

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος

Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

«ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»



**Μελέτη της αντιβακτηριακής δράσης μελιών της περιοχής του
Ολύμπου έναντι παθογόνων βακτηρίων**

Ελένη Τσαβέα



Λάρισα, 2018

Μελέτη της αντιβακτηριακής δράσης μελιών της περιοχής του Ολύμπου έναντι
παθογόνων βακτηρίων

Studies of antibacterial activity of Olympus honey against pathogenic bacteria

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

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

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

Αμούτζιας Γρηγόρης: Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας – Ιολογίας στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. Δημήτριο Μόσιαλο, επίκουρο καθηγητή και επιβλέποντα της μεταπτυχιακής διατριβής, για την αμέριστη βοήθεια του, την υπομονή και τις πολύτιμες συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Εκφράζω τις ευχαριστίες μου και στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη και τον επίκουρο καθηγητή κ. Αμούτζια Γρηγόριο.

Επίσης, ευχαριστώ τους συναδέλφους μου και όλη την ομάδα του εργαστηρίου για την άριστη συνεργασία. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για τη συμπαράσταση, την υποστήριξη και την υπομονή που έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια αυτή.

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη	7
Abstract.....	10
Κατάλογος Εικόνων	12
Κατάλογος Πινάκων.....	13
1. Εισαγωγή.....	14
1.1 Τι είναι το μέλι	14
1.2 Η σύσταση του μελιού	15
1.3 Η διατροφική αξία του μελιού.....	19
1.4 Τα είδη μελιού	20
1.4.1 Μέλι Ανθέων	21
1.4.1.1 Μέλι θυμαριού (<i>Thymus vulgaris</i>).....	21
1.4.1.2 Μέλι πορτοκαλιάς (<i>Citrus sinensis</i>)	21
1.4.1.3 Μέλι βαμβακιού (<i>Gossypium spp.</i>).....	22
1.4.1.4 Μέλι ηλίανθου (<i>Helianthus annuus</i>)	22
1.4.1.5 Μέλι ερείκης (σουσούρα, <i>Erica verticillata</i>).....	22
1.4.1.6 Μέλι καστανιάς (<i>Castanea sativa</i>)	23
1.4.1.7 Μέλι κουμαριάς (<i>Arbutus unedo</i>).....	23
1.4.1.8 Μέλι ακακίας (<i>Robinia pseudoacacia</i>).....	23
1.4.1.9 Σιδηρίτης ή τσάι του βουνού (<i>Sideritis spp</i>)	24
1.4.2 Μέλι Μελιτώματος.....	24
1.4.2.1 Μέλι πεύκου (<i>Pinus halepensis</i>)	24
1.4.2.2 Μέλι Ελάτου (<i>Abies sp</i>)	25
1.4.2.3 Μέλι βελανιδιάς (<i>Quercus macrolepis</i>)	25
1.5 Οι ευεργετικές δράσεις του μελιού στον άνθρωπο	25
1.6 Το μέλι ως αντιμικροβιακός παράγοντας.....	28
1.7 Το Μέλι Manuka.....	33
1.8 Βακτηριακά είδη	36
1.8.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	36
1.8.2. <i>Citrobacter freundii</i>	38
1.8.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	39
1.8.4 <i>Salmonella spp.</i>	41
1.8.4.1 <i>Salmonella infantis</i>	42
1.8.4.2 <i>Salmonella typhimurium</i>	41
2. Σκοπός της παρούσας εργασίας.....	45
3. Υλικά και μέθοδοι.....	46
3.1 Δείγματα μελιών	46

3.2. Μέθοδοι	47
3.2.1 Εκτίμηση της αντιβακτηριακής ικανότητας των δειγμάτων μελιού μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (<i>microtiter plates</i>).....	48
3.2.1.1 Αρχή της μεθόδου.....	48
3.2.1.2 Υλικά , θρεπτικά υποστρώματα και όργανα	49
3.2.1.3 Πειραματική διαδικασία.....	49
3.2.1.3.1 Προετοιμασία καλλιέργειας	49
3.2.1.3.2 Προετοιμασία δείγματος	49
3.2.2 Διάκριση των δειγμάτων μελιού σε αυτά με βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνο δράση μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (<i>Minimum Bactericidal Concentration</i>).....	52
3.2.2.1 Αρχή μεθόδου	52
3.2.2.2 Υλικά, θρεπτικά υποστρώματα και όργανα	52
3.2.2.3 Πειραματική διαδικασία.....	52
3.2.3 Εκτίμηση των μηχανισμών της αντιβακτηριακής ικανότητας των μελιών μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>) με την χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (<i>microtiter plates</i>) με την προσθήκη α) καταλάσης β) πρωτεΐνης Κ.	53
3.2.3.1 Αρχή της μεθόδου.....	53
3.2.3.2 Υλικά, θρεπτικά υποστρώματα και όργανα	54
3.2.3.3 Πειραματική διαδικασία.....	54
3.2.3.3.1 Προετοιμασία καλλιέργειας	54
3.2.3.3.2 Προετοιμασία δείγματος	55
4. Αποτελέσματα	57
4.1 Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης και προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (<i>Minimum Bactericidal Concentration</i>).....	57
4.2 Προσδιορισμός των μηχανισμών δράσης της αντιβακτηριακής ικανότητας των δειγμάτων μελιού με τον καθορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης μετά την προσθήκη α) καταλάσης β) πρωτεΐνης Κ.	62
5. Συζήτηση	70
6. Βιβλιογραφία	75

Περίληψη

Η έντονη εξάπλωση των ανθεκτικών, στα αντιβιοτικά, βακτηρίων τα τελευταία χρόνια έχει οδηγήσει στην ανάγκη για εύρεση εναλλακτικών θεραπειών. Λόγω της ισχυρής αντιβακτηριακής του δράσης, το μέλι αποτελεί μια τέτοια εναλλακτική λύση. Έχει αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, η χρήση του μελιού τόσο σαν φυσικό συντηρητικό στα τρόφιμα, αλλά και σε ιατρικές εφαρμογές, όπως η επούλωση πληγών. Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το χαμηλό pH, η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, οι φαινολικές ενώσεις αλλά και οι πρωτεϊνικής φύσεως ουσίες.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν δέκα δείγματα μελιών από διαφορετική βοτανική προέλευση από την ευρύτερη περιοχή του Ολύμπου και εκτιμήθηκε η ικανότητα τους να αναστέλλουν και να θανατώνουν πέντε Gram αρνητικά βακτήρια, το *Acinetobacter baumannii*, τη *Klebsiella pneumoniae*, το *Citrobacter freundii*, τη *Salmonella typhimurium* και τη *Salmonella infantis*, καθώς και η μελέτη των μηχανισμών δράσης των μελιών αυτών. Τα μέλια που εξετάστηκαν συγκρίθηκαν με το μέλι Manuka MGO 550+, γνωστό για την ισχυρή αντιβακτηριακή του δράση.

Για την εκτίμηση της αντιβακτηριακής ικανότητας των μελιών, χρησιμοποιήθηκε η *in vitro* μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*Minimum Inhibitory Concentration, MIC*) και για τη διάκριση τους σε αυτά με βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνο δράση, χρησιμοποιήθηκε η *in vitro* μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (*Minimum Bactericidal Concentration, MBC*). Για την διερεύνηση των μηχανισμών της αντιβακτηριακής δράσης των μελιών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης με την προσθήκη α) καταλάσης που διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου και β) πρωτεΐνάσης K, η οποία καταστρέφει πρωτεΐνες ή ολιγοπεπτίδια που υπάρχουν στο μέλι και συμβάλλουν στην αντιβακτηριακή του δράση.

Από την μελέτη των δέκα μελιών προέκυψε ότι όλα τα μέλια είχαν αντιβακτηριακή δράση έναντι των πέντε παθογόνων βακτηρίων. Για το *Acinetobacter baumannii*, ένα μόνο από τα δέκα μέλια εμφάνισε ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση μικρότερη

(MIC= 6.25% v/v) σε σχέση με το μέλι Manuka (MIC= 12.5% v/v), για τη *Klebsiella pneumoniae*, τρία από τα δέκα μέλια έδειξαν ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση μικρότερη (MIC= 6.25% v/v) συγκριτικά με το μέλι Manuka (MIC= 12.5% v/v) και τέλος για τη *Salmonella infantis*, τη *Salmonella typhimurium* και το *Citrobacter freundii* τα περισσότερα μέλια παρουσίασαν ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC= 12.5% v/v) εφάμιλλη με αυτή του Manuka (MIC= 12.5% v/v). Σε όλα τα βακτήρια, τα μέλια έδειξαν βακτηριοκτόνο δράση με την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση να είναι ίδια με την ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση.

Όσον αφορά τον μηχανισμό δράσης των μελιών ενάντια στο *Acinetobacter baumannii* και τη *Klebsiella pneumoniae*, και τα δέκα μέλια φαίνεται ότι οφείλουν σε μεγάλο βαθμό την αντιβακτηριακή τους δράση στο υπεροξείδιο του υδρογόνου, καθώς κατά την προσθήκη της καταλάσης αυξήθηκε η τιμή MIC. Από τα δέκα μέλια, τα πέντε για το *Acinetobacter baumannii* και τα επτά για τη *Klebsiella pneumoniae* φαίνεται να περιέχουν και αντιβακτηριακές πρωτεΐνες ή ολιγοπεπτίδια, διότι κατά την προσθήκη της πρωτεϊνάσης K αυξήθηκε η τιμή MIC.

Αντίστοιχα, ενάντια στο *Citrobacter freundii*, εννέα από τα δέκα μέλια φαίνεται ότι οφείλουν σε μεγάλο βαθμό την αντιβακτηριακή τους δράση στο υπεροξείδιο του υδρογόνου, καθώς κατά την προσθήκη καταλάσης αυξήθηκε η τιμή MIC. Δύο από τα δέκα μέλια οφείλουν την αντιβακτηριακή δράση τους και σε πρωτεΐνες ή ολιγοπεπτίδια που υπάρχουν στο μέλι, ωστόσο σε ένα μέλι δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στη τιμή MIC με καμία από τις προσθήκες των δύο ενζύμων.

Τέλος, για τη *Salmonella typhimurium* και τη *Salmonella infantis*, οκτώ από τα δέκα μέλια φαίνεται ότι οφείλουν σε μεγάλο βαθμό την αντιβακτηριακή τους δράση στο υπεροξείδιο του υδρογόνου και για τα δύο βακτήρια, καθώς κατά την προσθήκη καταλάσης αυξήθηκε το MIC τους. Τρία από τα δέκα μέλια οφείλουν την αντιβακτηριακή δράση τους και σε πρωτεΐνες ή ολιγοπεπτίδια που υπάρχουν στο μέλι, διότι κατά την προσθήκη πρωτεϊνάσης K αυξήθηκε το MIC τους, ενώ σε δύο μέλια δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στη τιμή MIC όταν έγινε η προσθήκη των δύο ενζύμων.

Συμπερασματικά, τα μέλια της περιοχής του Ολύμπου παρουσίασαν ανασταλτική και βακτηριοκτόνο δράση έναντι των πέντε παθογόνων βακτηρίων. Επίσης, σε σύγκριση με το μέλι Manuka, εμφάνισαν εφάμιλλη, και ορισμένα καλύτερη δράση. Έτσι, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, δημιουργούνται νέες προοπτικές για τη θεραπευτική δράση και χρήση του μελιού Ολύμπου, καθώς και για τη χρήση του ως φυσικό συντηρητικό τροφίμων.

Abstract

The rapid spread of antibiotic-resistant bacteria strains that emerged in recent years has led to find alternative therapies. Due to its strong antibacterial activity, honey could be used as such an alternative. It has been of particular interest to use honey as a natural preservative in food and in medical applications, such as wound healing. The antibacterial activity of honey occurs due to a number of factors, including hydrogen peroxide, low pH, high sugar concentration, phenolic compounds and proteinaceous compounds.

The aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of Olympus honey compared to Manuka honey. Ten samples of honey from different floral sources all originating from mount Olympus, were evaluated for their ability to inhibit growth of gram negative *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella infantis* and *Salmonella typhimurium* or their ability to kill them.

In total, ten honey samples were evaluated for their antibacterial ability by using the *in vitro* method of determination of the *minimum inhibitory concentration (MIC)* in microtiter plates and for the distinction between a bacteriostatic or a bactericidal activity, the *in vitro* method of the determination of the *minimum bactericidal concentration (MBC)* was used. Investigation of antibacterial mechanisms was performed by adding catalase which degrades H₂O₂ and proteinase K, which inactivates proteins or oligopeptides that are found in honey thus contributing to its antibacterial activity.

All ten honey samples demonstrated antibacterial activity against all five bacterial strains. Regarding *Acinetobacter baumannii*, one honey sample showed a lower *minimum inhibitory concentration* (MIC= 6.25% v/v) value than Manuka honey (MIC= 12.5% v/v). Regarding *Klebsiella pneumoniae*, three honey samples exhibited a lower *minimum inhibitory concentration* (MIC= 6.25% v/v) value than Manuka honey (MIC= 12.5% v/v). About *Citrobacter freundii*, *Salmonella infantis* and *Salmonella typhimurium*, most of the honey samples have shown similar *minimum inhibitory concentration* value (MIC= 12.5% v/v) with Manuka (MIC= 12.5% v/v). All ten honey

types have shown bactericidal activity against all pathogenic bacteria that have been tested.

Regarding antibacterial mechanisms, all ten honey samples demonstrated antibacterial activity against *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* due to a generation of H₂O₂, because when catalase is added their MIC increased. Five out of ten for *Acinetobacter baumannii* and seven out of ten for *Klebsiella pneumoniae*, that were treated with proteinase K, their MIC value increased, indicating the presence of antibacterial proteinaceous compounds.

Correspondingly, the antibacterial activity of seven honey samples against *Citrobacter freundii* maybe solely attributed to hydrogen peroxide, although the antibacterial activity of two honey samples is attributed to hydrogen peroxide and proteinaceous compounds. There was one honey sample that its MIC value did not change neither with adding catalase nor with adding proteinase K.

Finally, eight honey samples demonstrated antibacterial activity against *Salmonella infantis* and *Salmonella typhimurium* due to a generation of H₂O₂, and three out of ten contain antibacterial proteins or oligopeptides contributing to their antibacterial activity, since when they were treated with catalase and proteinase K, respectively, their MIC increased. There were two honey samples that their MIC value did not change neither with adding catalase nor with adding proteinase K.

In conclusion, all tested honey which were derived from mount Olympus have exhibited inhibitory and bactericidal activity against the five pathogenic bacteria that have been studied. Also, compared to Manuka honey, they demonstrate similar and some of them better antibacterial activity. Thus, according to the results, new prospects arise for the therapeutic activity of honey and its use as a natural preservative in food.

