντιβιοτικών φαρμάκων που μπορεί όμως να επιφέρουν ανεπιθύμητες παρενέργειες.

Βρίσκεται στο έδαφος, το νερό, τη χλωρίδα του δέρματος και στα περισσότερα ανθρώπινα περιβάλλοντα σε όλο τον κόσμο. Ευδοκμεί όχι μόνο σε κανονικές ατμόσφαιρες, αλλά και σε ατμόσφαιρες χαμηλού οξυγόνου, επομένως έχει αποικίσει πολλά φυσικά και τεχνητά περιβάλλοντα.

Χρησιμοποιεί ένα ευρύ φάσμα οργανικών ενώσεων για να αναπτυχθεί. Στα ζώα, η ευελιξία της, της επιτρέπει να μολύνει κατεστραμμένους ιστούς ή ιστούς με μειωμένη ανοσία. Τα συμπτώματα τέτοιων λοιμώξεων είναι γενικευμένη φλεγμονή και σηψαιμία. Εάν καταφέρει και δημιουργήσει αποικίες σε κρίσιμα όργανα του σώματος, όπως οι πνεύμονες, η ουροφόρος οδός και τα νεφρά, τα αποτελέσματα μπορεί να είναι θανατηφόρα.

Επειδή ευδοκμεί σε υγρές επιφάνειες, αυτό το βακτήριο μπορεί να βρεθεί επίσης και στον ιατρικό εξοπλισμό, συμπεριλαμβανομένων των καθετήρων, προκαλώντας διασταυρούμενες λοιμώξεις στα νοσοκομεία και τις κλινικές. Είναι επίσης σε θέση να αποσυνθέτει τους υδρογονάνθρακες και έχει χρησιμοποιηθεί για να διασπάσει πετρέλαιο από πετρελαιοκηλίδες.

Η *P. aeruginosa* δεν είναι εξαιρετικά μολυσματική σε σύγκριση με άλλα μείζονα παθογόνα βακτήρια - για παράδειγμα το *Staphylococcus aureus* και το *Streptococcus pyogenes* - αλλά η *P. aeruginosa* είναι ικανή για εκτεταμένο αποικισμό και μπορεί να συσσωματωθεί σε biofilm. [\[25\]](#), [\[26\]](#), [\[27\]](#)



Εικόνα 5: Η *P. aeruginosa* σε ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης. (Φωτογραφία από Centers for Disease Control and Prevention (CDC))

2. Πειραματικό τμήμα

2.1 Δείγματα μελιών

Η μελέτη αφορά 16 δείγματα μελιού τα οποία πάρθηκαν από περιοχές που βρίσκονται κοντά στον Όλυμπο. Η παραγωγή των μελιών έγινε κατά το έτος 2012-2013. Η προμήθεια των μελιών έγινε απευθείας από τους παραγωγούς.

Πρόκειται για 16 μέλια τα οποία προέρχονται κατά κύριο λόγο από τρύγο ανθέων αλλά και κάποιων μελιτωμάτων. Μέσα σε αυτά συμπεριλαμβάνονται μέλια από τρύγο

αγριοστάφυλλο, τριφυλλιού, βελανιδιάς, γκορτσιάς, κοντορίγανης, αγριοτριαντάφυλλο, ακακίας, θρωμίτη, μέντας.

Τα δείγματα των μελιών αριθμήθηκαν με τυχαία σειρά από το 1 έως το 16. Πιο αναλυτικά πληροφορίες σχετικά με τα δείγματα μελιών φαίνονται πιο κάτω:

Μέλι 1: Σαμαράς Γ., Τρύγος Ιουλίου, Καρυά Ολύμπου

Μέλι 2: Γκρέκα Ιωάννα, Τρύγος από αγριοσταφύλλι και πολλά μικρά ετήσια λουλούδια, Ελασσόνα Ολύμπου

Μέλι 3: Σδάνης Νικόλαος, Μέλι ανθέων, Συμέα Ελασσόνας

Μέλι 4: Καρματσώλης Χαράλαμπος, τρύγος από τρυφιλιά, γκορτσιά, κοντορίγανη, λαδανιά, δρυς- μελισσώματα

Μέλι 5: Τσιμπλικάρης Κωνσταντίνος, τρύγος Ιουλίου, Δομένικο

Μέλι 6: Γιώρι Σολκόβσκι, Τρύγος Ιουλίου, Σκαμνιά

Μέλι 7: Χατζή Μαρία, Σαραντάπορο

Μέλι 8: Καράλης Νικόλαος, Τρύγος Ιουνίου-Ιουλίου από αγριοτριαντάφυλλο, ακακία, θρωμίτη, μέντα, βελανιδιά, μελούρα, Κρανιά Ελασσόνας

Μέλι 9: Νταλείτη Χρυσούλα- Μπουρονίκος Δημήτριος, Άζωρο Ελασσόνας

Μέλι 10: Σβαρνάς Αθανάσιος, Μέλι ανθέων

Μέλι 11: Πουρσανίδης- Κουρδή Ουρανία, Καλλιθέα Ελασσόνας

Μέλι 12: Σαμαράς Γεώργιος, Ιούνιος 2012, Καρυά Ολύμπου

Μέλι 13: Βλάχου Αλεξάνδρα

Μέλι 14: Ευάγγελος Αθ. Ζάγκας

Μέλι 15: Γεώργιος Χρ. Σαμαράς

Μέλι 16: Νικολούλη Κατερίνα

2.2 Επίστρωση τριβλίων με χρήση θρεπτικών υποστρωμάτων Plate Count Agar (PCA) και *Bacillus cereus* medium με σκοπό την απομόνωση βακτηρίων από τα δείγματα μελιού

2.2.1 Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν

-*Bacillus cereus* medium

Χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά από το Mossel και τους συνεργάτες του το 1967 για την καταμέτρηση αποικιών *Bacillus cereus* σε τρόφιμα. Η συγκεκριμένη φόρμουλα αποδείχτηκε να είναι η πιο αποτελεσματική για αυτό το σκοπό από τον Inal το 1972.

Δύο αντιδράσεις που συμβαίνουν σε αυτό το μέσο διαχωρίζουν τα *Bacillus cereus* από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας *Bacillus*: η ζύμωση της μαννιτόλης και η παραγωγή λεκιθινάσης. Η ζύμωση της μαννιτόλης σε αυτό το θρεπτικό μέσο παράγει ένα ροζ-

υπόλευκο χρώμα με το οποίο χρωματίζονται οι αποικίες. Η παρουσία λεκιθινάσης από τα *Bacillus cereus* υποδεικνύεται από ένα λευκό ίζημα γύρω από τις αποικίες που έχουν αναπτυχθεί στο τρυβλίο. Τέλος, προστίθεται πολυμυξίνη (Polymyxin B) για να καταστείλει τυχόν κολοβακτηρίδια, αλλά και μερικά *Proteus spp* και Gram+ που μπορούν να αυξηθούν μέσω αυτής.