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Θυμάρι	21
Εικόνα 2. Βαμβάκι.....	22
Εικόνα 3. Ηλίανθος	22
Εικόνα 4. Ερείκη.....	22
Εικόνα 5. Καστανιά	23
Εικόνα 6.Κουμαριά	23
Εικόνα 7. Ακακία	23
Εικόνα 8. Πεύκο	24
Εικόνα 9. Έλατο	25
Εικόνα 10. Οξειδωση της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ	32
Εικόνα 11. <i>Leptospermum scoparium</i>	33
Εικόνα 12. <i>Acinetobacter baumannii</i>	36
Εικόνα 13. <i>Citrobacter freundii</i>	38
Εικόνα 14. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	40
Εικόνα 15. <i>Salmonella infantis</i>	42
Εικόνα 16. <i>Salmonella typhimurium</i>	43
Εικόνα 17. Μέλι Manuka της εταιρίας Manuka Health New Zealand με MGO 550+. ..	47
Εικόνα 18. ELx808 Absorbance Microplate Reader	51
Εικόνα 19. Microplate replicator	53
Εικόνα 20. Πλάκα μικροτιτλοποίησης μετά το πέρας των 24 ωρών.....	61
Εικόνα 21 και Εικόνα 22. Ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση σε τετράγωνα τρυβλία μετά το πέρας των 24 ωρών.	62

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Λίστα βακτηρίων που έχουν βρεθεί ευαίσθητα ως προς το μέλι.....	30
Πίνακας 2. Κατάλογος μικροοργανισμών που έχουν βρεθεί ευαίσθητοι στο μέλι Manuka.....	35
Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά δειγμάτων μελιών της περιοχής του Ολύμπου.....	46
Πίνακας 4. Διαδοχική σειρά προσθήκης αραιώσεων των μελιών.....	51
Πίνακας 5. Διαδοχική σειρά προσθήκης αραιώσεων των μελιών.....	56
Πίνακας 6. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) και ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) έναντι του <i>Acinetobacter baumannii</i>	57
Πίνακας 7. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) και ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) έναντι της <i>Klebsiella pneumoniae</i>	58
Πίνακας 8. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) και ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) έναντι του <i>Citrobacter freundii</i>	59
Πίνακας 9. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) και ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) έναντι της <i>Salmonella typhimurium</i> και της <i>Salmonella</i> <i>infantis</i>	60
Πίνακας 10. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) έναντι του <i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i> μετά την προσθήκη α)καταλάσης, β)πρωτεΐνης Κ	63
Πίνακας 11. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) έναντι της <i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> μετά την προσθήκη α)καταλάσης, β)πρωτεΐνης Κ	64
Πίνακας 12. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) έναντι του <i>Citrobacter</i> <i>freundii</i> μετά την προσθήκη α)καταλάσης, β)πρωτεΐνης Κ	65
Πίνακας 13. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) έναντι της <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> μετά την προσθήκη α)καταλάσης, β)πρωτεΐνης Κ.....	67
Πίνακας 14. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) έναντι της <i>Salmonella</i> <i>infantis</i> μετά την προσθήκη α)καταλάσης, β)πρωτεΐνης Κ	68

1. Εισαγωγή

1.1 Τι είναι το μέλι

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

Το μέλι από την αρχαιότητα, αποτελούσε σημαντική τροφή για τον άνθρωπο. Στους περισσότερους αρχαίους πολιτισμούς το μέλι χρησιμοποιήθηκε τόσο για θεραπευτικούς όσο και ιατρικούς σκοπούς, ως παραδοσιακό φάρμακο για την επούλωση εσωτερικών και εξωτερικών πληγών, για την αντιμετώπιση κοινών κρυολογημάτων και άλλων παθήσεων του οργανισμού (Alvarez-Suarez et al., 2010). Εκτός από την επούλωση, το μέλι έχει επίσης χρησιμοποιηθεί ως συντηρητικό για άλλα τρόφιμα, λόγω της αντιμικροβιακής του δράσης (Krushna et al., 2006).

Η μετατροπή του νέκταρ σε μέλι ξεκινάει μέσα στον πρόλοβο της μέλισσας με την προσθήκη ενζύμων από τους σιελογόνους και υποφαρυγγικούς αδένες. Οι σιελογόνοι αδένες διαλύουν τα σάκχαρα και μαλακώνουν υλικά τα οποία πρόκειται να μασηθούν. Οι υποφαρυγγικοί αδένες βρίσκονται στο πάνω μέρος του κεφαλιού της μέλισσας και είναι δυο λεπτοί και μακροί αγωγοί με πολλές αναδιπλώσεις στις δύο πλευρές της κεφαλής της εργάτριας. Στις παλαιότερες εργάτριες, οι αδένες αυτοί συρρικνώνονται και παράγουν το ένζυμο ιμπερτάση, που είναι απαραίτητο για τη μετατροπή του νέκταρ σε μέλι και το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης, που μετατρέπει τη γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ (Θρασυβούλου, 2005).

Το νέκταρ και τα γλυκά εκκρίματα που συλλέγει η μέλισσα, για να μετατραπούν σε μέλι, υπόκεινται σε κατεργασίες όπως η χημική μετατροπή των σακχάρων και η απομάκρυνση ενός μεγάλου ποσοστού νερού. Το νέκταρ που συλλέγει η μέλισσα,

όπως έχει ήδη αναφερθεί το κατεργάζεται στον πρόλοβο της με τη βοήθεια διαφόρων ενζύμων που υπάρχουν στο σάλιο και στα γαστρικά υγρά της. Η κυρίαρχη χημική μετατροπή του νέκταρ, όταν αυτός γίνεται μέλι, είναι η αποδόμηση του δισακχαρίτη σουκρόζη στα μονοσάκχαρα της γλυκόζης και φρουκτόζης. Η ανασύνθεση δι- και τρισακχαριτών είναι περιορισμένη. Η κύρια επεξεργασία γίνεται στην κυψέλη από τις οικιακές (νεαρές) μέλισσες. Η συμπύκνωση του νέκταρ και των γλυκών εκκριμάτων γίνεται κατά την επεξεργασία τους στα στοματικά μόρια των οικιακών μελισσών και μέσα στα ανοιχτά κελιά. Έτσι όταν το μέλι των κελιών είναι πλέον ώριμο οι μέλισσες το σφραγίζουν με κερί (Χαριζάνης, 2014). Η ικανότητα των κοινωνικών μελισσών ως ειδών εντόμων να μετατρέπουν το ευαίσθητο σε ζυμώσεις νέκταρ και αντίστοιχα μελίτωμα στο εξαιρετικά συντηρήσιμο μέλι αποτελεί για αυτές έναν από τους βασικούς μηχανισμούς προσαρμογής τους στη φύση, ο οποίος διασφαλίζει την επιβίωση τους (Υφαντίδης, 2005).

1.2 Η σύσταση του μελιού

Το μέλι είναι ένα φυσικό προϊόν με μεγάλη βιολογική αξία. Η σύνθεση του εξαρτάται από τη βοτανική του προέλευση και τη γεωγραφική περιοχή από την οποία προέρχεται, τα είδη της μέλισσας, την περίοδο κατά την οποία παράγεται και τα μέσα αποθήκευσης του (Burns et al., 2018).

Είναι ένα υπερκορεσμένο διάλυμα σακχάρων, όπου οι υδατάνθρακες είναι τα κύρια συστατικά που αντιπροσωπεύουν περίπου το 95% της ξηρής ουσίας και αποτελείται από φρουκτόζη (32%), γλυκόζη (38%) και άλλους ολιγό- και πολυσακχαρίτες (De-Melo et al., 2017). Εκτός από τους υδατάνθρακες, το μέλι περιέχει πάνω από 200 διαφορετικές ενώσεις, όπως ένζυμα (οξειδάση της γλυκόζης, καταλάση κ.α.), πρωτεΐνες, βιταμίνες (B2, B6, C, D, E κ.ά.), αμινό- και οργανικά οξέα, λιπίδια, ανόργανα, φυτοχημικά και νερό (Stagos et al., 2018). Ο συνδυασμός των συστατικών αυτών καταστέλλει την ανάπτυξη των αλλοιογόνων βακτηρίων και συμβάλλει στη σταθερότητα του προϊόντος χωρίς την ανάγκη ιδιαίτερων συνθηκών αποθήκευσης. Ωστόσο, αναμένεται η παρουσία ενός μικρού αριθμού βακτηρίων σε μη παστεριωμένα μέλια, που περιλαμβάνουν τη φυσική χλωρίδα τους (Voidarou, 2011).

Υδατάνθρακες

Τα κύρια σάκχαρα του μελιού είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη, ενώ οι σημαντικότεροι δισακχαρίτες είναι η μαλτόζη και η σουκρόζη (Shin and Ustunol, 2005). Περισσότεροι από 45 δι-, τρι- και άλλοι ολιγο- και πολυσακχαρίτες έχουν ανιχνευθεί στο μέλι σε μικρές ποσότητες (5-15%). Οι πιο σημαντικές φυσικοχημικές και θρεπτικές ιδιότητες του μελιού, όπως η γλυκύτητα, το ιξώδες, η υγροσκοπικότητα και η ενεργειακή του αξία εξαρτώνται από τη σύνθεση των σακχάρων. Επιπλέον, το οσμωτικό δυναμικό που παράγεται από την υψηλή συγκέντρωση σακχάρων είναι ένας σημαντικός αντιμικροβιακός παράγοντας (De-Melo et al., 2017).

Πρωτεΐνες και αμινοξέα

Η πρωτεΐνη του μελιού προέρχεται από τους σιελογόνους αδένες της μέλισσας αλλά και από το νέκταρ και τη γύρη του φυτού και η περιεκτικότητά της μπορεί να κυμαίνεται από 0.1 έως 0.5% (Chua et al., 2013). Περίπου 20 διαφορετικές μη ενζυμικές πρωτεΐνες έχουν εντοπιστεί στο μέλι, πολλές από τις οποίες είναι κοινές σε όλα τα μέλια, στις οποίες περιλαμβάνονται οι λευκωματίνες, οι σφαιρίνες και οι νουκλεοπρωτεΐνες (De-Melo et al., 2017).

Τα ελεύθερα αμινοξέα είναι ενώσεις του μελιού που είναι υπεύθυνες για ορισμένες ιδιότητες του όπως οι αντιοξειδωτικές δραστηριότητες. Η προέλευση των αμινοξέων του μελιού αποδίδεται τόσο σε ζωική (εκκρίσεις μελισσών) όσο και σε φυτική (νέκταρ και κυρίως γύρη) προέλευση. Η προλίνη είναι το πιο άφθονο ελεύθερο αμινοξύ στο μέλι, η οποία κυμαίνεται από 50 έως 85% του συνόλου και ακολουθεί η φαινυλαλανίνη και το γλουταμινικό οξύ (De-Melo et al., 2017; Chua et al., 2013). Η προλίνη μπορεί να συσχετιστεί με το ενζυμικό περιεχόμενο, καθώς μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο ως ρυθμιστής της μεταφοράς ενζύμων του νέκταρ, κυρίως των εκκρίσεων της ιμπερτάσης κατά τη διάρκεια του μετασχηματισμού του νέκταρ σε μέλι (De-Melo et al., 2017).

Οργανικά οξέα

Τα οργανικά οξέα του μελιού αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 0.5% των συνολικών στερεών, αλλά είναι σημαντικά για τη γεύση, το άρωμα, το χρώμα και τη διατήρηση του, γεγονός που δυσχεραίνει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. (Ananias et al., 2013; Bogdanov, 2011). Ορισμένα οργανικά οξέα των μελιών είναι πιθανό να προέρχονται απευθείας από το νέκταρ ή το μέλι (κιτρικό, μηλικό και οξαλικό), αλλά η συντριπτική τους πλειοψηφία παράγεται από τα σάκχαρα του νέκταρ και του μελιού με τη δράση των ενζύμων που εκκρίνονται από τις μέλισσες κατά την ωρίμανση και την αποθήκευση (μυρμηκικό οξύ και άλλα). Το γλυκονικό οξύ είναι το κύριο οργανικό οξύ του μελιού, που αντιπροσωπεύει το 70-90% του συνόλου. Εκτός από το γλυκονικό οξύ, περισσότερα από 30 διαφορετικά μη αρωματικά οργανικά οξέα έχουν βρεθεί στο μέλι όπως το οξικό, το βουτυρικό, το κιτρικό, το μυρμηκικό, το γαλακτικό, το μηλεϊνικό, το μηλικό, το οξαλικό, το φουμαρικό, το πυρογλουταμικό κ.ά (Mato et al., 2003).

Ένζυμα

Το μέλι περιέχει μικρές ποσότητες ενζύμων εκ των οποίων η διασάση, η ιμπερτάση και η οξειδάση της γλυκόζης είναι τα πιο σημαντικά. Άλλα ένζυμα που έχουν βρεθεί στο μέλι είναι η όξινη φωσφατάση, η καταλάση και η β-γλυκοσιδάση. Ένζυμα όπως η ιμπερτάση και η οξειδάση της γλυκόζης παράγονται κυρίως στον υποφαρυγγικό αδέν των μελισσών.

Η διασάση (αμυλάση) είναι το ένζυμο του μελιού με τη καλύτερη αντίσταση στη θερμότητα, γι' αυτό χρησιμοποιείται ευρέως ως ένας δείκτης της φρεσκάδας του μελιού. Η διασάση υδρολύει το άμυλο και τις δεξτρίνες, με αποτέλεσμα να προκύπτουν μικρότεροι υδατάνθρακες. Η ιμπερτάση (α-γλυκοσιδάση) είναι ένα σημαντικό ένζυμο για το μέλι, αφού μετατρέπει το νέκταρ σε μέλι, υδρολύοντας τη σουκρόζη σε φρουκτόζη και γλυκόζη (De Melo et al., 2017). Η οξειδάση της γλυκόζης, ένα από τα ένζυμα που μεταβολίζουν τους υδατάνθρακες που προστίθενται στο νέκταρ από τις μέλισσες, μετατρέπει τη γλυκόζη σε υπεροξειδίο

του υδρογόνου και γλυκονικό οξύ υπό αερόβιες συνθήκες (Kwakman and Zaat, 2012).

Βιταμίνες και Ιχνοστοιχεία

Η πιο σημαντική βιταμίνη στο μέλι είναι η βιταμίνη C η οποία έχει αντιοξειδωτική δράση. Επίσης, έχουν ανιχνευθεί βιταμίνες του συμπλέγματος B, καθώς και λιποδιαλυτές βιταμίνες (A,D,E,K) σε μικρότερες ποσότητες (Leon-Ruiz et al., 2013).

Τα πιο σημαντικά ανόργανα άλατα που βρίσκονται στα μέλια είναι το κάλιο, το νάτριο, το ασβέστιο και το μαγνήσιο και σε λιγότερη αφθονία βρίσκεται ο σίδηρος, το μαγγάνιο, το χλώριο και ο χαλκός. Η συγκέντρωση των βιταμινών και των ιχνοστοιχείων είναι χαμηλή και δεν επαρκεί για να καλύψει τη συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη του ανθρώπινου οργανισμού, είναι όμως αρκετή για να εξασφαλίσει την απορρόφηση και τη χρησιμοποίηση των σακχάρων (De Melo et al., 2017).

Φαινολικές ενώσεις

Οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στο μέλι είναι παρούσες με τη μορφή φλαβονοειδών (Cortes et al., 2011). Τα φλαβονοειδή που υπάρχουν στο μέλι συμβάλλουν σημαντικά στο χρώμα του, τη γεύση και το άρωμα του (Alzahrani et al., 2012). Επίσης, συμβάλουν εξαιρετικά και στην ολική αντιοξειδωτική δράση του μελιού με ευεργετικά αποτελέσματα για την υγεία (de Silva et al., 2016).

Νερό

Η περιεκτικότητα του μελιού σε νερό κυμαίνεται μεταξύ 13-25%, με το βέλτιστο περίπου στο 17%. Η περιεκτικότητα του σχετίζεται με διάφορους παράγοντες, όπως η βοτανική και γεωγραφική προέλευση του νέκταρ, οι εδαφοκλιματικές συνθήκες, η εποχή συγκομιδής, ο βαθμός ωρίμανσης και ο χειρισμός από τους μελισσοκόμους κατά τη διάρκεια της συγκομιδής, επεξεργασίας και αποθήκευσης του. Ορισμένες άλλες ιδιότητες του μελιού, όπως το χρώμα, η κρυστάλλωση, το ιξώδες, η γεύση και η πυκνότητα επηρεάζονται επίσης από το περιεχόμενο του σε νερό (De-Melo et al., 2017).