Για την παρασκευή 100mL θρεπτικού μέσου, ζυγίστηκαν 5,6g *Bacillus cereus* medium και σε αυτά προστέθηκαν 90mL απιονισμένο νερό. Έπειτα, αφού έγινε καλή ανάδευση για κάποια λεπτά, πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στους 120 °C για 23 λεπτά. Μετά την αποστείρωση παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να φτάσει περίπου τους 47 °C. Στη συνέχεια, υπό ασηπτικές συνθήκες, προστέθηκαν 10 ml από το X037 egg yolk emulsion (κρόκος αυγού) και 1 vial από το αντιβιοτικό Polymyxin B (πολυμυξίνη). Έγινε καλή ανακίνηση του θρεπτικού και μοιράστηκε σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri. [\[28\]](#), [\[29\]](#)

-Plate Count Agar (PCA)

Πρόκειται για ένα θρεπτικό μέσο που υποστηρίζει την ανάπτυξη ευρέως φάσματος βακτηρίων. Το PCA δεν είναι ένα επιλεκτικό μέσο. Η σύσταση του μπορεί να διαφέρει αλλά ένα τυπικό PCA περιλαμβάνει (w/v): 0.5% πεπτόνη, 0,1% γλυκόζη, 0.25% εκχύλισμα ζύμης, 1,5% άγαρ.

Για την παρασκευή 100mL θρεπτικού μέσου ζυγίστηκαν 2.35g PCA και προστέθηκαν 100mL απιονισμένου νερού. Έπειτα αφού έγινε καλή ανάδευση το θρεπτικό υλικό αποστειρώθηκε στους 120°C για 23 λεπτά και στη συνέχεια μοιράστηκε σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri. [\[30\]](#)

-PBS

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

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

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

Η προετοιμασία του έγινε ως εξής: σε 1 λίτρο απιονισμένο νερό, προστέθηκε μια ταμπλέτα PBS. Έπειτα, τοποθετήθηκε το μπουκάλι στον αναδευτήρα (μαζί με ένα μαγνητάκι) και παρέμεινε μέχρι να ομογενοποιηθεί τελείως η ταμπλέτα. Εφόσον η ταμπλέτα έλιωσε, χωρίστηκε το μίγμα σε μικρότερα μπουκαλάκια και αποστειρώθηκαν στους 120 °C για 23 λεπτά. Τέλος, τοποθετήθηκαν τα μπουκάλια σε θερμοκρασία δωματίου. [\[31\]](#)

2.2.2 Πειραματική διαδικασία

Επίστρωση των τριβλίων

Για κάθε ένα από τα δείγματα μελιού ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- Σε falcon τοποθετήθηκαν 2.5ml δείγματος μελιού και 2.5 ml PBS.
- Πραγματοποιήθηκε ανάδευση σε vortex έως ότου επέλθει η ομογενοποίηση
- Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 4.000 rpm για 45 λεπτά
- Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και κρατήσαμε περίπου 2ml ιζήματος (Αξίζει να σημειωθεί πως σε κανένα από τα δείγματα το ίζημα δεν ήταν ορατό με το μάτι, κάτι που προφανώς οφείλεται σε χαμηλή βακτηριακή πυκνότητα). Το ίζημα ξαναομογενοποιήθηκε με ανάδευση σε vortex.
- Για την καλλιέργεια σε PCA 450μl από το ίζημα επιστρώθηκαν σε 3 τριβλία PCA (150μl στο καθένα)
- Για την καλλιέργεια σε Bacillus cereus medium, τα falcons που περιείχαν το ίζημα τοποθετήθηκαν για 10 λεπτά σε 80 °C υδατόλουτρο με σκοπό την εξόντωση των βλαστικών μορφών. Στη συνέχεια επιστρώθηκαν με παρόμοιο τρόπο όπως και τα PCA. Τα τριβλία τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα στους 30 °C για 24 με 48 ώρες. (Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με το χρόνο επώασης βλ. παράρτημα τέλος εργασίας)

2.3 Απομόνωση βακτηριακών αποικιών από τα τριβλία και ανακαλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό μέσο.

2.3.1 Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν

-Nutrient Broth

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

Για την παρασκευή του 100ml θρεπτικού μέσου ζυγίστηκαν 1.3g Nutrient broth και σε αυτό προστέθηκαν 100ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε ανάδευση και στη συνέχεια το θρεπτικό μέσο μοιράστηκε σε vials. Το κάθε vial περιείχε περίπου 3ml Nutrient broth, και κατά συνέπεια 100ml θρεπτικού μέσου αντιστοιχούσαν περίπου σε 30 vials.

Στη συνέχεια τα vials αποστειρώθηκαν στους 120 °C για 23 λεπτά και αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο στους 4 °C. [\[32\]](#)

2.3.2 Πειραματική διαδικασία

Για κάθε ένα από τα τριβλία που προέκυψαν επιλέχθηκε ένας αριθμός αποικιών με σκοπό να απομονωθούν και να επανακαλλιεργηθούν στις υγρές καλλιέργειες. Η επιλογή έγινε βάσει παραγόντων όπως σχήμα, χρώμα, μέγεθος κ.ο.κ έτσι ώστε να απομονωθούν διαφορετικά βακτηριακά είδη και όχι τα ίδια.

Η διαδικασία έγινε ως εξής:

- Με τη βοήθεια αποστειρωμένων οδοντογλυφίδων, “ξύσαμε” τις επιλεγμένες αποικίες
- Τοποθετήσαμε τις οδοντογλυφίδες εντός των vials που περιείχαν το Nutrient broth
- Ονομάτησαμε τα vials ώστε να γνωρίζουμε από ποιο μέλι και θρεπτικό μέσο προέρχεται η

κάθε αποικία

- Τοποθετήσαμε τα vials σε αναδύομενο επωαστήρα και τα αφήσαμε να επωαστούν για περίπου 24h στους 30 °C.

2.4 Ανακαλλιέργεια των βακτηριακών αποικιών σε στερεό υπόστρωμα Nutrient agar

2.4.1 Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν

-Nutrient agar

Είναι ένα θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται για στερεό θρεπτικό υπόστρωμα σε τριβλία και για καλλιέργεια μη απαιτητικών σε διατροφικά στοιχεία οργανισμών.

Για την παρασκευή του 100ml θρεπτικού μέσου ζυγίστηκαν 2.15 Nutrient agar και σε αυτό προστέθηκαν 100ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε ανάδευση και αποστείρωση στους 120 °C για 23 λεπτά. Έπειτα το θρεπτικό μέσο μοιράστηκε σε τριβλία petri. [\[33\]](#)

2.4.2 Πειραματική διαδικασία

Σε κάθε τριβλίο Nutrient agar τοποθετήθηκαν 2.5ml από 5 διαφορετικές υγρές καλλιέργειες των vials σε αρκετή απόσταση μεταξύ τους ώστε να μπορούμε να διακρίνουμε τις αποικίες που θα αναπτυχθούν. Ταυτόχρονα στο πίσω μέρος του τριβλίου σημειώθηκε από ποιο vial προερχόταν η κάθε αποικία.

Να σημειωθεί ότι κάθε υγρή καλλιέργεια ανακαλλιεργήθηκε σε 2 διαφορετικά Nutrient agar plates με σκοπό στη συνέχεια να γίνει screening για αντιμικροβιακή δράση τόσο ενάντια στον *S. aureus* όσο και για την *P. aeruginosa*.