1.3 Η διατροφική αξία του μελιού

Το μέλι λόγω της μοναδικής του γεύσης, της διατροφικής του αξίας καθώς και των ιδιοτήτων του, έχει σημαντική θέση στη διατροφή του ανθρώπου. Επειδή έχει υποστεί εντός του στομάχου της μέλισσας κάποια χημική επεξεργασία, είναι ευκολότερα αφομοιώσιμο από τον ανθρώπινο οργανισμό (Νικολαΐδη, 2005). Είναι εύπεπτο και υψηλής ενεργειακής αξίας. Η κατανάλωση 100 g μελιού παρέχει στο σώμα περίπου 320 kcal. Ωστόσο, οι ιδιότητες αυτού του προϊόντος που βελτιώνουν την υγεία, προέρχονται κυρίως από την παρουσία και άλλων συστατικών εκτός από τα σάκχαρα: ένζυμα, πεπτίδια, ελεύθερα αμινοξέα, βιταμίνες, οργανικά οξέα, φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και άλλα φυτοχημικά και ανόργανα άλατα (Szweda, 2017).

Σε σύγκριση με τη ζάχαρη, το μέλι έχει αποδειχθεί ως ένας πιο θρεπτικός γλυκαντικός παράγοντας. Σε αντίθεση με τη ζάχαρη, στο πεπτικό σύστημα του ανθρώπου η κατανάλωση μελιού βελτιώνει την απορρόφηση ασβεστίου που θα μπορούσε να συμβάλει στη μείωση του κινδύνου απώλειας οστικής μάζας.

Σύμφωνα με μερικούς ερευνητές, πολλά ένζυμα του μελιού μπορούν να ενισχύσουν την πέψη των σακχάρων και του αμύλου (Ajibola, 2012). Επίσης, το μέλι περιέχει θρεπτικές ουσίες όπως η χολίνη και η ακετυλοχολίνη. Η χολίνη είναι ζωτικής σημασίας για τα καρδιαγγειακά και τις λειτουργίες του εγκεφάλου, καθώς και για τη σύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης ενώ η ακετυλοχολίνη λειτουργεί ως νευροδιαβιβαστής (Bogdanov, 2015).

Το μέλι και ο γλυκαιμικός δείκτης

Όσον αφορά τον γλυκαιμικό δείκτη, το μέλι περιγράφεται ως μια πιο υγιεινή επιλογή τροφίμου σε σύγκριση με τη σακχαρόζη. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι υδατάνθρακες επηρεάζουν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. Ένας από τους κύριους μονοσακχαρίτες του μελιού, η φρουκτόζη, έχει πολύ χαμηλότερο γλυκαιμικό δείκτη ($GI = 19$) σε σύγκριση με τη σακχαρόζη ($GI = 68$), γεγονός που σημαίνει ότι τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα αυξάνονται πιο αργά με το μέλι. Ο γλυκαιμικός δείκτης μπορεί να προβλέψει τον

ρόλο των υδατανθράκων στην ανάπτυξη της παχυσαρκίας, γεγονός που σημαίνει ότι τα μέλια με χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη θα μπορούσαν να αποτελέσουν πολύτιμη εναλλακτική λύση για τα γλυκαντικά υψηλού γλυκαιμικού δείκτη (Bogdanov, 2015).

Το μέλι και τα πρεβιοτικά

Η γαστρεντερική οδός περιέχει πολλά βασικά και ευεργετικά βακτήρια, για τη διατήρηση της ζωής και της υγείας, όπως είναι το *Bifidobacterium*. Έχει προταθεί ότι μπορεί κανείς να αυξήσει τον πληθυσμό των *Bifidobacteria* στη γαστρεντερική οδό καταναλώνοντας τρόφιμα πλούσια σε πρεβιοτικά όπως το φυσικό μέλι (Sanz et al., 2005). Τα πρεβιοτικά είναι ουσίες που διευκολύνουν την ανάπτυξη και τη βιολογική δραστηριότητα των ευεργετικών βακτηρίων. Η κατανάλωση μελιού είναι σημαντική στην πέψη, και αυτή η επίδραση προέρχεται από τους ολιγοσακχαρίτες του μελιού. Πολλές πειραματικές μελέτες που αφορούν τόσο μελέτες *in vitro* όσο και *in vivo* έχουν τεκμηριωθεί σχετικά με τη σημασία της διατροφικής συμπλήρωσης με φυσικό μέλι για την ανάπτυξη των ευεργετικών βακτηρίων (*bifidobacteria* και *lactobacilli*) και των προβιοτικών τους επιδράσεων στη γαστρεντερική οδό (Shin and Ustunol, 2005). Μια συγκριτική μελέτη για τα φυσικά (μέλι) και τεχνητά (σακχαρόζη) σάκχαρα έδειξε ότι το μέλι αύξησε τόσο *in vitro* τα ευεργετικά βακτήρια, τους λακτοβάκιλους, όσο και *in vivo* (στο λεπτό και το παχύ έντερο των πειραματόζωων), ενώ η σακχαρόζη δεν είχε καμία επίδραση (Ajibola et al., 2012).

1.4 Τα Είδη μελιού

Τα μέλια ανάλογα με την προέλευση τους διαχωρίζονται σε

- Μέλι ανθέων ή μέλι νέκταρ που είναι το μέλι που παράγεται από το νέκταρ των φυτών. Είναι ένα υδατώδες διάλυμα το οποίο παράγεται από τους εξειδικευμένους αδενικούς ιστούς ή νεκταρογόνα που βρίσκονται στην καρδιά των ανθέων. Η σύνθεση του σε σάκχαρα επηρεάζει την ταχύτητα κρυστάλλωσης του μελιού.
- Μέλι μελιτώματος που είναι το μέλι που λαμβάνεται κυρίως από τις εκκρίσεις που αφήνουν πάνω στα φυτά τα μυζηματικά έντομα. Μέσα στο μελίτωμα υπάρχουν πιο σύνθετα σάκχαρα τα οποία σχηματίστηκαν στο

πεπτικό σύστημα του μυζητικού εντόμου. Είναι πλούσιο σε άζωτο, οργανικά οξέα και σε μεταλλικά στοιχεία από του νέκταρ (Clement, 2007).

1.4.1 Μέλι Ανθέων

Στην κατηγορία των ανθόμελων ανήκουν μέλια που προέρχονται από τη συλλογή νέκταρ από άνθη διαφόρων φυτών, τα οποία προσδίδουν στο μέλι την ονομασία τους. Θεωρείται ως ένα κλασσικό ελληνικό μέλι που μαζί με το πευκόμελο υπερβαίνουν το 80% του ποσοστού της συνολικής ελληνικής παραγωγής. Παρακάτω περιγράφονται μερικοί από τους πιο συχνούς τύπους που συναντάμε.

1.4.1.1 Μέλι θυμαριού (*Thymus vulgaris*)



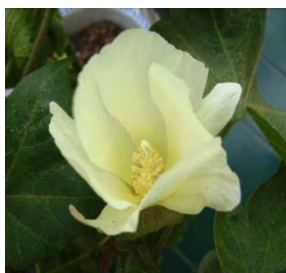
Εικόνα 1. Θυμαρί

Το θυμάρι είναι χωρία καμία αμφιβολία το σπουδαιότερο μελισσοκομικό φυτό, με εξαιρετικό άρωμα λόγω των αιθέριων ελαίων που περιέχει. Η παραγωγή του ανέρχεται περίπου σε ποσοστό 10% της συνολικής παραγωγής μελιού στην Ελλάδα. Η περίοδος άνθησης του θυμαριού είναι σχετικά σύντομη (άνοιξη έως αρχή καλοκαιριού) και η ανθοφορία του είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη. Το χρώμα του είναι ανοιχτόχρωμο λαμπερό καστανό έχει έντονη γεύση, χαρακτηριστική οσμή και πυκνότερη σύσταση. Κρυσταλλώνει σε 6 περίπου μήνες.

1.4.1.2 Μέλι πορτοκαλιάς (*Citrus sinensis*)

Η πορτοκαλιά είναι από τα πιο σημαντικά εσπεριδοειδή φυτά που καλλιεργείται εντατικά στις Μεσογειακές χώρες, σε περιοχές με σχετικά ήπιο χειμώνα. Η πορτοκαλιά ανθίζει μια φορά ετησίως με διάρκεια ανθοφορίας την άνοιξη περίπου 1-2 μήνες. Το χρώμα του είναι ανοιχτόχρωμο λαμπερό κίτρινο με γλυκιά γεύση, ευχάριστο άρωμα εσπεριδοειδών και πολύ λεπτότερη σύσταση. Κρυσταλλώνει περίπου 1-3 μήνες (Παπαδόπουλος, 2014).

1.4.1.3 Μέλι βαμβακιού (*Gossypium spp.*)



Βιομηχανικό φυτό που καλλιεργείται σε μεγάλες εκτάσεις για την παραγωγή νήματος, λαδιού και ζωοτροφής. Το νέκταρ από τα άνθη βαμβακιού είναι πλούσιο σε σάκχαρα αλλά δεν προσελκύει ιδιαίτερα τις μέλισσες εξαιτίας των χαμηλών ποσοστών του σε σουκρόζη. Αντίθετα, οι μέλισσες

Εικόνα 2. Βαμβάκι προσελκύονται από το νέκταρ που εκκρίνεται από εξωανθικά νεκτάρια και μαζεύουν μεγάλες ποσότητες μελιού (Θρασυβούλου, 2005).

Το χρώμα του είναι ιδιαίτερα ανοιχτόχρωμο με λεπτό άρωμα και γεύση. Όταν το βαμβάκι αναπτύσσεται σε ξηρά αμμώδη εδάφη, τότε το μέλι έχει δυνατή γεύση (Χαριζάνης, 2014). Έχει την υψηλότερη βακτηριοκτόνο δράση σε σύγκριση με τα άλλα είδη μελιού λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σε υπεροξειδίο του υδρογόνου. Έχει υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και για αυτό κρυσταλλώνει μέσα σε 1-3 μήνες, αποκτώντας ένα λευκό χρώμα και βουτυρώδη υφή.

1.4.1.4 Μέλι ηλιάνθου (*Helianthus annuus*)



Είναι μονοετές φυτό που καλλιεργείται κυρίως για το λάδι – ηλιέλαιο που παράγεται από τους καρπούς του. Το χρώμα του είναι έντονα κίτρινο, με ευχάριστη γλυκιά γεύση και πολύ διακριτικό άρωμα. Το μέλι αυτό είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε πολυφαινόλες, πολύ χρήσιμες για τον οργανισμό. Κρυσταλλώνει πολύ γρήγορα και

Εικόνα 3. Ηλιάνθος η συγκέντρωση των σακχάρων στο νέκταρ φτάνει το 32%.

1.4.1.5 Μέλι ερείκης (σουσουρά, *Erica verticillata*)



Συλλέγεται από τις νεκταροεκρίσεις της φθινοπωρινής ερείκης. Το φυτό αυτό παρέχει πλούσια και τονωτική τροφή για τις μέλισσες κατά τους φθινοπωρινούς μήνες. Το χρώμα του είναι κοκκινοχάλκινο που μετατρέπεται σε

Εικόνα 4. Ερείκη χρώμα καραμέλας μετά την κρυστάλλωση του, η οποία

πραγματοποιείται πολύ γρήγορα 1-3 μήνες μετά τη συλλογή του. Έχει πολύ χαρακτηριστική γεύση που θυμίζει πικρή καραμέλα και για αυτό αρέσει σε πολύ απαιτητικούς καταναλωτές. Έχει πολύ υψηλή θρεπτική αξία.

1.4.1.6 Μέλι καστανιάς (*Castanea sativa*)



Εικόνα 5. Καστανιά

Συλλέγεται από το νέктar και τις μελιτώδεις εκκρίσεις της καστανιάς. Οι μελιτώδεις εκκρίσεις παράγονται από την αφίδα *Myzocallis castanicola* που εντοπίζεται στα φύλλα και το περίβλημα των καρπών. Το χρώμα του ποικίλει από ανοιχτό καφέ μέχρι σκούρο καφέ και μαύρο ανάλογα με τη προέλευση του. Έχει υπόπικρη και διάρκειας γεύση και βαρύ άρωμα. Κρυσταλλώνει πολύ αργά, σε περίπου 2 χρόνια.

1.4.1.7 Μέλι κουμαριάς (*Arbutus unedo*)



Εικόνα 6. Κουμαριά

Το μέλι κουμαριάς συλλέγεται από τις νεκταροεκκρίσεις της ανοιξιάτικης κουμαριάς και είναι ένα προϊόν με ιδιαίτερα υψηλή θρεπτική αξία και αποτελεί μια από τις καλύτερες επιλογές για την τόνωση του οργανισμού. Έχει σκούρο χρώμα με χάλκινες ανταύγειες και πολύ χαρακτηριστική υπόπικρη με αρωματικές νότες πικρής καραμέλας που αρέσει σε απαιτητικούς καταναλωτές. Η κρυστάλλωσή του πραγματοποιείται πολύ γρήγορα, σε 2-4 μήνες μετά τη συλλογή του (Παπαδόπουλος, 2014).

1.4.1.8 Μέλι ακακίας (*Robinia pseudoacacia*)



Εικόνα 7. Ακακία

Η ακακία είναι δέντρο ταχείας ανάπτυξης, πολύ διαδεδομένο, αυτοφυές σε χέρσα εδάφη και σε ρεματιές, αλλά και καλλωπιστικό. Στην Ελλάδα η παραγωγή του μελιού αυτού είναι πιο σταθερή λόγω των διαφορετικών ποικιλιών ακακίας που υπάρχουν. Είναι ευαίσθητο δέντρο

στις καιρικές συνθήκες. Μόνο το 20% του διαθέσιμου νέκταρ αξιοποιείται από τις μέλισσες (Θρασυβούλου, 2005). Είναι ανοιχτόχρωμο, απαλής γεύσης, πολύ καλής ποιότητας και κρυσταλλώνει αργά. Είναι πολύ γλυκό γιατί έχει από τις υψηλότερες συγκεντρώσεις σακχάρων που συναντάμε στα ανθόμελα. Έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε ένζυμα και με το πέρασμα του χρόνου το χρώμα του σκουραίνει (Χαριζάνη, 2014).

1.4.1.9 Σιδηρίτη ή τσάι του βουνού (*Sideritis spp*)

Το μέλι από σιδηρίτη είναι από τα καλύτερα ελληνικά μέλια, παράγεται όμως σε μικρές ποσότητες και είναι τοπικής σημασίας. Φυτρώνει σε μεγαλύτερα υψόμετρα από το θυμάρι, ανθίζει αμέσως μετά το θυμάρι ή και συγχρόνως με αυτό και παράγει μέλι εξαιρετικής ποιότητας.

1.4.2 Μέλι Μελιτώματος

Στην κατηγορία αυτή ανήκει το μέλι που παράγουν οι μέλισσες κυρίως από τα εκκρίματα μυζητικών εντόμων των φυτών, πάνω στα ζώντα μέρη των φυτών ή από εκκρίσεις προερχόμενες από ζώντα μέρη των φυτών.

1.4.2.1 Μέλι πεύκου (*Pinus halepensis*)



Εικόνα 8. Πεύκο

Αποτελεί το 65% της συνολικής παραγωγής μελιού στην Ελλάδα. Το πευκόμελο προέρχεται από τις μελιτώδεις εκκρίσεις του εντόμου *Marchalina hellenica*, γνωστό ως «βαμβακάδα», «εργάτης», «μικρόβιο ή παράσιτο» του πεύκου και το συναντάμε κυρίως στη περιοχή της Θάσου, αλλά και στη Χαλκιδική, Εύβοια, Σκόπελο, Σκιάθο, Ζάκυνθο, Ρόδο, Κρήτη και αλλού. Το μέλι χαρακτηρίζεται από σημαντική παρουσία στοιχείων μελιτωμάτων. Έχει σκούρο χρώμα με όχι ιδιαίτερα γλυκιά γεύση και ευχάριστο άρωμα. Είναι μέλι υψηλής θρεπτικής αξίας, συνήθως δεν κρυσταλλώνει ή αυτό γίνεται πολύ αργά, μετά 2 περίπου χρόνια λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας του σε γλυκόζη (Θρασυβούλου, 2002).

1.4.2.2. Μέλι Ελάτου (*Abies sp*)



Εικόνα 9. Έλατο

Το μέλι ελάτης είναι εξαιρετικής ποιότητας μέλι που παράγεται από τα ορεινά έλατα αρκετών περιοχών της χώρας μας. Χαρακτηρίζεται από απλή παρουσία στοιχείων μελιτωμάτων. Το χρώμα του ανάλογα με την περιοχή που παράγεται μπορεί να είναι καστανό έως αρκετά σκούρο.

Είναι πολύ πυκνόρρευστο και έχει ευχάριστο άρωμα.

Πρακτικά δεν κρυσταλλώνει ποτέ ή μετά από 2 χρόνια λόγω του χαμηλού ποσοστού γλυκόζης που περιέχει.

Το ελληνικό έλατο, γνωστό ως ελάτη η Κεφαλληνική (*Abies cephalonica*), συναντιέται μόνο στην Ελλάδα και ειδικότερα σε ορεινές περιοχές νότια του Ολύμπου, στην Ευρυτανία, τον Ταΰγετο, το Πεττούλι, την Πάρνηθα και άλλες περιοχές. Το Μέλι Ελάτης Μαινάλου Βανίλια, αποτελεί ποικιλία του μελιού αυτού και είναι το μοναδικό μέχρι σήμερα ελληνικό μέλι με Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης (ΠΟΠ). Παράγεται από τα ελληνικά μαύρα έλατα του όρους Μαινάλου στην Αρκαδία. Το μέλι αυτό προέρχεται από μελίτωμα που παράγει ένα μυζητικό έντομο (*Physokermes hemicryphus*) στον κορμό του μαύρου έλατου.

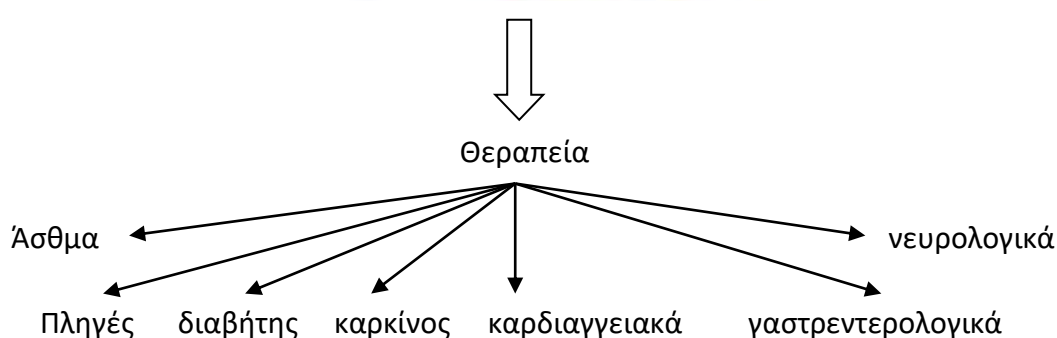
1.4.2.3 Μέλι βελανιδιάς (*Quercus macrolepis*)

Δασικό δέντρο με εξάπλωση σε όλη την ορεινή χώρα και ενδιαφέρον από μελισσοκομική πλευρά. Κατά το μήνα Ιούλιο, δίνει μελιτώδεις εκκρίσεις. Το μέλι βελανιδιάς ή «δέντρου», όπως λέγεται από τους μελισσοκόμους έχει σκοτεινό χρώμα, γεύση ευχάριστη και κρυσταλλώνει δύσκολα. Το μέλι βελανιδιάς είναι ένα από τα πιο πλούσια μέλια σε ιχνοστοιχεία (Θρασυβούλου, 2002).

1.5 Οι ευεργετικές δράσεις του μελιού στον άνθρωπο

Το μέλι μπορεί να ασκεί διάφορες ευεργετικές για την υγεία επιδράσεις, συμπεριλαμβανομένων των αντιοξειδωτικών, των αντιφλεγμονωδών, των αντιβακτηριακών, των αντιδιαβητικών, των αναπνευστικών, των γαστρεντερικών,

των καρδιαγγειακών και των νευρολογικών επιδράσεων. Παρακάτω περιγράφονται κάποιες από αυτές τις επιδράσεις του.



Επούλωση πληγών

Η επούλωση τραυμάτων μπορεί να επηρεαστεί από ενδογενείς (παθοφυσιολογικούς) και εξωγενείς (μικροοργανισμούς) παράγοντες. Ο κίνδυνος μόλυνσης από τραύματα αυξάνεται καθώς οι συνθήκες επιτρέπουν την εισχώρηση των βακτηρίων και την ανάπτυξη τους (Abeshu and Gelata, 2016). Το μέλι, χάρη στις αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές του δράσεις, την ενισχυτική του επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα, τον διεγερτικό του ρόλο στην αναγέννηση των πληγών, συμβάλλει σημαντικά στις διαδικασίες επούλωσης των πληγών (Oryan et al., 2016). Έτσι, προκαλεί την απελευθέρωση των κυτταροκινών από τα λευκοκύτταρα, με αποτέλεσμα την έναρξη της αποκατάστασης των ιστών (Yaghoobi et al., 2013). Πολλές έρευνες υποδεικνύουν τη χρήση του μελιού στον έλεγχο και τη θεραπεία οξέων πληγών, για ελαφρά έως μέτρια εγκαύματα επιφανειακού και μερικού πάχους (Samarghandian et al., 2017). Σύμφωνα με κλινική δοκιμή που διεξήχθη από τον Lund-Nielsen και τους συνεργάτες του σε

εβδομήντα πέντε ασθενείς με καρκίνο προχωρημένου σταδίου και κακοήθη τραύματα, η εφαρμογή επικάλυψης με μέλι μείωσε το μέγεθος του τραύματος για το 62% των ασθενών και βελτίωσε τη καθαρότητα του τραύματος για το 58% των ασθενών (Abeshu and Gelata, 2016).

Διαβήτης

Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις που υποδεικνύουν τις ευεργετικές επιδράσεις του μελιού στη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη. Στους διαβητικούς ασθενείς, το μέλι μπορεί να προκαλέσει σημαντική μείωση στα επίπεδα της γλυκόζης στο πλάσμα έναντι της δεξτράνης (Samarghandian et al., 2017). Μελέτη που έγινε από τον Al-Waili σε υγιείς, διαβητικούς και ασθενείς με υπερτριγλυκεριδαιμία έδειξε ελπιδοφόρα αποτελέσματα, όταν χρησιμοποιήθηκε το μέλι στη διατροφή τους, σε σύγκριση με τη δεξτρόζη και τη σακχαρόζη. Έτσι, βελτιώθηκε το προφίλ των λιπιδίων, μειώθηκε η φυσιολογική και η αυξημένη C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, όπως επίσης, η τιμή της ομοκυστεΐνης και της τριακυλγλυκερόλης σε ασθενείς με υπερτριγλυκεριδαιμία. Σε διαβητικούς ασθενείς, το μέλι σε σύγκριση με τη δεξτρόζη προκάλεσε σημαντικά χαμηλότερη αύξηση του επιπέδου γλυκόζης στο πλάσμα. Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι υπάρχουν επιτυχείς θεραπείες με τη χρήση του μελιού και σε διαβητικά τραύματα. Η εφαρμογή του μελιού μειώνει τον πόνο και το μέγεθος του έλκους του τραύματος και την απόσμηση του τραύματος καθώς και τον χρόνο επούλωσης και είναι ασφαλές χωρίς την εμφάνιση παρενεργειών (Bobis et al., 2018).

Καρκίνος

Οι τρέχουσες μελέτες δείχνουν ότι το μέλι μπορεί να ασκεί αντικαρκινικές επιδράσεις μέσω διαφόρων μηχανισμών. Οι έρευνες έδειξαν ότι το μέλι έχει αντικαρκινικές ιδιότητες μέσω της παρεμβολής του σε πολλαπλά μονοπάτια της κυτταρικής σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένης της επαγωγής απόπτωσης, της αντιπολλαπλασιαστικής και της αντιφλεγμονώδους οδού. Το μέλι έχει αναφερθεί ότι αποτρέπει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την επαγωγή απόπτωσης, τροποποιεί την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και προκαλεί αποπόλωση των μιτοχονδριακών μεμβρανών σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως τα καρκινικά

κύτταρα του δέρματος (μελάνωμα), τα επιθηλιακά κύτταρα του αδενοκαρκινώματος, τα καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας, τα καρκινικά κύτταρα του ενδομητρίου, τα κύτταρα καρκίνου του ήπατος, τα κύτταρα καρκίνου του παχέος εντέρου.

Άσθμα

Έχει παρουσιαστεί η ικανότητα του μελιού να δρα στη μείωση των συμπτωμάτων που σχετίζονται με το άσθμα ή ως προληπτικός παράγοντας για την αποτροπή της πρόκλησης άσθματος. Επιπλέον, μια μελέτη που έγινε από τον Kamaruzaman και τους συνεργάτες του, έδειξε ότι η θεραπεία με μέλι αναστέλλει αποτελεσματικά την φλεγμονή του αεραγωγού που προκαλείται από την ωαλβουμίνη με τη μείωση των ιστοπαθολογικών αλλαγών στον αεραγωγό που σχετίζονται με το άσθμα και επίσης ανέστειλε την πρόκληση άσθματος. Η εισπνοή μελιού ανακαλύφθηκε επίσης για την αποτελεσματική απομάκρυνση της υπερπλασίας των κυψελιδικών κυττάρων που εκκρίνουν βλέννα (Samarghandian et al., 2017).

Γαστρεντερολογικές επιδράσεις

Έχουν γίνει αναφορές στις επιδράσεις του μελιού στην πρόληψη και τη θεραπεία γαστρεντερικών διαταραχών όπως πεπτικά έλκη, γαστρίτιδες και γαστρεντερίτιδες (Abeshu and Geleta, 2016). Μελέτες *in vitro* προτείνουν ότι το μέλι ασκεί βακτηριοκτόνο δράση έναντι του *Helicobacter pylori*, βακτήριο που αποικίζει τον ανώτερο γαστρεντερικό σωλήνα και πιο συγκεκριμένα το στομάχι (Samarghandian et al., 2017).

1.6 Το μέλι ως αντιμικροβιακός παράγοντας

Από το 1892, το μέλι έχει περιγραφεί ως ένα τρόφιμο με αντιβακτηριακή δράση (Kwakman and Zaat, 2012). Σήμερα, επειδή υπάρχουν πολλά μικροβιακά στελέχη ανθεκτικά στα αντιβιοτικά, οι πιθανές χρήσεις του μελιού ως αντιβακτηριακού παράγοντα αυξάνονται, τόσο για τη χρήση του σαν συντηρητικό σε άλλα τρόφιμα όσο και για τη χρήση του σε ιατρικές εφαρμογές. Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού εξαρτάται από τη βοτανική προέλευση, τον μεταβολισμό των μελισσών και

τις περιβαλλοντικές και κλιματικές συνθήκες, οι οποίες έχουν ισχυρή επίδραση στις φυσικές και χημικές ιδιότητες αυτού του τροφίμου (De Melo et al., 2017).

Το περιβάλλον του προϊόντος, η υψηλή οσμωτική πίεση (υψηλή συγκέντρωση σακχάρων) και η υψηλή οξύτητα (χαμηλή τιμή του pH) εμποδίζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Kwakman et al., 2010). Ως συνέπεια, μόνο μερικές ομάδες βακτηρίων και μυκήτων υπάρχουν μέσα στο περιβάλλον του μελιού και ο πληθυσμός των μικροοργανισμών είναι σταθερός κατά την αποθήκευση. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι μερικά από τα βακτήρια που υπάρχουν στο μέλι παράγουν αντιμικροβιακούς παράγοντες, όπως οι βακτηριοσίνες, που μπορούν να προστατεύσουν το προϊόν από την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών και να είναι ευεργετικό για την υγεία των καταναλωτών (Lee et al., 2008).

Το μέλι είναι υγροσκοπικό, που σημαίνει ότι προσλαμβάνει υγρασία από το περιβάλλον και έτσι αφυδατώνει τα βακτήρια. Η περιεκτικότητά του σε σάκχαρα είναι αρκετά υψηλή για να εμποδίσει την ανάπτυξη μικροβίων, αλλά αυτό από μόνο του δεν είναι ο μόνος λόγος για τις αντιβακτηριακές ιδιότητες του μελιού (Simon et al., 2009).

Μελέτες μέχρι σήμερα έχουν δείξει ότι τα Gram-αρνητικά βακτήρια είναι λιγότερο ευαίσθητα στη δραστηριότητα του μελιού σε σύγκριση με τα θετικά κατά Gram βακτήρια (Szweda, 2017; Escuredo et al., 2012; Bueno-Costa et al., 2016). Οι αντιμικροβιακές επιδράσεις μπορεί να είναι βακτηριοστατικές ή βακτηριοκτόνες ανάλογα με τη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται (Abeshu and Geleta, 2016). Έρευνες έχουν δείξει την *in vitro* αποτελεσματικότητα του μελιού έναντι βακτηρίων που μολύνουν πληγές συμπεριλαμβανομένου της *Escherichia coli*, του *Staphylococcus aureus* και της *Salmonella enterica* Ser. *Typhimurium* (Mundo et al., 2004). Στον Πίνακα 1, αναφέρονται κάποια από τα βακτήρια που είναι ευαίσθητα στο μέλι.

Πίνακας 1. Λίστα βακτηρίων που έχουν βρεθεί ευαίσθητα ως προς το μέλι. (Bogdanov et al., 2008).

<i>Actinomyces pyogenes</i>	<i>Salmonella typhi</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Corynebacterium diphtheria</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Epidermophyton floccosum</i>	<i>Shigella sp.</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Haemophilus influenza</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptococcus Uberis</i>
<i>Microsporum canis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Microsporum gypseum</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Streptococcus pneumonia</i>
<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Proteus sp.</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Trichophyton tonsurans</i>
<i>Salmonella sp.</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes var.</i>
<i>Salmonella cholerae-suis</i>	<i>Vibrio cholerae</i>

Εκτός από τη αντιβακτηριακή του δράση, οι Maddocks και Jenkins έδειξαν ότι το μέλι έχει αντιφλεγμονώδη δράση έναντι των μικροοργανισμών, μειώνοντας την ικανότητά τους να αποκτούν σίδηρο από τον ξενιστή τους, βοηθώντας έτσι στη μείωση εμφάνισης λοιμώξεων. Εκτός από την αντιβακτηριακή δραστηριότητα, έχει περιγραφεί και η αντιμικροβιακή δράση του μελιού κατά των μυκήτων, των ζυμών, ορισμένων ιών και παρασίτων (De Melo et al., 2017).

Παράγοντες αντιβακτηριακής δράσης

Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού είναι εξαιρετικά πολύπλοκη και δεν παραμένει πλήρως αναγνωρισμένη. Μέχρι σήμερα, έχει διαπιστωθεί ότι διάφορα συστατικά αυτού του προϊόντος διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για τις αντιμικροβιακές

ιδιότητές του. Παρακάτω αναφέρονται οι κύριοι παράγοντες που συμβάλλουν στην αντιμικροβιακή του δράση.

Υψηλή συγκέντρωση σακχάρων

Η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων (περίπου 80% του βάρους αυτού του προϊόντος) εξαλείφει τους μικροοργανισμούς, κυρίως τα βακτήρια που είναι ευαίσθητα σε υψηλή οσμωτική πίεση και αναστέλλει την ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών (Szweda, 2017). Ωστόσο, εάν προετοιμαστεί ένα διάλυμα σακχάρου με τα ίδια σάκχαρα και pH με αυτά του μελιού, η αντιμικροβιακή δράση του διαλύματος ζάχαρης είναι συχνά σημαντικά χαμηλότερη από αυτή του μελιού, γεγονός που υποδηλώνει ότι και άλλοι παράγοντες είναι υπεύθυνοι για την αντιμικροβιακή δράση του μελιού (McLoone et al., 2016).