Στη συνέχεια τα τριβλία τοποθετήθηκαν για επώαση στους 30 °C για 24 ώρες.

2.5 Screening των αποικιών για αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε *S. aureus* και *P. Aeruginosa*

2.5.1 Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν

-Soft agar

Το συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο αποτελεί ένα μίγμα μεταξύ Nutrient Broth και Nutrient Agar. Η σύσταση του μέσου σε Nutrient Agar είναι 0,75%. Για την παρασκευή 100 ml αυτού του διαλύματος, ζυγίστηκαν 1,3 gr Nutrient Broth και 0,75 gr Nutrient Agar. Μετά από καλή ανάδευση λίγων λεπτών, πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στους 120 °C για 23 λεπτά

-Nutrient Broth

Για πληροφορίες βλ. 2.3.1 σελ 36

2.5.2 Πειραματική διαδικασία

- Πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια των μικροοργανισμών *S. aureus* και *P. aeruginosa* σε 2 διαφορετικά vials που περιείχαν 5ml nutrient broth. Οι μικροοργανισμοί πάρθηκαν από το απόθεμα του εργαστηρίου ενώ ήταν αποθηκευμένοι σε stock γλυκερόλης στους -80 °C. Παρασκευάστηκε διάλυμα Nutrient broth 10 ml και μοιράστηκε σε 2 vials, 5 ml διαλύματος σε κάθε vial. Τα vials τοποθετήθηκαν στην αποστείρωση στους 120 °C για 23 λεπτά. Με τη βοήθεια του μικροβιολογικού κρίκου και πάντα υπό ασηπτικές συνθήκες, τοποθετήθηκε μικρή ποσότητα αυτών των μικροοργανισμών σε κάθε vial (οι μικροοργανισμοί ήταν αποθηκευμένοι σε stock γλυκερόλης στους -80 °C). Οι υγρές καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37 °C για 16-18 ώρες και στη συνέχεια, διατηρήθηκαν στο ψυγείο στους 4 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

-Παρασκευάστηκαν 100 ml soft agar. Το διάλυμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να φτάσει τους 47 °C περίπου και έπειτα, τοποθετήθηκε μέσα σ' αυτό, με τη βοήθεια πιπέτας, 1 ml του μικροοργανισμού-στόχου. Στη συνέχεια έγινε καλή ανάδευση ώστε τα κύτταρα του οργανισμού να επεκταθούν σε όλη τη μάζα του διαλύματος. Πριν προλάβει το διάλυμα soft agar να σταθεροποιηθεί, απλώθηκε προσεκτικά πάνω από τα τριβλία Nutrient Agar που περιείχαν τις ανεπτυγμένες αποικίες, έτσι ώστε να τις «σκεπάζει» όλες. Στη συνέχεια τα τριβλία τοποθετήθηκαν για επώαση στους 37 °C για 16-18 ώρες.

-Αφού η επώαση ολοκληρώθηκε ελέγξαμε τα τριβλία μας για το σχηματισμό ή όχι αντιμικροβιακών ζωνών γύρω από τις αποικίες.

-Η διαδικασία επαναλήφθηκε έτσι ώστε κάθε απομονωμένη αποικία να ελεγχθεί για αντιμικροβιακή δράση τόσο ενάντι στον *S. aureus* όσο και ενάντια στην *P. aeruginosa*.

-Στις αποικίες οι οποίες έδειξαν αντιμικροβιακή δράση έγινε επανάληψη της διαδικασίας, 3 φορές, έτσι ώστε να επαληθευτούν τα αποτελέσματα

2.6 Αποθήκευση σε stock γλυκερόλης στους -80°C των βακτηριακών αποικιών που έδειξαν αντιμικροβιακή δράση

2.6.1 Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν

-Γλυκερόλη

Η προπανοτριόλη ή γλυκερόλη (glycerol) είναι μια χημική οργανική ένωση της οικογένειας των αλκοολών η οποία υπάρχει σε όλα τα φυσικά λιπίδια ζωικής ή φυτικής προέλευσης. Είναι μια ημίρρευστη, κολλώδης, άχρωμη, διαλυτή ουσία, με γλυκιά γεύση. Παράγεται από φυσικές πηγές, μέσω της υδρόλυσης των λιπών και της ζύμωσης των σακχάρων ή παρασκευάζεται συνθετικά (παράγωγο πετρελαίου).

Λόγω των αντιψηκτικών ιδιοτήτων της, η γλυκερόλη είναι το πιο διαδεδομένο μέσο αποθήκευση μικροοργανισμών σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η γλυκερόλη διαλύεται στο νερό και μειώνει τις φθορές που προκαλούν στους μικροοργανισμούς οι παγοκρύσταλοι. [\[34\]](#), [\[35\]](#)

-Nutrient broth

Για πληροφορίες βλ. 2.3.1 σελ 36

2.6.2 Πειραματική διαδικασία

Από τη στιγμή που εντοπίστηκαν και επαληθεύτηκαν οι αποικίες με αντιμικροβιακή δράση, ξεκίνησε η διαδικασία αποθήκευσής τους σε stock γλυκερόλης. Η διαδικασία έγινε ως εξής:

-Ανακαλλιέργεια των βακτηρίων που έδωσαν θετικά αποτελέσματα. Παρασκευάστηκαν 10 ml θρεπτικού μέσου Nutrient broth και μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένο vial. Στη συνέχεια εμβαιπήσαμε μία αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα στο vial με την προ-υπάρχουσα υγρή καλλιέργεια του μικροοργανισμού στόχου και έπειτα μεταφέραμε την οδοντογλυφίδα στο νέο vial. Στη συνέχεια το vial αφέθηκε σε αναδύομενο επωαστήρα στους 30°C για 24 ώρες. Αυτό έγινε με σκοπό την ανανέωση και αύξηση του βακτηριακού μας πληθυσμού.

- Έπειτα, σε 2 αποστειρωμένα erpendorf μεταφέρθηκε η ποσότητα του 1 ml υγρής καλλιέργειας (από το vial) στο καθένα και έγινε φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 3 λεπτά.

-Απορρίφθηκε το υπερκείμενο από τα 2 erpendorfs και σε αυτά προστέθηκε 1ml διαλύματος φρέσκου Nutrient broth με 25% τελική συγκέντρωση γλυκερόλης.

-Ακολούθησε καλή ανάδευση στο vortex και έπειτα αφήσαμε τα erpendorfs 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

-Τέλος τα 2 erpendorfs κλείστηκαν μέσα σε ένα άδειο falcon και μεταφέρθηκαν στο ψυγείο στους -80°C όπου και παρέμειναν.

2.7 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA των βακτηρίων

Πραγματοποιήθηκε η απομόνωση επαρκούς ποσότητας βακτηριακού DNA, με τη χρήση του Purelink Genomic DNA Mini Kit της Invitrogen ακολουθώντας το αντίστοιχο πρωτόκολλο για gram θετικά βακτήρια. [\[36\]](#)

2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

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

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

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

αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί, με άλλα λόγια καθορίζουν τα άκρα του θραύσματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί.

Με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση του γενετικού τόπου 16S rRNA. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ο συγκεκριμένος γενετικός τόπος επιλέχθηκε, γιατί είναι ο πιο συντηρημένος μεταξύ των βακτηριακών στελεχών, άρα και ο πιο εξειδικευμένος για την ταυτοποίηση βακτηρίων. Τα δείγματα ενισχύθηκαν με τη χρήση δυο εκκινητών, ενός αριστερού (forward primer), τον 27Fa και ενός δεξιού (reverse primer), τον 1492R. Το προϊόν της ενίσχυσης είναι περίπου 1500bp. [\[37\]](#), [\[38\]](#)

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR.

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

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25 μl, όπου περιέχονταν 1 μl DNA στόχου, 250 μM dNTPs, 0,5 μM από τον κάθε εκκινητή, 1 unit Taq DNA πολυμεράσης, 2 mM MgCl₂ και 5 μl 1× PCR buffer όπως προβλέπεται από τον κατασκευαστή.

Αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων.

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση (stock)	Τελική συγκέντρωση
Buffer	5×	1×
DNTPs	25 mM	250 μM
27Fa	26,9 μM	0,5 μM
1492R	32,6 μM	0,5 μM
MgCl₂	25 mM	2 mM
Taq	5 u/ml	1 unit

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

Σύσταση του master mix ανά αντίδραση.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
Buffer	5 μ l
DNTPs	0,25 μ l
27Fa	0,46 μ l
1492R	0,38 μ l
MgCl₂	2 μ l
Taq	0,2 μ l
DNA	1 μ l
ddH₂O	15,71 μ l
Τελικός όγκος	25 μ l

Προκειμένου να καθοριστούν η βέλτιστη συγκέντρωση του DNA και ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης, πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι με χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων του DNA-στόχου, εφαρμόζοντας διαδοχικά αυξανόμενο αριθμό κύκλων PCR. Η κάθε αντίδραση τελικά επαναλήφθηκε για 30 κύκλους και η ποσότητα DNA που χρησιμοποιήθηκε κυρίως ήταν αυτή στα 1 μ l.

Η διαφορά που προκαλούσε η μεταβολή της ποσότητας του DNA-στόχου στον τελικό όγκο του master mix, καλυπτόταν με την προσθήκη ή αφαίρεση συγκεκριμένης ποσότητας απιονισμένου νερού. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμοκυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler.

Επίσης, ετοιμάστηκαν και δύο επιπλέον δείγματα, που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικό (P) και αρνητικό (N) control αντίστοιχα. Το θετικό control που χρησιμοποιήθηκε ήταν το χρωμοσωμικό DNA της *Pseudomonas entomophila* και το αρνητικό control το dH₂O (ίδια ποσότητα με τα δείγματα του DNA-στόχου του δείγματος). Η εμφάνιση ή όχι του θετικού control θα προσδιορίσει κατά πόσο τεχνικά λειτουργεί η PCR, ενώ η εμφάνιση του αρνητικού control θα σημαίνει κάποια επιμόλυνση. Άρα, το ιδανικό αποτέλεσμα θα είναι η εμφάνιση του P και όχι του N.

Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια:

- Αποδιάταξη του DNA (denaturation)
- Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing)
- Επιμήκυνση των εκκινητών (extension)

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

Καθώς η διαδικασία επαναλαμβάνεται, οι νεοσύστατοι κλώνοι με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για την *in vitro* σύνθεση του DNA. Μετά από μερικούς κύκλους το επικρατές προϊόν είναι ένα DNA θραύσμα, το μέγεθος του οποίου αντιστοιχεί

στην μεταξύ των δυο αρχικών εκκινητών απόσταση. Στην πράξη, 20-30 κύκλοι της αντίδρασης είναι αρκετοί για την αποτελεσματική ενίσχυση του DNA θραύσματος. Σε κάθε κύκλο που διαρκεί περίπου 5 λεπτά, η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται. Η όλη διαδικασία κλωνοποίησης ενός DNA θραύσματος σε ένα *in vitro* σύστημα (χωρίς κύτταρα) διαρκεί μερικές ώρες, σε σχέση με τις μερικές μέρες που απαιτούνται για τις *in vivo* διαδικασίες κλωνοποίησης (Richlik et al, 1990).

Ο γενετικός τόπος 16S rRNA ενισχύθηκε στις παρακάτω συνθήκες:

- Αρχική αποδιάταξη του DNA: 94 °C για 5 min
 - Αποδιάταξη του DNA: 94 °C για 1 min
 - Προσαρμογή εκκινητών στο DNA: 57 °C για 30 sec
 - Επιμήκυνση εκκινητών: 72 °C για 90 sec
 - Τελική επιμήκυνση: 72 °C για 10 min
- Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε στους 30 κύκλους.

2.9 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι η ηλεκτροχημική μέθοδος διαχωρισμού ηλεκτρικά φορτισμένων σωματιδίων (συνήθως πρωτεϊνικής ή νουκλεϊκής φύσεως), από ένα μίγμα τους.

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

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθός τους. [\[39\]](#)

Η προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης έγινε με την εξής διαδικασία:

-Ζυγίστηκαν 0,8 gr αγαρόζης και προστέθηκαν σε φλάσκα με 100 ml διαλύματος Tris-Boric-EDTA (TBE) 1× (τελική συγκέντρωση 0,8% w/v). Το αρχικό διάλυμα TBE 10× είχε προηγουμένως αραιωθεί (10 ml TBE και 90 ml H₂O)

-Το διάλυμα αναδεύτηκε και θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων για 2 λεπτά μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη

-Προστέθηκαν 10 μl βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium Bromide Solution, 10 mg/ml) και έγινε ανάδευση. Αυτό έγινε για να είναι εμφανείς οι ζώνες του DNA κατά την παρατήρηση της πηκτής στη λάμπα του υπεριώδους φωτός

-Το διάλυμα προστέθηκε στο ειδικό καλούπι όπου και παρέμεινε μέχρι να σταθεροποιηθεί. Τέλος, η πηκτή αγαρόζης τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη Loading buffer. Πήραμε 6 μl από κάθε PCR προϊόν και προστέθηκαν 2 μl Loading buffer. Ακολούθησε ανάδευση με τη βοήθεια μιας πιπέτας. Η ίδια διαδικασία έγινε και για το Positive control

και για το Negative control. Μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκε και ένας μάρτυρας, ο Ladder, ποσότητας 3 μl, ο οποίος και τοποθετήθηκε στο πρώτο πηγαδάκι της συσκευής.

Αναμειγνύουμε το δείγμα του DNA με 6x Loading buffer. Αυτό επιτρέπει να βλέπουμε πού πάει το DNA που φορτώνουμε και στη συνέχεια πόσο πολύ έχει τρέξει η ηλεκτροφόρηση. Επίσης, επειδή είναι ιξώδες (γλυκερόλη ή άλλα ιξώδη διαλύματα), οδηγούν το DNA στον πάτο του πηγαδιού. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 110 volts και ακολούθησε παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους φωτός.