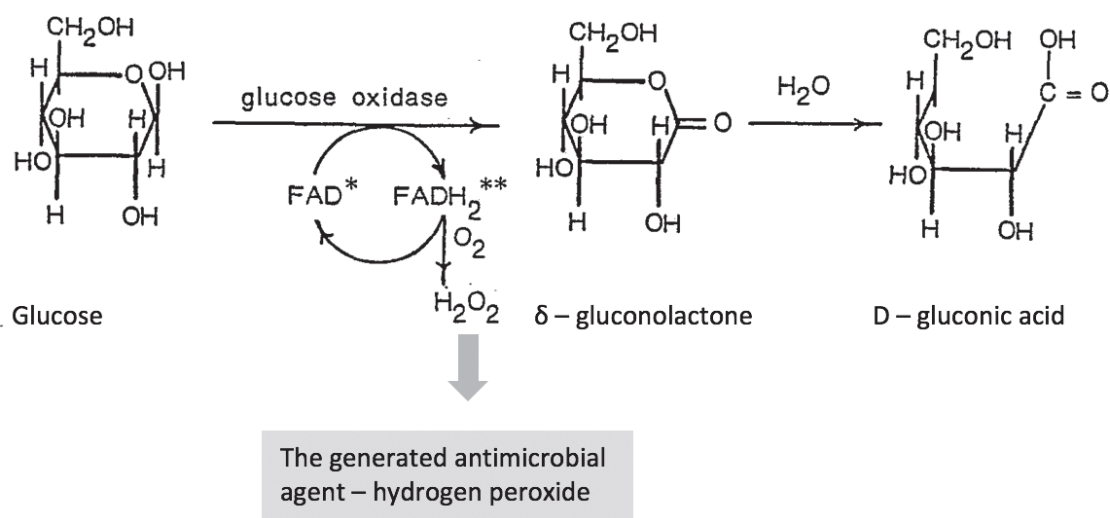
Χαμηλή τιμή pH

Η χαμηλή τιμή pH και η υψηλή συγκέντρωση των οργανικών οξέων (π.χ., γλυκονικού οξέος). Το pH των περισσότερων τύπων μελιού κυμαίνεται από 3.4 έως 6.1, πράγμα που σε συνδυασμό με την υψηλή οσμωτική πίεση εξαλείφει ή αναστέλλει την ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών.

Υπεροξείδιο του υδρογόνου

Το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης καταλύει την οξείδωση της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ (Εικόνα 10). Το παραπροϊόν της αντίδρασης αυτής, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), είναι ένας ισχυρός αντιμικροβιακός παράγοντας. Το ένζυμο παράγεται στους σιελογόνους αδένες των μελισσών και εισάγεται στο νέκταρ και προστατεύει το μέλι ωριμάνσεως από την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών. Είναι ενδιαφέρον ότι το ένζυμο αυτό βρίσκεται στο ώριμο μέλι χωρίς να είναι ενεργό. Όταν το μέλι αραιώνεται, το ένζυμο ανακτά τη δραστηριότητά του, η οποία είναι εξαιρετικά σημαντική για τις μέλισσες και ιδιαίτερα για την υγεία των νυμφών τους. Η παραγωγή του είναι εξίσου ζωτικής σημασίας για το αντιμικροβιακό δυναμικό του μελιού που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία λοιμώξεων του δέρματος και των μαλακών μορίων, των μολυσμένων πληγών ή της εξάλειψης παθογόνων

βακτηρίων που βρίσκονται στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα ή του *Helicobacter pylori* που βρίσκεται στο ανθρώπινο στομάχι (Szweda, 2017).



Εικόνα 10. Οξειδωση της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ (Szweda, 2017).

Όταν προσθέτοντας καταλάση, το υπεροξειδίου του υδρογόνου απομακρύνεται, μερικά μέλια εξακολουθούν να εμφανίζουν σημαντική αντιβακτηριακή δράση, η οποία αναφέρεται ως μη υπεροξειδική αντιβακτηριακή δράση. Οι μη υπεροξειδικοί παράγοντες των μελιών είναι η λυσοζύμη, τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή. (Alvarez-Suarez et al., 2010). Η καταλάση είναι ένζυμο το οποίο επιταχύνει την αντίδραση διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Έτσι, τα δυο αυτά ένζυμα, η οξειδάση της γλυκόζης (η οποία παράγει το H_2O_2) και η καταλάση (η οποία διασπά το H_2O_2) καθορίζουν τα επίπεδα του H_2O_2 στο μέλι (Weston, 2000). Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις του H_2O_2 σε διαφορετικά μέλια έχουν ως αποτέλεσμα τις διαφορές στην αντιμικροβιακή δράση των μελιών (White et al., 1963; Molan, 1992). Ακόμα, η συνολική συγκέντρωση της καταλάσης εξαρτάται από την ποσότητα των κόκκων γύρης στο μέλι (Weston, 2000), και κατά συνέπεια, τα επίπεδα υπεροξειδίου του υδρογόνου σε διάφορα μέλια μπορεί να διαφέρουν σημαντικά (Brudzynski et al., 2011).

Άλλα συστατικά

Επιπροσθέτως, συστατικά του μελιού, όπως αρωματικά οξέα ή φαινολικές ενώσεις, οι πρωτεΐνες, τα ολιγοπεπτίδια (Mundo et al., 2004) και η μεθυλγλυοξάλη MGO (Mavric et al., 2008), μπορούν να συνεισφέρουν στην αντιβακτηριακή του δράση. Η μεθυλγλυοξάλη είναι υπεύθυνη για τη μη υπεροξειδική αντιβακτηριακή δράση του μελιού Manuka.

Τέλος, υπάρχει μια πρωτεΐνη, η bee-defensin-1, η οποία εκκρίνεται από τους υποφαρυγγικούς αδένες της μέλισσας και μπορεί να εισέλθει στο μέλι μέσω του σάλιου της μέλισσας κατά τη διάρκεια παραγωγής του μελιού. Το αντιμικροβιακό πεπτίδιο bee defensin-1 έχει ισχυρή δραστηριότητα έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων συμπεριλαμβανομένων των *B. Subtilis*, *S. aureus* και *Paenibacillus larvae* (McLoone et al., 2016; Kwakman and Zaat, 2012).

1.7 Το Μέλι Manuka

Το μέλι Manuka παράγεται από το νέκταρ του *Leptospermum scoparium* της οικογένειας *Myrtaceae*, το οποίο αναπτύσσεται ως θάμνος ή μικρό δέντρο σε όλη τη Νέα Ζηλανδία και την ανατολική Αυστραλία. Έχει χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό μολύνσεων, συμπεριλαμβανομένων αποστημάτων, χειρουργικών πληγών, εγκαυμάτων και ελκών (Carnwath et al., 2014). Περίπου 10.000-12.000 τόνοι μελιού παράγονται κάθε χρόνο στη Νέα Ζηλανδία, από τα οποία 6000-8000 τόνοι που είναι διαθέσιμοι για εξαγωγή, είναι κυρίως μέλι Manuka (Rogers et al., 2014).



Εικόνα 11. *Leptospermum scoparium*

Το μέλι που προέρχεται από το δέντρο Manuka παρουσιάζει αντιβακτηριακή δράση που δεν σχετίζεται με τη περιεκτικότητα του σε υπεροξειδίο του υδρογόνου, η οποία είναι υπεύθυνη για την αντιβακτηριακή δράση άλλων μελιών. Η αντιβακτηριακή του δράση οφείλεται στη παρουσία της μεθυλγλυοξάλης (MGO) που περιέχει. Η διωδροξυακετόνη (DHA), που υπάρχει στο νέκταρ των λουλουδιών Manuka, είναι ο άμεσος πρόδρομος της μεθυλγλυοξάλης στο μέλι Manuka, το οποίο είναι το μείζον βακτηριοκτόνο που συμβάλλει στις πρόσθετες βιοδραστικές ιδιότητες του (Adams et al., 2008). Δεν είναι γνωστό πώς σχηματίζεται η DHA στο νέκταρ και γιατί υπάρχει σε τόσο μεγάλες ποσότητες στο νέκταρ συγκεκριμένα των δέντρων Manuka.

Αυτή η μη υπεροξειδική ιδιότητα του μελιού Manuka έχει ταξινομηθεί ως Unique Manuka Factor (UMF) και προσδιορίζεται σε σύγκριση με μια τυπική συγκέντρωση φαινόλης, καθώς παρουσιάζει μια γραμμική συσχέτιση με την αποτελεσματικότητα της φαινόλης (Snow and Manley-Harris, 2004). Η μονάδα μέτρησης UMF κατηγοριοποιεί το μέλι με βάση την αντιβακτηριδιακή του δύναμη και κυμαίνεται από το UMF5 και πάνω. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή UMF, τόσο μεγαλύτερη είναι η παρουσία των μοναδικών χαρακτηριστικών του μελιού Manuka (<http://www.manukahoney.com/>). Το μέλι Manuka για κλινική χρήση πρέπει να έχει βαθμολογία UMF τουλάχιστον 10 για να εγγυηθεί την αντιμικροβιακή του δράση (Maddocks and Jenkins, 2013).

Το μέλι Manuka έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση έναντι διαφόρων παθογόνων βακτηρίων όπως ο *Staphylococcus aureus* και το *Helicobacter pylori*, καθιστώντας το ένα υποσχόμενο λειτουργικό τρόφιμο για την επούλωση πληγών και τη θεραπεία για το έλκος στομάχου (Atrott and Henle, 2009).

Μια μελέτη που έγινε σε 63 ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, έδειξε ότι οι ασθενείς που χρησιμοποίησαν επιθέματα του μελιού Manuka, είχαν πιο γρήγορη επούλωση των πληγών τους σε σχέση με τους ασθενείς που χρησιμοποίησαν συμβατικά επιθέματα (Καμαράτος και συν., 2012).

Επίσης, υπάρχουν πολλές μελέτες που τεκμηριώνουν την αντιβακτηριακή δράση του Manuka ενάντια σε κλινικά σημαντικά βακτήρια, όπως: το ανθεκτικό στη μεθικυλλίνη

S. aureus, τη *Pseudomonas aeruginosa*, τη *Burkholderia Cepacia* ή στοματικά βακτήρια που προκαλούν τερηδόνα (Anthimidou and Mossialos, 2012) και άλλα παθογόνα βακτήρια, όπως η *Escherichia coli*, το *Enterobacter aerogenes* και η *Salmonella typhimurium* (Mandal and Mandal, 2011). Στον Πίνακα 2, αναφέρονται κάποια Gram αρνητικά και Gram θετικά βακτήρια τα οποία είναι ευαίσθητα στο μέλι Manuka.

Επιπλέον, το μέλι Manuka διασπά τα εξωκυττάρια συσσωματώματα και εμποδίζει το σχηματισμό βιοφίλμ από ένα ευρύ φάσμα παθογόνων, συμπεριλαμβανομένων των ειδών *Streptococcus* και *Staphylococcus*, τη *Pseudomonas aeruginosa*, την *Escherichia coli*, το *Proteus mirabilis*, το *Enterobacter cloacae*, το *Acinetobacter baumannii* και τη *Klebsiella pneumoniae* (Carter et al., 2016).

Πίνακας 2. Κατάλογος μικροοργανισμών που έχουν βρεθεί ότι είναι ευαίσθητοι στο μέλι Manuka (Alvarez-Suarez et al., 2014).

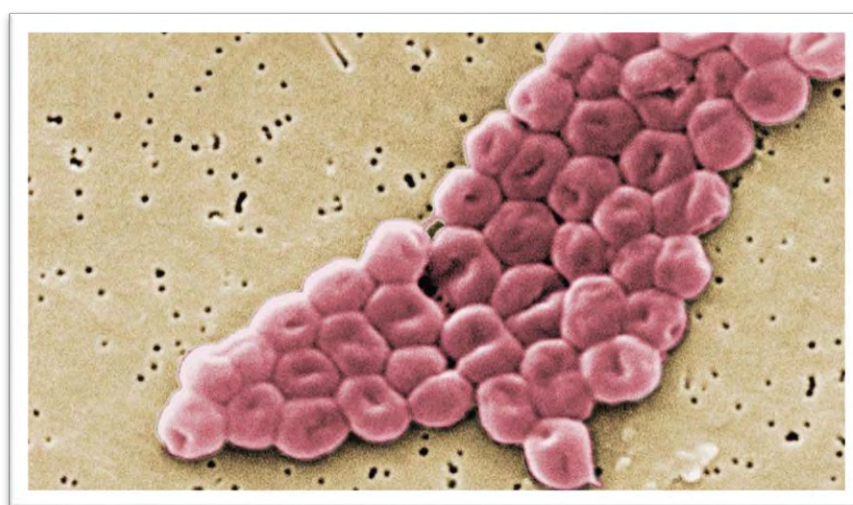
Gram θετικά	Gram αρνητικά
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Coagulase negative staphylococci</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)</i>	<i>Salmonella enterica serovar typhi</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Coagulase-negative Staphylococcus aureus (CONS)</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Hemolytic streptococci</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Streptococcus sobrinus</i>	<i>Salmonella typhi</i>
<i>Actinomyces viscosus</i>	<i>Klebsiella pneumonia</i>
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	<i>Burkholderia cepacia</i>
	<i>Helicobacter pylori</i>
	<i>Campylobacter spp.</i>
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>

1.8 Βακτηριακά είδη

1.8.1 *Acinetobacter baumannii*

Το *A. baumannii* είναι ένα αερόβιο, μη κινητό, Gram αρνητικό κοκκοβακτηρίδιο. Είναι ευκαιριακό παθογόνο βακτήριο και η μορφολογία του ποικίλει ανάλογα με τη φάση της κυτταρικής του ανάπτυξης και την έκθεση του σε αντιμικροβιακούς παράγοντες. Απαντάται στο έδαφος, στο νερό, στα ζώα και βρίσκεται παντού στη φύση (Paterson, 2006). Μπορεί να αναπτυχθεί σε διάφορες θερμοκρασίες και pH και σε ποικιλία υποστρωμάτων. Το βακτήριο μπορεί να επιβιώσει για μεγάλες περιόδους σε ξηρές και υγρές επιφάνειες (Montefour et al., 2008).

Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από το *A. baumannii* συνδέονται με καταστροφικές επιπτώσεις από άποψη νοσηρότητας και θνησιμότητας και συμβάλλουν σε υψηλό κόστος νοσηλείας. Μεταξύ των ασθενών με βακτηριαιμία που προκαλείται από το *A. baumannii*, η συνολική θνησιμότητα μπορεί να υπερβεί το 50% (Chopra et al., 2013).



Εικόνα 12. *Acinetobacter baumannii*

Αποτελεί αίτιο νοσοκομειακών λοιμώξεων και μπορεί να αναπτυχθεί σε ποικίλα περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένων των εντατικών μονάδων φροντίδας. Οι ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς είναι ευάλωτοι στη λοίμωξη του, ακόμη και κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Εισέρχεται στο σώμα μέσω των υγρών των ιστών και

μπορεί να αποικίσει σε διάφορες θέσεις, όπως: η αναπνευστική οδός, το κεντρικό νευρικό σύστημα, το δέρμα και τα μάτια. Πνευμονία, λοιμώξεις του αίματος και μηνιγγίτιδα είναι τα συχνότερα ανεπιθύμητα αποτελέσματα της μόλυνσης (Qin et al., 2018).

Η επικράτησή του σε νοσοκομειακά κρούσματα και σε λοιμώξεις που σχετίζονται με τις συσκευές, έχει αποδοθεί στην ικανότητά του να σχηματίζει βιοφίλμ σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα και σε ιατρικές συσκευές, αντίστοιχα. Η ικανότητα παραγωγής βιοφίλμ αποτελεί πλεονέκτημα για τον αποικισμό του σε διαφορετικά περιβάλλοντα προκαλώντας επίμονες λοιμώξεις. Μία μελέτη ανέφερε ότι ο σχηματισμός βιοφίλμ παρατηρήθηκε στο 95% των δειγμάτων που λήφθηκαν από ασθενείς που αεριζόταν μηχανικά για περισσότερο από 24 ώρες, ενώ το *A. baumannii* ήταν από τα πιο συχνά απομονωμένα βακτηριακά είδη (Wang et al., 2018).