2.10 Καθαρισμός προϊόντων PCR

Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολούθησε ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR, προκειμένου να σταλθούν για αλληλούχιση. Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν από τους εκκινητές, τα νουκλεοτίδια, την πολυμεράση και τα άλατα, με τη χρήση PCR clean-up gel extraction, το Nucleospin Extract II της εταιρίας Macherey-Nagel (Germany). ^[40]

2.11 Αλληλούχιση του 16s RNA τμήματος και ανάλυση των

αποτελεσμάτων με σκοπό την ταυτοποίηση των βακτηρίων

Τα αποτελέσματα της PCR, στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρεία Selidis (CeMIA Λάρισα), με σκοπό το προσδιορισμό της αλληλουχίας του 16s RNA και άρα κατά συνέπεια την ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών που μας έδειξαν ζώνες αναστολής.

Μετά την αλληλούχιση ακολούθησε σύγκριση των ακολουθιών με αυτές της βάσης δεδομένων χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο BLAST στην ιστοσελίδα <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Ο αλγόριθμος BLAST επιτρέπει στον ερευνητή να συγκρίνει μία ζητούμενη αλληλουχία με τις ακολουθίες που υπάρχουν στη βάση δεδομένων ώστε να βρεθούν οι ακολουθίες με τη μεγαλύτερη ομολογία. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να επιτευχθεί η ταυτοποίηση του βακτηρίου σε γένος και είδος με την προϋπόθεση βέβαια ότι υπάρχει κάποια αντίστοιχη αλληλουχία στη βάση δεδομένων. ^[41]

3.Αποτελέσματα

3.1 Καταμέτρηση των βακτηριακών αποικιών που απομονώθηκαν

Από τις συνολικές αποικίες που εμφανίστηκαν στα τριβλία έγινε επιλογή κάποιων εξ' αυτών βάσει παραγόντων όπως σχήμα, χρώμα, μέγεθος κ.ο.κ έτσι ώστε να γίνει προσπάθεια να απομονωθούν διαφορετικά βακτηριακά είδη και όχι τα ίδια.

Στο παρακάτω πίνακα φαίνεται πιο αναλυτικά ο αριθμός των αποικιών που απομονώθηκαν από κάθε δείγμα μελιού, καθώς και το θρεπτικό μέσο από το οποίο απομονώθηκαν.

Αριθμός μελιού	PCA	Bacillus cereus medium	Σύνολο αποικιών
1	9	3	12
2	14	11	25
3	18	7	25
4	13	6	19
5	9	10	19
6	11	10	21
7	16	9	25
8	16	9	25
9	15	15	30
10	15	15	30
11	15	15	30
12	20	10	30
13	14	10	24
14	13	12	25
15	17	10	27
16	12	5	17
Σύνολο	227	157	384

3.2 Αποτελέσματα αναστολής σε *S. aureus* και *P. aeruginosa*

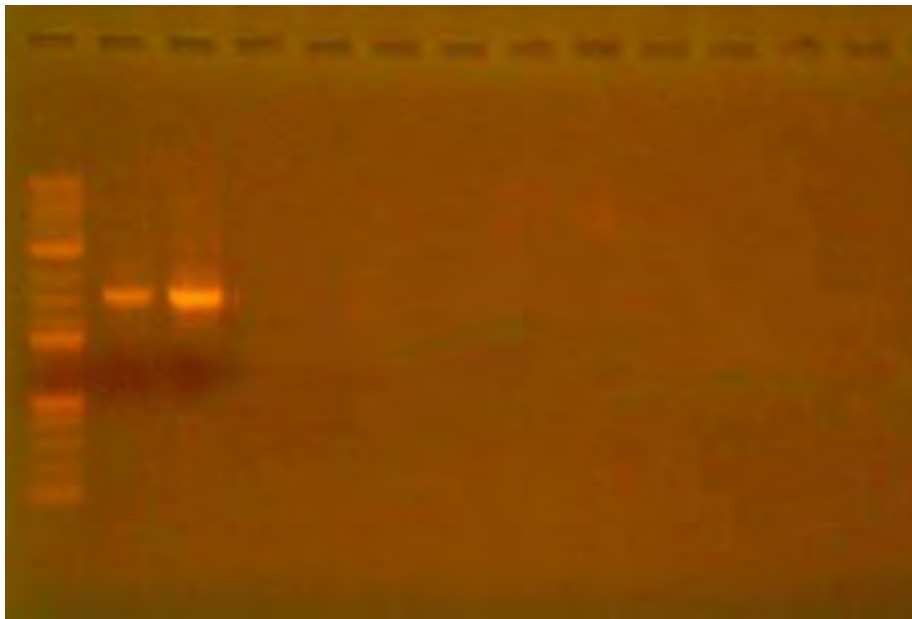
Αυτές οι 384 αποικίες ελέγχθηκαν όλες ως προς την ικανότητα αναστολής τους στην ανάπτυξη των βακτηρίων *S. aureus* και *P. aeruginosa*. Από αυτές μόνο μία φάνηκε να δίνει θετικά αποτελέσματα και να αναστέλλει τον *S. aureus*. Η αποικία αυτή προερχόταν από το δείγμα μελιού 15 και είχε προκύψει έπειτα από καλλιέργεια σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό PCA.

Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε με επανάληψη του ελέγχου. Με τη βοήθεια ενός χάρακα μετρήθηκε η διάμετρος αναστολής η οποία ήταν περίπου 1.7cm.

3.3 Μοριακή ταυτοποίηση του απομονωμένου βακτηριακού στελέχους

Η ταυτοποίηση των βακτηριακού στελέχους που απομονώθηκε βασίστηκε στην ενίσχυση του γενετικού τόπου 16S rRNA με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και στην αλληλούχιση αυτού για τον ακριβή προσδιορισμό της ταυτότητάς του.

Στην εικόνα 3 φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης που πραγματοποιήθηκε σε πήκτη αγαρόζης προκειμένου να διαπιστώσουμε αν λειτούργησε η PCR.



Εικόνα 6: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτη αγαρόζης των προϊόντων της PCR ύστερα από ενίσχυση τους 16S rRNA γονιδίου. Στη στήλη 1 βλέπουμε το ladder (μάρτυρας μοριακού βάρους), στη στήλη 2 ηλεκτροφόρηση 1μL προϊόντος PCR και στη στήλη 3 ηλεκτροφόρηση 2 μL προϊόντος PCR.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης ήταν τα εξής (1414 χαρακτήρες):

```
GCGGGGTTGTGTAGAAGCTTGCTTCTAAACAACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCC
CACAAGACAGGGATAACTACCGGAAACGGTAGCTAATACCCGATACATCCTTTTCTGCATGGGAGAAGGAG
GAAAGACGGAGCAATCTGTCACTTGTGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTAC
CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATG
AAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGTCTTGTAGAGTAACTGCTACAAGAGTGACGG
TACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCG
GAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTCTTTAAGTCTGGTGTTAATCCCAGGCTCAACTTCGGGT
CGCACTGGAAACTGGGGAGCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGA
TACCCTTGGTGCCGAAGTAAACACATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAG
GAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGG
TCTTGACATCCCTCTGACCGGTCTAGAGATAGACCTTTCCTTCGGGACAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTG
TCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATGCTTAGTTGCCAGCAG
GTCAAGCTGGGCACTCTAAGCAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCA
TGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTAACAATGGCCGGTACAACGGGAAGCGAAATCGCGAGGTGGAG
CCAATCCTAGAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATTGCTAGT
AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTT
```

TACAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCCGCAAGGGAGCCAGCCGC

Ύστερα από nucleotide blast στο NCBI φάνηκαν τα εξής αποτελέσματα:

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Paenibacillus sp. strain RS13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2606	2606	100%	0.0	99%	MH58361.1
Paenibacillus peoriae strain GQJK57 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2606	2606	100%	0.0	99%	KY952711.1
Paenibacillus polymyxa strain JK1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2606	2606	100%	0.0	99%	KU563771.1
Paenibacillus polymyxa strain TS683 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2604	2604	99%	0.0	100%	KU860093.1
Paenibacillus sp. LXfos16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2603	2603	99%	0.0	99%	KC581713.1
Paenibacillus sp. Sx52 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2603	2603	100%	0.0	99%	GU328691.1
Paenibacillus sp. strain BJ-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2601	2601	100%	0.0	99%	MF967288.1

Κατά συνέπεια το ζητούμενο βακτήριο ανήκει στο γένος *Paenibacillus* και σύμφωνα με τα αποτελέσματα του blast ανήκει ή στο είδος *P. polymyxa*, ή στο είδος *P. peoriae* ή πρόκειται για το στέλεχος *Paenibacillus sp. strain RS13*.

3.4 Το γένος *Paenibacillus*

Τα *Paenibacillus* είναι ένα γένος προαιρετικά αναερόβιων βακτηρίων που έχουν την ικανότητα δημιουργίας ενδοσπορίων. Τα βακτήρια που ανήκουν σε αυτό το γένος έχουν ανιχνευθεί σε μία πληθώρα φυσικών περιβαλλόντων όπως το χώμα, το νερό, η ριζόσφαιρα, στην επιφάνεια λαχανικών, σε προνύμφες εντόμων καθώς και σε κλινικά δείγματα. Η πλειοψηφία αυτών των βακτηρίων αναπτύσσεται στο χώμα και τις περισσότερες φορές συμβιώνουν στις ρίζες των φυτών.

Το όνομα προέρχεται από τη λατινική λέξη *raeni* που σημαίνει σχεδόν. Στην πράξη λοιπόν πρόκειται για ένα γένος βακτηρίων που είναι «σχεδόν» βάκιλοι (παλαιότερα μάλιστα τα κατέτασσαν σε αυτούς).

Πολλά είδη *Paenibacillus* μπορούν να προωθήσουν την ανάπτυξη των καλλιεργειών απευθείας μέσω της αζωτοδέσμευσης, της διαλυτοποίησης φωσφορικών αλάτων, της παραγωγής του ινδολο-3-οξικού οξέος (Αυξίνη, IAA) και της απελευθέρωσης σιδηροφόρων πρωτεϊνών που επιτρέπουν την απόκτηση σιδήρου.

Μπορούν επίσης να προσφέρουν προστασία έναντι φυτοφάγων εντόμων και φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των μυκήτων, των νηματωδών και των ιών. Αυτό επιτυγχάνεται με την παραγωγή μιας ποικιλίας αντιμικροβιακών και εντομοκτόνων ουσιών και με την ενεργοποίηση της ISR (επαγόμενη συστηματική αντίσταση).

Οι αντιμικροβιακές ουσίες που προέρχονται από το γένος *Paenibacillus* έχουν επίσης εφαρμογές στην ιατρική, συμπεριλαμβανομένων των πολυμυξινών και των φουσαριδινών, τα οποία είναι μη ριβωσικά λιποπεπτίδια που απομονώθηκαν πρώτη φορά από τα στελέχη του *Paenibacillus polymyxa*. Άλλα χρήσιμα μόρια περιλαμβάνουν εξω-πολυσακχαρίτες (EPS) και ένζυμα όπως αμυλάσες, κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, λιπάσες, πηκτινάσες, οξυγενάσες, αφυδρογονάσες, ένζυμα τροποποίησης λιγνίνης και *mutanases* που μπορεί να έχουν εφαρμογές για απορρυπαντικά, τρόφιμα και ζωοτροφές, στα βιοκαύσιμα και την υγειονομική περίθαλψη.

Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι ένας «συγγενής» του βακτηρίου μας το *Paenibacillus larvae* είναι υπεύθυνος για μία από τις πιο καταστροφικές ασθένειες στο τομέα της μελισσοκομίας γνωστής και ως American foulbrood. Η ασθένεια δρα ως εξής: Οι προνύμφες των μελισσών ηλικίας μέχρι 3 ημερών μολύνονται με τη λήψη σπορίων του βακτηρίου που υπάρχουν στη τροφή τους. Τα σπόρια βλασταίνουν στο έντερο της προνύμφης και η βλαστική μορφή των βακτηρίων αρχίζει να αναπτύσσεται, παίρνοντας την τροφή τους από την προνύμφη. Τα σπόρια δεν θα βλαστήσουν σε προνύμφες ηλικίας άνω των 3 ημερών. Έτσι λοιπόν οι μολυσμένες προνύμφες πεθαίνουν μετά τη σφράγιση του κελιού τους.

Μεγάλο ενδιαφέρον αποτελεί επίσης το βακτήριο *P. polymyxa* και η ικανότητά του να παράγει πολυμυξίνες. Οι πολυμυξίνες είναι προϊόντα ζύμωσης του βακτηρίου *P. polymyxa* και αναγνωρίστηκαν πρώτη φορά για την αντιμικροβιακή τους δράση το 1940. Από τις 5 πολυμυξίνες που αναγνωρίστηκαν αρχικά (πολυμυξίνες A-E), μόνο η πολυμυξίνη B και E (κολιστίνη) χρησιμοποιήθηκαν για φαρμακευτική χρήση, διότι δείχτηκαν να είναι οι λιγότερο νεφροτοξικές. Από τη στιγμή, όμως, που ανακλύφτηκαν νέα αντιβιοτικά τα οποία δείχτηκαν να είναι λιγότερο νεφροτοξικά οι πολυμυξίνες αφέθηκαν. Παρόλα αυτά με την εμφάνιση νέων, ανθεκτικών στα περισσότερα αντιβιοτικά, gram αρνητικών βακτηρίων, οι πολυμυξίνες φαίνονται να ξαναέρχονται στο επίκεντρο της συζήτησης. Αν και οι ακριβείς μηχανισμοί είναι άγνωστοι, οι πολυμυξίνες φαίνεται να ασκούν τη δράση τους με δέσμευση σε φωσφορικές ομάδες στα λιπίδια των μεμβρανών gram-αρνητικών βακτηρίων, οδηγώντας τελικά τη μεμβράνη σε διάσπαση και διαρροή των ενδοκυτταρικών περιεχομένων. Οι πολυμυξίνες είναι δραστικές in vitro έναντι ενός ευρέος φάσματος αρνητικών αερόβιων βάκιλλων, με τις αξιοσημείωτες εξαιρέσεις των: *Burkholderia spp.*, *Serratia marcescens*, *Proteus spp.*, και *Morganella morganii*. Το μεγάλο μέγεθος, το θετικό τους φορτίο, η κακή ικανότητα διάχυσης στο άγαρ και η προσκόλληση τους σε πλαστικές και γυάλινες επιφάνειες οδηγούν σε προκλήσεις στην εκτέλεση in vitro δοκιμών ευαισθησίας με πολυμυξίνες.