Το *A. baumannii* είναι σημαντικά λιγότερο διαπερατό από τις βιοκτόνες ουσίες και ευδοκιμεί παρουσία αιθανόλης. Έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να επιβιώσει στο νοσοκομειακό περιβάλλον για έως και 13 ημέρες. Είναι σημαντικό ότι σπάνια βρίσκεται έξω από το περιβάλλον της υγειονομικής περίθαλψης και παρουσιάζει χαμηλό συντελεστή ανθρώπινου μεταφορέα.

Σε παγκόσμιο επίπεδο, ο αυξανόμενος αριθμός και η σοβαρότητα των εκδηλώσεων που εμφανίζονται από το *A. baumannii* έχει συμβεί σε διάφορα περιβάλλοντα, όπως νοσοκομεία, εγκαταστάσεις μακροχρόνιας φροντίδας, στρατιωτικές βάσεις και εντός της κοινότητας. Η ικανότητα του να επιμένει σε δύσκολες περιβαλλοντικές συνθήκες σε συνδυασμό με την ανησυχητικά ταχύτατη εμφάνιση ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά τοποθετεί αυτόν τον παθογόνο παράγοντα ως ένα από τα έξι πιο ανησυχητικά παθογόνα που σχετίζονται με την υγειονομική περίθαλψη (Fleming et al., 2018).

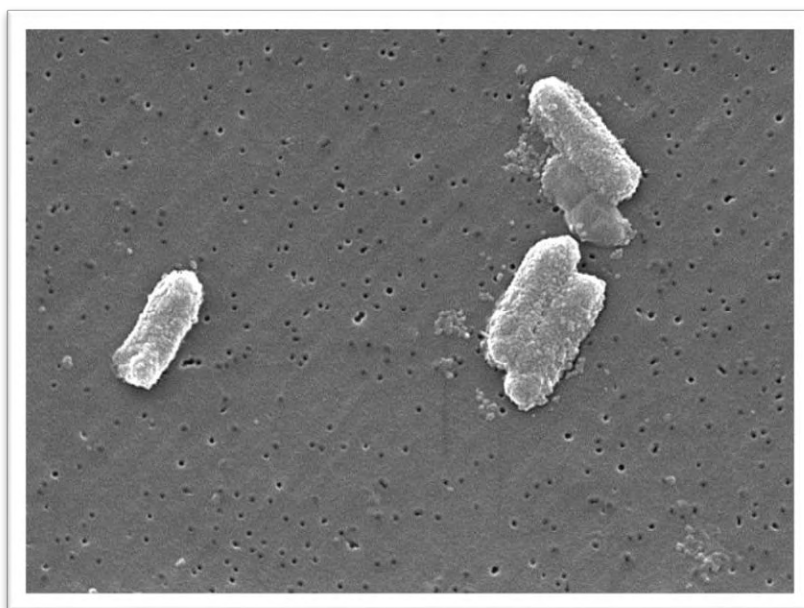
Το φαινόμενο των παθογόνων που είναι πολυανθεκτικά στα αντιβιοτικά Multi Drug Resistant (MDR) έχει γίνει ολοένα και περισσότερο αιτία σοβαρής ανησυχίας όσον αφορά τις νοσοκομειακές λοιμώξεις. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας αναγνώρισε

την αντιμικροβιακή αντοχή ως ένα από τα τρία πιο σοβαρά προβλήματα που αντιμετωπίζει η ανθρώπινη υγεία. Τα πιο κοινά και σοβαρά παθογόνα MDR έχουν περιληφθεί στο ακρωνύμιο "ESKAPE" και είναι ο *Enterococcus faecium*, ο *Staphylococcus aureus*, η *Klebsiella pneumoniae*, το *Acinetobacter baumannii*, η *Pseudomonas aeruginosa* και το *Enterobacter spp.* (Howard et al., 2012).

Η ταχεία παγκόσμια εμφάνιση στελεχών του *A. Baumannii* που είναι ανθεκτικά στις λακτάμες, συμπεριλαμβανομένων και των καρβαπενεμών, καταδεικνύει τη δυνατότητα αυτού του οργανισμού να ανταποκρίνεται γρήγορα στις αλλαγές (Peleg et al., 2008).

1.8.2. *Citrobacter freundii*

Το *C. freundii* είναι ένα Gram αρνητικό αερόβιο, ραβδόμορφο βακτήριο μήκους 1-5 μm και ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Ταυτοποιήθηκε πρώτη φορά το 1932 και από τότε έχει αναφερθεί ότι προκαλεί μολύνσεις σε ηλικιωμένους, ανοσοκατασταλμένους και εξασθενημένους ασθενείς. Τα περισσότερα κύτταρα του *C. freundii* περιβάλλονται από πολλά μαστίγια που χρησιμοποιούνται για να κινηθούν, αλλά μερικά δεν είναι κινητά. Απαντάται στο νερό, το έδαφος και τα τρόφιμα (Wang et al., 2001).



Εικόνα 13. *Citrobacter freundii*

Το *C. freundii* είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο που μπορεί να αποικίσει τον εντερικό σωλήνα ανθρώπων και ζώων και έχει συσχετιστεί με ένα ευρύ φάσμα λοιμώξεων που εμπλέκουν το γαστρεντερολογικό, το ουροποιητικό και το αναπνευστικό σύστημα. Έχει συσχετιστεί με νοσοκομειακές λοιμώξεις του ουροποιητικού, του χοληφόρου, γαστρίτιδας, μηνιγγίτιδας, αποστήματα εγκεφάλου και νεοπλασματικής σήψης (Rezaei et al., 2016). Αντιπροσωπεύει περίπου το 29% όλων των ευκαιριακών λοιμώξεων οι οποίες προκαλούν ανησυχία για τη δημόσια υγεία και απαιτούνται εναλλακτικές λύσεις ή συμπληρώματα αντιβιοτικής αγωγής.

Ως εκ τούτου, ένας από τους κύριους λόγους που γίνεται αλληλούχηση του γονιδιώματος πολλών διαφορετικών στελεχών του *C. freundii* είναι η εύρεση αντιβιοτικών που μπορούν να καταπολεμήσουν αυτές τις ευκαιριακές λοιμώξεις. Όμως, με τη χρήση αντιβιοτικών ευρέος φάσματος, το *C. freundii* έχει γίνει όλο και περισσότερο ανθεκτικό σε αντιμικροβιακούς παράγοντες (Wang et al., 2001). Το *C. freundii* είναι συνήθως ευαίσθητο στις αμινογλυκοσίδες, τις φθοριοκινολόνες και τη χλωραμφενικόλη. Η ευαισθησία του στην αμπικιλίνη, την τετρακυκλίνη και τις κεφαλοσπορίνες ποικίλλει (Greenwood et al., 2011).

1.8.3. *Klebsiella pneumoniae*

Η *K. pneumoniae* περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Carl Friedlander το 1882 ως ένα βακτήριο που απομονώθηκε από τους πνεύμονες ασθενών που είχαν πεθάνει από πνευμονία (Martin and Bachman, 2018). Είναι ένα Gram αρνητικό, ραβδόμορφο βακτήριο, προαιρετικά αναερόβιο, της οικογένειας *Enterobacteriaceae*. Στερείται βλεφαρίδων και είναι ακίνητο. Διαθέτει μια κάψα από πολυσακχαρίτες που είναι σημαντική για την παθογένεια της και την ικανότητά της να αποφεύγει τη φαγοκυττάρωση (Cortés et al., 2002).



Εικόνα 14. *Klebsiella pneumoniae*

Δύο σημαντικοί παράγοντες είναι απαραίτητοι για τη λοιμογόνο δράση της, ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) και ο πολυσακχαρίτης της κάψας (CPS). Ο LPS αποτελείται από το λιπίδιο A, τον πυρήνα και τον Ο-πολυσακχαρίτη. Ο CPS είναι το εξωτερικό στρώμα αυτού του παθογόνου παράγοντα και εμπλέκεται κυρίως στην αντοχή στη φαγοκυττάρωση από πολυμορφοπύρηνα κύτταρα ενεργώντας ως φυσικό φράγμα. Έτσι, και τα δύο συστατικά είναι κρίσιμα για τον μικροοργανισμό να μπορεί να εξαπλωθεί μέσω του αίματος και να προκαλέσει σήψη (Cortes et al., 2002).

Στους ανθρώπους, η *K. pneumoniae* αποικίζει το γαστρεντερικό σωλήνα και λιγότερο συχνά το ρινοφάρυγγα, από τον οποίο αποκτά πρόσβαση στην κυκλοφορία και σε άλλους ιστούς που προκαλούν λοίμωξη. Στην προ-αντιβιοτική εποχή, η *K. pneumoniae* ήταν μια σημαντική αιτία απόκτησης πνευμονίας, ειδικά σε αλκοολικούς και διαβητικούς. Στην εποχή των αντιβιοτικών, η *K. pneumoniae* καθιερώθηκε στα νοσοκομεία ως η κύρια αιτία των μολύνσεων που συνδέονται με την υγειονομική περίθαλψη (Piperaki et al., 2017).

Θεωρείται ως ένα ευκαιριακό παθογόνο που συνδέεται με τις λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος που έχουν αποκτηθεί από το νοσοκομείο, τη σηψαιμία, την πνευμονία και τις λοιμώξεις των μαλακών μορίων (Trivedi et al., 2015; Lee et al.,

2017). Αποτελεί το δεύτερο κατά σειρά αίτιο ουρολοιμώξεων μετά την *E. Coli* (Πόγγας και Χαρβάλου, 2008).

Η *K. pneumoniae* που είναι ανθεκτική σε πολλαπλά αντιβιοτικά (MDR) αποτελεί μία από τις αιτίες που προκαλούν τις λοιμώξεις που σχετίζονται με την υγειονομική περίθαλψη παγκοσμίως και προκαλεί σοβαρές προκλήσεις όσον αφορά τη θεραπεία καθώς εμφανίζει αυξημένη ανοχή στα αντιβιοτικά, στα χημικά απολυμαντικά και στα ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου, όπως η φαγοκυττάρωση (Mohamed et al., 2018). Η *K. pneumoniae* έχει αποκτήσει αντοχή στις κεφαλοσπορίνες ευρέος φάσματος και στις πενικιλίνες, λόγω της παραγωγής ευρέος φάσματος β-λακταμασών (ESBL) (Trivedi et al., 2015).

Επιπλέον, η *K. pneumoniae* μπορεί να προκαλέσει βακτηριαμία και μηνιγγίτιδα (Decré et al., 2011). Είναι υπεύθυνη για τα νοσοκομειακά κρούσματα παγκοσμίως, λόγω της ικανότητάς της να εξαπλώνεται γρήγορα στο νοσοκομειακό περιβάλλον, με αποτέλεσμα την υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα. Οι λοιμώξεις του βακτηρίου *Klebsiella* εμφανίζονται συνήθως σε άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα. Η συνηθέστερη λοίμωξη που προκαλείται από τη *Klebsiella* εκτός νοσοκομείου είναι πνευμονία υπό τη μορφή βρογχοπνευμονίας και βρογχίτιδας (Jagessar, 2011).

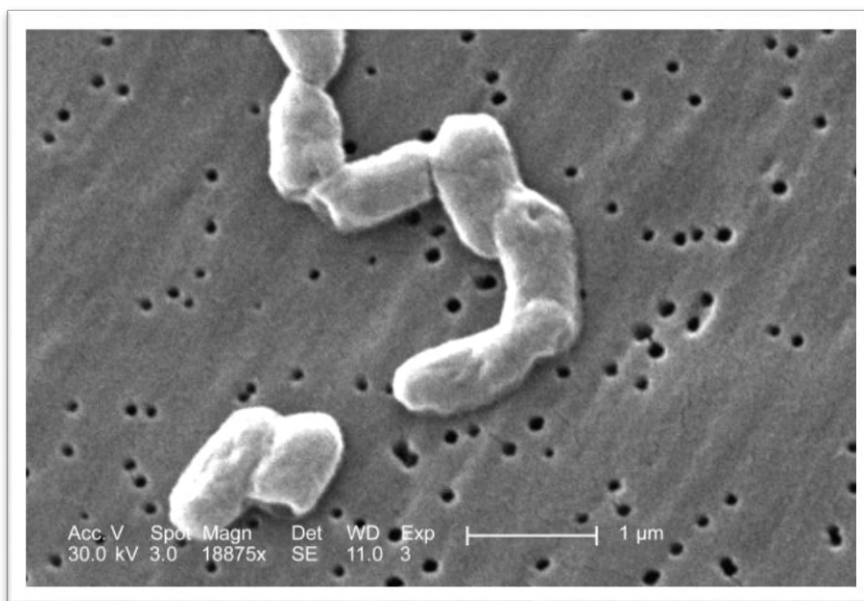
1.8.4. *Salmonella* spp.

Η *Salmonella* είναι ένα κινητό, Gram αρνητικό ραβδόμορφο βακτήριο και ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Η *Salmonella* έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία τόσο στις ανεπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες, λόγω του γεγονότος ότι είναι μία από τις πιο κοινές αιτίες ασθένειας που μεταδίδεται από τα τρόφιμα και αποτελεί κύρια αιτία των διαρροϊκών νόσων.

1.8.4.1 *Salmonella infantis*

Η παρουσία της *S. infantis* σε τρόφιμα για ανθρώπους και ζώα, καθώς και σε ζώα, την οδήγησε σε έναν από τους δέκα πιο συχνά προσδιορισμένους ορότυπους της *Salmonella* στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των

Τροφίμων δήλωσε ότι, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Ευρωπαϊκού Κέντρου Ελέγχου Ασθενειών, για το χρονικό διάστημα από το 2012 έως το 2014, η *S. infantis* ήταν ο τέταρτος συνηθέστερος ορότυπος *Salmonella* στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Επιπλέον, αποκαλύφθηκε ότι η *S. infantis* περιέχει απομονωμένα στελέχη από διαφορετικούς κλώνους που υπάρχουν όχι μόνο στα τρόφιμα, αλλά και στους ανθρώπους (Kalaba et al., 2017).



Εικόνα 15. *Salmonella infantis*

Οι περισσότερες μη τυφοειδείς λοιμώξεις από *Salmonella* έχουν ως αποτέλεσμα γαστρεντερικές διαταραχές, οι οποίες συχνά είναι απλές και δεν χρειάζονται θεραπεία, αλλά μπορούν επίσης να εμφανισθούν επεμβατικές λοιμώξεις, οι οποίες στη συνέχεια απαιτούν αντιβιοτική αγωγή, καθώς μπορεί να είναι απειλητικές για τη ζωή. Τα φάρμακα για τη θεραπεία της σαλμονέλλωσης περιλαμβάνουν την αμπικιλλίνη, την τριμεθοπρίμη-σουλφομεθοξαζόλη, τις κεφαλοσπορίνες τρίτης και τέταρτης γενιάς και τις φθοροκινολόνες.