Τέλος το *P. peoriae*, φαίνεται να είναι ένα βακτήριο με πολύ συγγενική σχέση και πολλές ομοιότητες με το *P. polymyxa*. Πρόσφατες έρευνες που έγιναν σε ορισμένα στελέχη του το ανέδειξαν να έχει βακτηριοκτόνο δράση ενάντια σε μια πλατιά γκάμα φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Η ανταγωνιστική δραστηριότητά του εναντίον μιας μεγάλης ποικιλίας βακτηρίων και μυκήτων (κάποιοι από τους οποίους ευθύνονται για σημαντικά προβλήματα στη γεωργία) προκαλεί το ενδιαφέρον για μελλοντικές χρήσεις του.

Παρόλο λοιπόν, που το γένος *Paenibacillus* δεν έχει μελετηθεί ακόμα σε μεγάλο βαθμό, τα ως τώρα ευρήματα δείχνουν πως με τη πάροδο του χρόνου θα παίξει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της γεωργίας, της βιομηχανικής βιοτεχνολογίας καθώς και στον τομέα της υγείας. [\[42\]](#), [\[43\]](#), [\[44\]](#)

Συζήτηση

Το μέλι αποτελεί ένα πολύ σημαντικό λειτουργικό τρόφιμο γνωστό για τις πολύ καλές αντιμικροβιακές ικανότητές του, ιδιαίτερα ενάντια σε βακτήρια ανθεκτικά σε διάφορα είδη αντιβιοτικών. Η δράση του ενάντια σε βακτήρια έχει μελετηθεί και γνωρίζουμε ότι πολλά συστατικά του, παίζουν ρόλο στην ικανότητά του να τα καταπολεμά και ότι πολλές φορές η δράση των συστατικών του έχει συνεργιστικό αποτέλεσμα.

Στην παρούσα μελέτη, έγινε απομόνωση βακτηρίων, που προέρχονται από διάφορα μέλια που παράχθηκαν σε περιοχές κοντά στον Όλυμπο και εξετάστηκε ποια από αυτά εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι των παθογόνων βακτηρίων *S. aureus* και *P. aeruginosa*.

Τα *S. aureus* και *P. aeruginosa* αποτελούν βακτήρια ιδιαίτερης κλινικής σημασίας με εκατομμύρια κρούσματα ανά το χρόνο παγκοσμίως. Η ανάπτυξη ολοένα και περισσότερων στελεχών με ανθεκτικότητα στα ως τώρα γνωστά αντιβιοτικά κάνει απαραίτητη την ύπαρξη έρευνας ώστε να βρεθούν νέοι τρόποι αντιμετώπισής τους.

Αξίζει να σημειωθεί ότι παλαιότερες, παρόμοιες έρευνες που είχαν γίνει στο πανεπιστήμιο Θεσσαλίας στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, με υπεύθυνο καθηγητή τον κ. Δημήτριο Μόσιαλο είχαν αναδείξει θετικά αποτελέσματα (βλ. πτυχιακές εργασίες Κουτσού Ιωάννα και Τζήκου Αικατερίνη).

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 16 δείγματα μελιών και η καλλιέργεια των βακτηρίων έγινε σε θρεπτικά υποστρώματα PCA και *Bacillus cereus* medium.

Από τις 384 βακτηριακές αποικίες που απομονώθηκαν και ελέγχθηκαν, μόνο μία ανέδειξε αντιμικροβιακή δράση έναντι του *S. aureus*.

Έγινε απομόνωση του DNA και στη συνέχεια με τη βοήθεια της PCR ενισχύθηκε ο γονιδιακός 16s rRNA. Ύστερα από αλληλούχιση και σύγκριση της αλληλουχίας μας με τη βάση δεδομένων του NCBI, το βακτηριακό στέλεχος που απομονώθηκε φάνηκε να ανήκει στο γένος *Paenibacillus*.

Πρόσφατες έρευνες έχουν αναδείξει το γένος *Paenibacillus* ως ένα βακτηριακό γένος με πολλές χρήσεις τόσο στον τομέα της υγείας, όσο και στους τομείς της γεωργίας και της βιοτεχνολογίας γενικότερα.

Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι το βακτήριο το οποίο απομονώθηκε δεν εμφάνισε 100% ταυτοποίηση με κανένα άλλο βακτηριακό στέλεχος της βάσης δεδομένων παρόλο που η 16s rRNA αλληλουχία του είναι κατά 99% όμοια με τα είδη *P. polymyxa* και *P. peoriae*. Ίσως λοιπόν να πρόκειται για κάποιο νέο βακτηριακό στέλεχος το οποίο δεν έχει περαστεί ακόμη σε κάποια βάση δεδομένων.

Ενδιαφέρον προκαλεί επίσης και το εξής: Καθώς εξετάζαμε τα αποτελέσματα μας παρατηρήσαμε ότι το βακτήριο εμφάνισε μια μικρή αντιμικροβιακή δράση έναντι της *P. aeruginosa*. Δηλαδή η *P. aeruginosa* δεν κατάφερε να αναπτυχθεί τόσο «πάνω» από το βακτήριο όσο και σε μία μικρή ακτίνα λίγων χιλιοστών γύρω από αυτό. Με αυτή την έννοια τα αποτελέσματα αυτά θεωρήθηκαν αμελητέα. Γνωρίζοντας όμως πλέον ότι το απομονωμένο βακτηριακό στέλεχος εμφανίζει 99% επικάλυψη στην 16s rRNA αλληλουχία του με το *P. polymyxa* μπορούμε να υποθέσουμε την ύπαρξη πολυμιξίνων. Εξετάζοντας την βιβλιογραφία μας, βλέπουμε ότι οι πολυμιξίνες έχουν μικρή ικανότητα διάχυσης στο άγαρ και άρα αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει το αποτέλεσμα που είδαμε. Χρήσιμο, θα ήταν λοιπόν, στο μέλλον να πραγματοποιηθεί εκ νέου δοκιμασία αντιμικροβιακής δραστηριότητας αλλά αυτή τη φορά σε δοκιμαστικό σωλήνα, προκειμένου να βρεθεί η ελάχιστη βακτηριοκτόνος πυκνότητα (Αν υπάρχει).

Για τη συνέχιση της δουλειάς, θα πρέπει να γίνει προσπάθεια απομόνωσης και ταυτοποίησης περισσότερων βακτηρίων από ελληνικά μέλια και να ελεγχθεί η αντιμικροβιακή τους δράση, όχι μόνο σε αυτά τα δύο παθογόνα βακτήρια-στόχους, αλλά και σε άλλα βακτήρια που προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο και εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Επίσης θα μπορούσε να γίνει προσπάθεια εύρεσης των μηχανισμών μέσω των οποίων το απομονωθέν βακτήριο προκαλεί την αναστολή του *S. aureus* καθώς και έρευνα σχετικά τις γενικότερες πιθανές χρήσεις που θα μπορούσε να έχει, αφού βάσει αυτών που ως τώρα γνωρίζουμε, τα βακτήρια του γένους *Paenibacillus* φαίνεται να εμφανίζουν μια μεγάλη γκάμα χρήσεων.

Σε κάθε περίπτωση η έρευνα σχετικά με τα βακτήρια που εμφανίζονται στο μέλι φαίνεται να έχει πλούσιο μέλλον και μεγάλες δυνατότητες μπροστά της, με πολλά περισσότερα να είναι αυτά που δεν γνωρίζουμε σε σχέση με αυτά που γνωρίζουμε.

Παράρτημα

Χρόνος επώασης στερεών και υγρών καλλιεργειών

Μέλι	Bacillus Cereus Medium	PCA	Nutrient Broth	Nutrient Agar
1	72h	36h	8h	24h
2	48h	24h	10h	24h
3	48h	36h	18h	16h
4	48h	36h	18h	16h
5	60h	60h	18h	18h
6	48h	48h	18h	18h
7	60h	36h	24h	16h
8	60h	36h	24h	16h
9	48h	48h	24h	16h
10	48h	48h	24h	16h
11	48h	48h	18h	16h
12	48h	48h	24h	16h
13	60h	24h	10h	16h
14	48h	24h	10h	16h
15	48h	48h	10h	16h
16	48h	48h	24h	16h

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Eva Crane, The world History of Beekeeping and honey hunting
2. Mark L. Winston, The Biology of the Honey Bee (1991)
3. Roger A. Morse, Παραγωγή και εκτροφή βασιλισσών
4. Melissa Stewart, How Do Bees Make Honey? (2008)

5. Ανδρέας Θρασυβούλου, Φυσικές ιδιότητες του μελιού
6. Ανδρέας Θρασυβούλου, Η βιολογική αξία του μελιού
7. Crane, E., (1990). The traditional hive products: honey and beeswax
8. Κέντρο Ελληνικής Μελισσοκομίας
9. Θρασυβούλου Ανδρέας και Παπαδημητρίου Χρήστος, Παραγωγή, χημική σύσταση και χρήσεις της γύρης των μελισσών
10. Μπίκος Θανάσης, Πρόπολις: Το θαύμα των μελισσών (2001)
11. Ανδρέας Θρασυβόλου, Παραγωγή, χημική σύσταση και χρήσεις του κεριού των μελισσών
12. Πασχάλης Χαριζάνης και Αικατερίνη Σάτου, Βασιλικός Πολτός (Παραγωγή-Σύσταση-Χρήσεις)
13. Honey: a novel antioxidant., Erejuwa OO, Sulaiman SA, Ab Wahab MS
14. Cardioactive and vasoactive effects of natural wild honey against cardiac malperformance induced by hyperadrenergic activity, Rakha MK, Nabil ZI, Hussein AA
15. Antineoplastic Effects of Bee Honey and *Nigella sativa* on Hepatocellular Carcinoma Cells, Mahmoud I. Hassan, MD, PhD, Gamal M. Mabrouk, MD, PhD, Hanan H. Shehata, MD, PhD, Marwa M. Aboelhussein, MD
16. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis, [Takeshi Nagai^a](#) [Mizuho Sakai^{ab}](#) [Reiji Inoue^c](#) [Hachiro Inoue^c](#) [Nobutaka Suzuki^a](#)
17. Effects of daily consumption of honey solution on hematological indices and blood levels of minerals and enzymes in normal individuals. , Al-Waili NS
18. Honey: its medicinal property and antibacterial activity, Manisha Deb Mandal and Shyamapada Mandal

19. The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey, [Christopher J.Adams](#), ^a[MerilynManley-Harris](#), [Peter C.Molan](#)
20. Microorganisms in honey, Snowdon JA, Cliver DO
21. Χαριζάνης, Π. Χ. (1996). Μέλισσα και μελισσοκομική τεχνική. Β' Έκδοση του ιδίου
22. Analysis of transcription of the *Staphylococcus aureus* aerobic class Ib and anaerobic class III ribonucleotide reductase genes in response to oxygen, Masalha M, Borovok I, Schreiber R, Aharonowitz Y, Cohen G
23. "Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management", Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG
24. Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage, Cole AM, Tahk S, Oren A, Yoshioka D, Kim YH, Park A, Ganz T
25. *Pseudomonas aeruginosa: Infections and Treatment*, Balcht A, Smith R (1994)
26. Growth Profile and Hydrocarbonoclastic Potential of Microorganisms Isolated from Tarballs in the Bight of Bonny, Nigeria". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Itah A, Essien J (2005)
27. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis". *Future Microbiology*, Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T
28. Enumeration of *Bacillus cereus* in Foods, D. A. A. MOSSEL, M. J. KOOPMAN, AND E. JONGERIUS (1967)
29. <http://www.labm.com/products/prep-bacillus-cereus-medium.asp>
30. Handbook of Microbiological Media, Ronald M. Atlas

31. Medicago AB, (2010) Phosphate buffered saline specification sheet, [http://www.medicago.se/sites/default/files/pdf/productsheets/PBS_Buffer v. 01.pdf](http://www.medicago.se/sites/default/files/pdf/productsheets/PBS_Buffer_v.01.pdf)
32. <http://www.labm.com/products/nutrient-broth-and-eand.asp>
33. <http://www.labm.com/products/nutrient-agar.asp>

34. Christoph, Ralf; Schmidt, Bernd; Steinberner, Udo; Dilla, Wolfgang; Karinen, Reetta (2006). "Glycerol". Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.
35. Glycerol Freezing Point Archived February 27, 2012, at the Wayback Machine
36. https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink_genomic_mini_man.pdf
37. A short history of the polymerase chain reaction, [Bartlett JM¹](#), [Stirling D.](#)
38. Bacterial 16S ribosomal RNA gene sequencing in cutaneous research, Jay-Hyun Jo, Postdoctoral Fellow, Elizabeth A. Kennedy, Post-baccalaureate Fellow, and Heidi H. Kong, Investigator
39. "Agarose gels: Properties and use for electrophoresis", Philip Serwer (1983)
40. http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/DNA%20clean-up/UM_PCRcleanup_Gelex_NSGelPCR.pdf
41. "*Basic local alignment search tool*". *Journal of Molecular Biology*, Altschul, Stephen; Gish, Warren; Miller, Webb; Myers, Eugene; Lipman, David
42. Infectious Diseases (Fourth Edition), section 7: anti-infective therapy, polymyxins, [Michael J.SatlinStephen G.Jenkins](#)

43. Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD-62 against a broad spectrum of phytopathogenic bacteria and fungi, I. von der Weid , D.S. Alviano, A.L.S. Santos, R.M.A. Soares, C.S. Alviano and L. Seldin
44. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review, Elliot Nicholas Grady, Jacqueline MacDonald, Linda Liu, Alex Richman, and Ze-Chun Yuan
45. Bosi, G. and Battaglini, M. (1978). Gas Chromatographic analysis of free and protein amino acids in some unifloral honeys