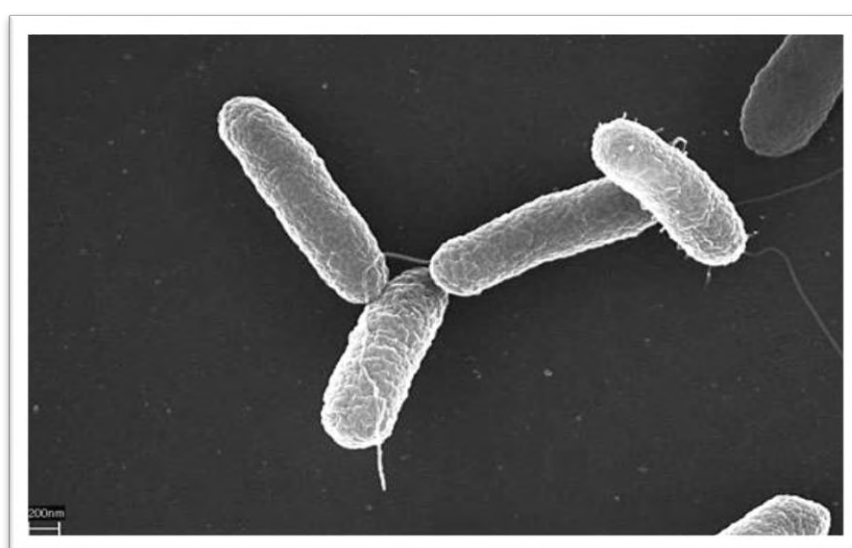
Η ανθεκτικότητα της *Salmonella* στα αντιβιοτικά έχει αυξηθεί παγκοσμίως, αλλά και στην Ελλάδα, συμπεριλαμβανομένων και των εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορινών και των κινολονών. Το Ευρωπαϊκό Κέντρο Ελέγχου Ασθενειών περιγράφει ότι, κατά τη διάρκεια του 2014, στις 27 χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης

αναφέρθηκαν υψηλά ποσοστά πολυανθεκτικών στελεχών μεταξύ αυτών και της *S. infantis*.

Από την απομόνωση της *S. infantis* από τον άνθρωπο και από προϊόντα κρεατοπαραγωγής, βρέθηκαν πολυανθεκτικά το 61,9% και το 70% αντιστοίχως, προκαλώντας ανησυχίες σχετικά με την κυκλοφορία των πολυδύναμων στελεχών μέσω της τροφικής αλυσίδας (Papadopoulos et al., 2017).

1.8.4.2 *Salmonella typhimurium*

Η *S. typhimurium* είναι ένα από τα σημαντικά παθογόνα των τροφίμων. Οι πιο συνηθισμένες λοιμώξεις από τη *S. typhimurium* είναι μέσω της κατάποσης μολυσμένου νερού ή τροφίμου (Tsen, 2000). Η μόλυνση αρχίζει με την κατάποση των μολυσμένων τροφίμων ή του νερού, έτσι ώστε να φτάσει στο εντερικό επιθήλιο και να προκαλέσει γαστρεντερική νόσο (Fabrega and Vila, 2013). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ), η *Salmonella* αποτελεί κύρια αιτία τροφικής δηλητηρίασης. Η κύρια πηγή μόλυνσης είναι τρόφιμα που προέρχονται από ζώα, κυρίως αυγά και προϊόντα αυγών. Εντούτοις, η σημασία των λαχανικών ως αιτία τροφιμογενών επιδημιών αυξάνεται και έχει αναφερθεί η παρουσία και η παραμονή της σαλμονέλας σε πολλά λαχανικά (Spricigo et al., 2013).



Εικόνα 16. *Salmonella typhimurium*

Η σαλμονέλωση σε ανθρώπους και ζώα που προκαλείται από τη *S. typhimurium* χαρακτηρίζεται από πυρετό, οξεία φλεγμονή του εντέρου και διάρροια εντός 24 ωρών μετά τη μόλυνση. Κατά την είσοδο στον εντερικό αυλό, χρησιμοποιεί τα μαστίγια για να μετακινηθεί στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, και τους κροσσούς και τις συγκολλητίνες για να προσκολληθεί στα κύτταρα (Fabrega and Vila, 2013). Η τοξικότητά της οφείλεται στην εξωτερική μεμβράνη που διαθέτει και αποτελείται κυρίως από λιποπολυσακχαρίτες (LPS) που προστατεύουν τα βακτήρια από το περιβάλλον (Gart et al., 2016).

2. Σκοπός της παρούσας εργασίας

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η αντιβακτηριακή δράση μελιών της περιοχής του Ολύμπου έναντι των βακτηριακών ειδών *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella infantis* και *Salmonella typhimurium*, καθώς και η μελέτη των μηχανισμών της αντιβακτηριακής τους ικανότητας.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Δείγματα μελιών

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μελιών που προέρχονται από την ευρύτερη περιοχή του Ολύμπου. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκαν 10 δείγματα μελιών τα οποία αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα. Κάθε δείγμα κατείχε ένα κωδικό νούμερο και πληροφορίες για τον τόπο προέλευσης και την ημερομηνία συγκομιδής τους. Έγινε συλλογή σε γυάλινα δοχεία και αποθηκεύτηκαν σε σκιερό μέρος.

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά δειγμάτων μελιών της περιοχής Ολύμπου.

A/A	ΤΥΠΟΣ	ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
5	Ανθέων	Δομένικο Ελασσόνας	Ιούλιος 2013
10	Ανθέων	Βερδικούσια Λάρισας	Ιούλιος 2013
13	Ανθέων και Καστανιάς	Άνω Λεχώνια, Βόλος	2013
14	Ανθέων και Κωνοφόρων	Δομένικο Ελασσόνας	2012
15	Ανθέων	Καρυά Ολύμπου	Ιούλιος 2014
17	Βότανα	Δρυμός Ελασσόνας	2014
18	Ακακία, Έλατο, τσάι το βουνού	Καρυά Ολύμπου	Αύγουστος 2014
19	Ανθέων και Κωνοφόρων	Άζωρο Ελασσόνας	Αύγουστος 2014
20	Ανθέων και Κωνοφόρων	Γαλανόβρυση Ελασσόνας	2014
21	Ανθέων και Κωνοφόρων	Καρυά Ολύμπου	Ιούλιος 2014

Μέλι Manuka

Είναι της εταιρίας Manuka Health New Zealand, με MGO 550+. Περιέχει τουλάχιστον 550 mg/kg μεθυλγλυοξάλη και ανήκει στη κατηγορία super high. Το μέλι Manuka χρησιμοποιήθηκε ως θετικό control για τη σύγκριση της αντιβακτηριακής δράσης των δειγμάτων που εξετάστηκαν.



Εικόνα 17. Μέλι Manuka της εταιρίας Manuka Health New Zealand με MGO 550+.

Συνθετικό μέλι

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

3.2. Μέθοδοι

Για την εκτίμηση της αντιβακτηριακής ικανότητας των μελιών, χρησιμοποιήθηκε η *in vitro* μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*Minimum Inhibitory Concentration*) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (*microtiter plates*).

Για την διάκριση τους σε αυτά με βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνο δράση χρησιμοποιήθηκε η *in vitro* μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (*Minimum Bactericidal Concentration*).

Για την εκτίμηση των μηχανισμών της αντιβακτηριακής δράσης του μελιού χρησιμοποιήθηκε η *in vitro* μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*Minimum Inhibitory Concentration*) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (*microtiter plates*)

α) με την προσθήκη καταλάσης

β) με την προσθήκη πρωτεΐνης K

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι τα εξής:

- *Acinetobacter baumannii* (1)
- *Citrobacter freundii*
- *Klebsiella pneumoniae* (1)
- *Salmonella infantis* (89)
- *Salmonella typhimurium* (91)

3.2.1 Εκτίμηση της αντιβακτηριακής ικανότητας των δειγμάτων μελιού μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*Minimum Inhibitory Concentration*) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (*microtiter plates*).

3.2.1.1 Αρχή της μεθόδου

Η *in vitro* μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) έγινε σε αποστειρωμένες μικροπλάκες (*microplates*) πολυστερίνης 96 θέσεων η καθεμία. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε αναφέρεται στη βιβλιογραφία (Patton et al., 2006; Sherlock et al., 2010).

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

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

3.2.1.2 Υλικά , θρεπτικά υποστρώματα και όργανα

- Τρυβλία petri (100mm)
- Eppendorfs (1.5 ml)
- Γυάλινα φυαλίδια (Vials)
- Αυτόματες πιπέτες
- Tips
- Κυψελίδες
- Οδοντογλυφίδες αποστειρωμένες
- Κρίκος εμβολιασμού
- Μικροπλάκες 96-θέσεων (96-wells microplates)
- Θρεπτικό υλικό Mueller Hinton broth της εταιρίας biolab που περιέχει: Peptones 19.5 g/ L, Starch soluble 1.5 g/L.
- Αναδευόμενος επωαστήρας
- Φασματοφωτόμετρο

3.2.1.3 Πειραματική διαδικασία

3.2.1.3.1. Προετοιμασία καλλιέργειας

Οι καλλιέργειες των βακτηρίων προετοιμάστηκαν χρησιμοποιώντας καλλιέργειες (glycerol stock) που διατηρούνται στους -80°C . Με μικροβιολογικό κρίκο και σε αποστειρωμένο περιβάλλον λήφθηκε μια μικρή ποσότητα βακτηρίων από την καλλιέργεια stock και μεταφέρθηκε σε vial που περιέχει 5 ml θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton broth. Τα vials τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα υπό ανάδευση (*incubator shaker*) για 16 ώρες στους 37°C στις 210 στροφές. Στη συνέχεια η καλλιέργεια αραιώθηκε μέχρι την παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος θολρότητας ίση με 0.5 McFarland (περίπου 10^8 cfu/ml). Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm έγινε σε φασματοφωτόμετρο μέχρι να επιτευχθεί τελική τιμή 0.132 που αντιστοιχεί σε 0.5 McFarland (περίπου 1.5×10^8 cfu/ml).

3.2.1.2.2 Προετοιμασία δείγματος

Στη συνέχεια για κάθε μέλι παρασκευάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις με συγκεντρώσεις 50% v/v, 25% v/v, 12.5% v/v, 6.25% v/v, 3.125% v/v, 1.56% v/v και

0.78% v/v. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για το μέλι Manuka (θετικό control). Στη πλάκα μικροτιτλοποίησης χρησιμοποιήθηκαν για κάθε δείγμα μελιού, εις τριπλούν 7 πηγαδάκια (wells) στο καθένα, στα οποία προστέθηκαν 5×10^4 CFUs καλλιέργειας και 190 μl από την κάθε αραιώση του εκάστοτε υπό εξέταση μελιού συμπεριλαμβανομένου και του Manuka. Σε μια σειρά από 7 πηγαδάκια (αρνητικό control) προστέθηκαν 5×10^4 CFUs καλλιέργειας και 190 μl Mueller Hinton Broth.

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

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δυο μετρήσεων προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση στην οποία δεν υπήρξε βακτηριακή ανάπτυξη με βάση τα εξής: Η οπτική πυκνότητα (OD) για το κάθε πηγαδάκι προκύπτει από την αφαίρεση της μέτρησης για $t=24h$ από τη μέτρηση για $t=0h$.

$$OD_{\text{testwell}} = t_{24 \text{ test}} - t_{0 \text{ test}}$$

$$OD_{\text{of corresponding control well}} = t_{24 \text{ control}} - t_{0 \text{ control}}$$

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

$$100\% \text{ Αναστολή} = 1 - (OD_{\text{testwell}} / OD_{\text{of corresponding control well}}) \times 100$$

(Patton et al., 2006) για κάθε σειρά από τη πλάκα μικροτιτλοποίησης με τα 96 πηγαδάκια.



Εικόνα 18. ELx808 Absorbance Microplate Reader

Από αυτό προέκυψαν 7 τιμές αναστολής για την κάθε αραιώση του μελιού. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν για το κάθε μέλι και για την κάθε συγκέντρωση.

Πίνακας 4. Η διαδοχική σειρά προσθήκης των αραιώσεων των μελιών.

	Αραίωση 50% 1	Αραίωση 25% 2	Αραίωση 12.5% 3	Αραίωση 6.25% 4	Αραίωση 3.125% 5	Αραίωση 1.56% 6	Αραίωση 0.78% 7
A No 19							
B No 19							
C No 19							
D Manuka	Control +	Control +	Control +	Control +	Control +	Control +	Control +
E Manuka	Control +	Control +	Control +	Control +	Control +	Control +	Control +
F Manuka	Control +	Control +	Control +	Control +	Control +	Control +	Control +
G Negative control	Control -	Control -	Control -	Control -	Control -	Control -	Control -

3.2.2 Διάκριση των δειγμάτων μελιού σε αυτά με βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνο δράση μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (*Minimum Bactericidal Concentration*).

3.2.2.1 Αρχή μεθόδου

Ως ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (*MBC*) ορίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση ενός αντιβακτηριακού παράγοντα, που απαιτείται για να θανατώσει ένα συγκεκριμένο βακτήριο. Για τη μέθοδο προσδιορισμού της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης ακολουθήθηκε η διαδικασία που αναφέρεται στη βιβλιογραφία (Szweda, 2017).

3.2.2.2 Υλικά, θρεπτικά υποστρώματα και όργανα

- Τετράγωνα τρυβλία petri (120 mm)
- Microplate replicator
- Mueller Hinton II Agar που περιέχει: Beef extract 2 g/L , Acid hydrolysate 17.5 g/L, Starch 1.5 g/L, Agar 17 g/L.
- Επωαστήρας

3.2.2.3 Πειραματική διαδικασία

Αφού έχει προηγηθεί η διαδικασία προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*MIC*), μετά την επώαση των 24 ωρών, με την εμφάνιση ενός microplate replicator μεταφέρθηκε μια μικρή ποσότητα δείγματος από όλα τα πηγαδάκια της πλάκας μικροτιτλοποίησης σε τετράγωνα τρυβλία των 120mm που περιείχαν Mueller Hinton Agar. Στη συνέχεια τα τρυβλία τοποθετήθηκαν για επώαση στους 37 °C για 24 ώρες και έπειτα παρατηρήθηκε η εμφάνιση αποικιών στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις μελιού 50% v/v, 25% v/v, 12.5% v/v, 6.25% v/v, 3.125% v/v, 1.56% v/v και 0.78% v/v. Η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία θανατώθηκαν (μη ύπαρξη αποικιών) τα βακτήρια καθορίστηκε ως *MBC*.



Εικόνα 19. Microplate replicator

3.2.3 Εκτίμηση των μηχανισμών της αντιβακτηριακής ικανότητας των μελιών μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*Minimum Inhibitory Concentration*) με την χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (microtiter plates) με την προσθήκη α) καταλάσης β) πρωτεΐνάσης K.

3.2.3.1 Αρχή της μεθόδου

Για την εκτίμηση των μηχανισμών της αντιβακτηριακής ικανότητας των μελιών χρησιμοποιήθηκε η *in vitro* μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*MIC*) σε αποστειρωμένες μικροπλάκες πολυστερίνης 96 θέσεων, η καθεμία μετά την προσθήκη α) καταλάσης, β) πρωτεΐνάσης K.

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

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

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

Οι μικροπλάκες τοποθετήθηκαν σε *microplate reader* (ELx808 Absorbance Microplate Reader, BioTek), το οποίο είναι συνδεδεμένο με έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή και έγινε η μέτρηση στα 630 nm. Η ανάλυση των οπτικών απορροφήσεων των καλλιιεργειών έγινε με το λογισμικό *Gen5™ Data Analysis Software* (Biotek).

3.2.3.2 Υλικά, θρεπτικά υποστρώματα και όργανα

- Τρυβλία petri (100mm)
- Eppendorfs (1.5 ml)
- Γυάλινα φυαλίδια (Vials)
- Αυτόματες πιπέτες
- Tips
- Κυψελίδες
- Οδοντογλυφίδες αποστειρωμένες
- Κρίκος εμβολιασμού
- Μικροπλάκες 96-θέσεων (96-wells microplates)
- Θρεπτικό υλικό Mueller Hinton broth της εταιρίας biolab που περιέχει: Peptones 19.5 g/ L, Starch soluble 1.5 g/L.
- Αναδευόμενος επωαστήρας
- Φασματοφωτόμετρο

3.2.3.3 Πειραματική διαδικασία

3.2.3.3.1 Προετοιμασία καλλιέργειας

Οι καλλιέργειες των βακτηρίων προετοιμάστηκαν χρησιμοποιώντας καλλιέργειες (glycerol stock) που διατηρούνται στους -80° C. Με μικροβιολογικό κρίκο και σε αποστειρωμένο περιβάλλον λήφθηκε μια μικρή ποσότητα βακτηρίων από την καλλιέργεια stock και μεταφέρθηκε σε vial που περιέχει 5 ml θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton broth. Τα vials τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα υπό ανάδευση (*incubator shaker*) για 16 ώρες στους 37° C στις 210 στροφές. Στη συνέχεια η καλλιέργεια αραιώθηκε μέχρι την παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος θολερότητας ίση με 0.5 McFarland (περίπου 10⁸ cfu/ml). Η μέτρηση της οπτικής

πυκνότητας (OD) στα 600 nm έγινε σε φασματοφωτόμετρο μέχρι να επιτευχθεί τελική τιμή 0.132, η οποία αντιστοιχεί σε 0.5 McFarland (περίπου 1.5×10^8 cfu/ml).

3.2.3.3.2 Προετοιμασία δείγματος

Στην μέθοδο δοκιμάστηκαν και τα δέκα μέλια στα πέντε βακτηριακά είδη στις διαδοχικές συγκεντρώσεις 50% v/v, 25% v/v, 12.5% v/v, 6.25% v/v, 3.125% v/v, 1.56% v/v και 0.78% v/v.

α) Καταλάση: Για την παρασκευή του stock καταλάσης (Kwakman et al., 2010), (33.000 U/ml) διαλύθηκαν 30mg σκόνη καταλάσης από συκώτι βοοειδούς (SERVA) σε 10 ml Phosphate buffer pH 7.4. Στη συνέχεια, σε erpendorf που περιείχε 1.5 ml μελιού αραιώσης 50% v/v (750 μl μέλι + 750 μl Muller Hinton Broth) προστέθηκαν 28 μl από το stock έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση της καταλάσης να είναι 600 U/ml. Ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση στους 37° C στις 210 στροφές για 16 ώρες και στη συνέχεια έγιναν οι υπόλοιπες 6 διαδοχικές αραιώσεις.

β) Πρωτεΐνάση K: Για την παρασκευή του stock πρωτεΐνάσης K (Mundo et al., 2004) συγκέντρωσης 10 mg/ml, 10 mg από την πρωτεΐνάση K (Blirt) σε σκόνη διαλύθηκαν σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος tris-HCl pH 8.0. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την καταλάση. Σε 1.5 ml μελιού αραιώσης 50% v/v (750 μl μέλι + 750 μl Muller Hinton Broth) προστέθηκαν 15 μl πρωτεΐνάσης K έτσι ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml. Ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση στους 37° C στις 210 στροφές για 16 ώρες και στη συνέχεια έγιναν οι υπόλοιπες 6 διαδοχικές αραιώσεις.

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

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δυο μετρήσεων προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση στην οποία δεν υπήρξε βακτηριακή ανάπτυξη με βάση τα εξής: Η οπτική πυκνότητα (OD) για το κάθε πηγαδάκι προκύπτει από την αφαίρεση της μέτρησης για $t=24h$ από τη μέτρηση για $t=0h$.

$$OD_{\text{testwell}} = t_{24 \text{ test}} - t_{0 \text{ test}}$$

$$OD_{\text{of corresponding control well}} = t_{24 \text{ control}} - t_{0 \text{ control}}$$

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

$$100\% \text{ Αναστολή} = 1 - (OD_{\text{testwell}} / OD_{\text{of corresponding control well}}) \times 100$$

(Patton et al., 2006) για κάθε σειρά από το πιατάκι με τα 96 πηγαδάκια. Από αυτό προέκυψαν 7 τιμές αναστολής για την κάθε αραιώση του μελιού. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν για το κάθε μέλι και για την κάθε συγκέντρωση.

Πίνακας 5. Διαδοχική σειρά προσθήκης αραιώσεων των μελιών

	Αραίωση 50% 1	Αραίωση 25% 2	Αραίωση 12.5% 3	Αραίωση 6.25% 4	Αραίωση 3.125% 5	Αραίωση 1.56% 6	Αραίωση 0.78% 7
A No 18							
B No 18							
C No 18							
D No 17							
E No 17							
F No 17							
G Negative control	Control -	Control -	Control -	Control -	Control -	Control -	Control -

4. Αποτελέσματα

4.1 Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*Minimum Inhibitory Concentration*) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης και προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (*Minimum Bactericidal Concentration*).

Με τη μέθοδο της μικροτιτλοποίησης προσδιορίστηκε η ελάχιστη συγκέντρωση του μελιού που απαιτείται για την αναστολή της ανάπτυξης των βακτηριακών ειδών *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium*, *S. infantis* και *C. freundii*. Στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης για να καθοριστεί η ελάχιστη συγκέντρωση του μελιού που απαιτείται για τη θανάτωση των υπό μελέτη βακτηριακών ειδών. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε δέκα δείγματα μελιών της περιοχής του Ολύμπου και στο μέλι Manuka. Στους Πίνακες 6, 7, 8 και 9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης και της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης.

Πίνακας 6. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) και ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) έναντι του *Acinetobacter baumannii*

Α/Α	<i>Acinetobacter baumannii</i>	
	MIC	MBC
5	12.5% v/v	12.5% v/v
10	12.5% v/v	12.5% v/v
13	12.5% v/v	12.5% v/v
14	12.5% v/v	12.5% v/v
15	12.5% v/v	12.5% v/v
17	12.5% v/v	12.5% v/v
18	12.5% v/v	12.5% v/v
19	6.25% v/v	6.25% v/v
20	12.5% v/v	12.5% v/v
21	12.5% v/v	12.5% v/v
Manuka	12.5% v/v	12.5% v/v

Σύμφωνα με τον Πίνακα 6, παρατηρείται ότι στο *A. baumannii* μικρότερο MIC εμφάνισε το μέλι 19 με τιμή MIC 6.25% v/v ενώ τα υπόλοιπα εννέα (5, 10, 13, 14, 15, 17, 18, 20 και 21) μέλια έδωσαν τιμή MIC 12.5% v/v. Ομοίως, το μέλι Manuka έδωσε τιμή MIC ίση με 12.5% v/v. Το μέλι 19 που παρουσίασε μικρότερη τιμή MIC έχει βοτανική προέλευση από άνθη και κωνοφόρα.

Όσον αφορά την ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση, εννέα (5, 10, 13, 14, 15, 17, 18, 20 και 21) μέλια και το μέλι Manuka έδωσαν τιμή MBC 12.5% v/v, ενώ το μέλι 19 εμφάνισε τιμή MBC 6.25% v/v. Έτσι παρατηρείται ότι και στα δέκα δείγματα μελιών που εξετάστηκαν, αλλά και στο μέλι Manuka, το MIC είναι ίδιο με το MBC. Επομένως, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι όλα τα μέλια, αναστέλλουν τη βακτηριακή ανάπτυξη και έχουν την ικανότητα να τα θανατώνουν στις ίδιες συγκεντρώσεις.

Πίνακας 7. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) και ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) έναντι της *Klebsiella pneumoniae*

	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
A/A	MIC	MBC
5	12.5% v/v	12.5% v/v
10	12.5% v/v	12.5% v/v
13	12.5% v/v	12.5% v/v
14	12.5% v/v	12.5% v/v
15	12.5% v/v	12.5% v/v
17	6.25% v/v	6.25% v/v
18	6.25% v/v	6.25% v/v
19	12.5% v/v	12.5% v/v
20	12.5% v/v	12.5% v/v
21	6.25% v/v	6.25% v/v
Manuka	12.5% v/v	12.5% v/v

Σύμφωνα με τον Πίνακα 7, στη *K. pneumoniae*, μικρότερο MIC έδωσαν τρία (17, 18 και 21) μέλια, με τιμή MIC 6.25% v/v. Τα υπόλοιπα επτά (5, 10, 13, 14, 15 και 20) μέλια έδωσαν τιμή MIC 12.5% v/v όπως και το μέλι Manuka. Τα μέλια 17, 18 και 21, τα οποία εμφάνισαν μικρότερο MIC έχουν βοτανική προέλευση από άνθη και κωνοφόρα δέντρα.

Αναφορικά με την ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση, τα επτά (5, 10, 13, 14, 15, 19 και 20) μέλια και το μέλι Manuka έδωσαν τιμή MBC 12.5% v/v, ενώ τα μέλια 17, 18 και 21 εμφάνισαν τιμή MBC 6.25% v/v. Είναι εμφανές ότι και στη *K. pneumoniae* και τα δέκα δείγματα μελιών και το μέλι Manuka έδωσαν τιμή MBC ίδια με τη τιμή MIC. Επομένως, για την *K. pneumoniae*, τα μέλια αναστέλλουν τη βακτηριακή ανάπτυξη και έχουν την ικανότητα να τα θανατώνουν στις ίδιες συγκεντρώσεις.

Πίνακας 8. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) και ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) έναντι του *Citrobacter freundii*.

A/A	<i>Citrobacter freundii</i>	
	MIC	MBC
5	12.5% v/v	12.5% v/v
10	12.5% v/v	12.5% v/v
13	12.5% v/v	12.5% v/v
14	25% v/v	25% v/v
15	25% v/v	25% v/v
17	12.5% v/v	12.5% v/v
18	12.5% v/v	12.5% v/v
19	12.5% v/v	12.5% v/v
20	12.5% v/v	12.5% v/v
21	12.5% v/v	12.5% v/v
Manuka	12.5% v/v	12.5% v/v

Κατά τον Πίνακα 8, για το *C. freundii*, τα οκτώ (5, 10, 13, 17, 18, 19, 20 και 21) από τα δέκα μέλια έδωσαν τιμή MIC ίση με 12.5% v/v, ενώ δύο (14 και 15) μέλια εμφάνισαν

τιμή MIC ίση με 25% v/v. Το μέλι Manuka, από την άλλη πλευρά, έδωσε τιμή MIC ίση με 12.5% v/v.

Ως προς την ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση, τα οκτώ (5, 10, 13, 17, 18, 19, 20 και 21) μέλια και το μέλι Manuka έδωσαν τιμή MBC 12.5% v/v, ενώ τα δύο (14 και 15) μέλια εμφάνισαν τιμή MBC 25% v/v. Έτσι γίνεται φανερό ότι και για το *C. freundii* και τα δέκα δείγματα μελιών και το μέλι Manuka έδωσαν τιμή MBC ίδια με τη τιμή MIC. Επομένως, τα μέλια, εκτός από το να αναστέλλουν το βακτήριο, είχαν την ικανότητα να το θανατώνουν στις ίδιες συγκεντρώσεις.

Πίνακας 9. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) και ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) έναντι της *Salmonella typhimurium* και της *Salmonella infantis*.

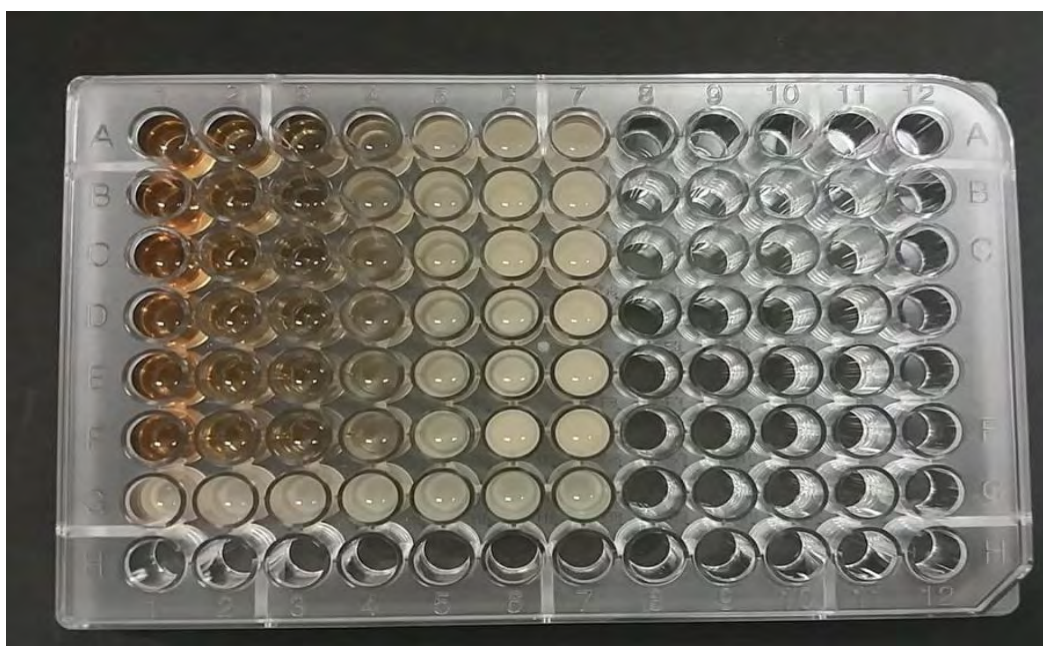
A/A	<i>Salmonella typhimurium</i>		<i>Salmonella infantis</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC
5	12.5% v/v	12.5% v/v	12.5% v/v	12.5% v/v
10	12.5% v/v	12.5% v/v	12.5% v/v	12.5% v/v
13	12.5% v/v	12.5% v/v	25% v/v	25% v/v
14	25% v/v	25% v/v	25% v/v	25% v/v
15	25% v/v	25% v/v	25% v/v	25% v/v
17	12.5% v/v	12.5% v/v	12.5% v/v	12.5% v/v
18	12.5% v/v	12.5% v/v	12.5% v/v	12.5% v/v
19	12.5% v/v	12.5% v/v	12.5% v/v	12.5% v/v
20	12.5% v/v	12.5% v/v	12.5% v/v	12.5% v/v
21	12.5% v/v	12.5% v/v	12.5% v/v	12.5% v/v
Manuka	12.5% v/v	12.5% v/v	12.5% v/v	12.5% v/v

Όπως εμφανίζεται στον Πίνακα 9, στη *S. typhimurium*, μικρότερο MIC εμφάνισαν τα οκτώ (5, 10, 13, 17, 18, 19, 20 και 21) από τα δέκα μέλια που εξετάστηκαν, με τιμή MIC 12.5% v/v, ενώ δύο (14 και 15) μέλια έδωσαν τιμή MIC 25% v/v. Το μέλι Manuka έδωσε τιμή MIC 12.5% v/v. Για τη *S. infantis*, μικρότερη τιμή MIC εμφάνισαν επτά (5, 10, 17, 18, 19, 20 και 21) μέλια με τιμή MIC ίση με 12.5% v/v, ενώ τα τρία (13, 14 και

15) μέλια έδωσαν τιμή MIC ίση με 25% v/v. Το μέλι Manuka έδωσε τιμή MIC 12.5% v/v.

Όσον αφορά την ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση, για τη *S. typhimurium*, οκτώ (5, 10, 13, 17, 18, 19, 20 και 21) μέλια και το μέλι Manuka έδωσαν τιμή MBC 12.5% v/v, ενώ δύο (14 και 15) εμφάνισαν τιμή MBC 25% v/v. Για τη *S. infantis*, επτά (5, 10, 17, 18, 19, 20 και 21) μέλια και το μέλι Manuka έδωσαν τιμή MBC 12.5% v/v, ενώ τα υπόλοιπα τρία (13, 14 και 15) εμφάνισαν τιμή MBC ίση με 25% v/v. Έτσι διαφαίνεται ότι και τα δέκα δείγματα μελιών και το μέλι Manuka έδωσαν τιμή MBC ίδια με τη τιμή MIC. Επομένως, τα μέλια, εκτός από το να αναστέλλουν το βακτήριο, είχαν την ικανότητα να το θανατώνουν στις ίδιες συγκεντρώσεις.

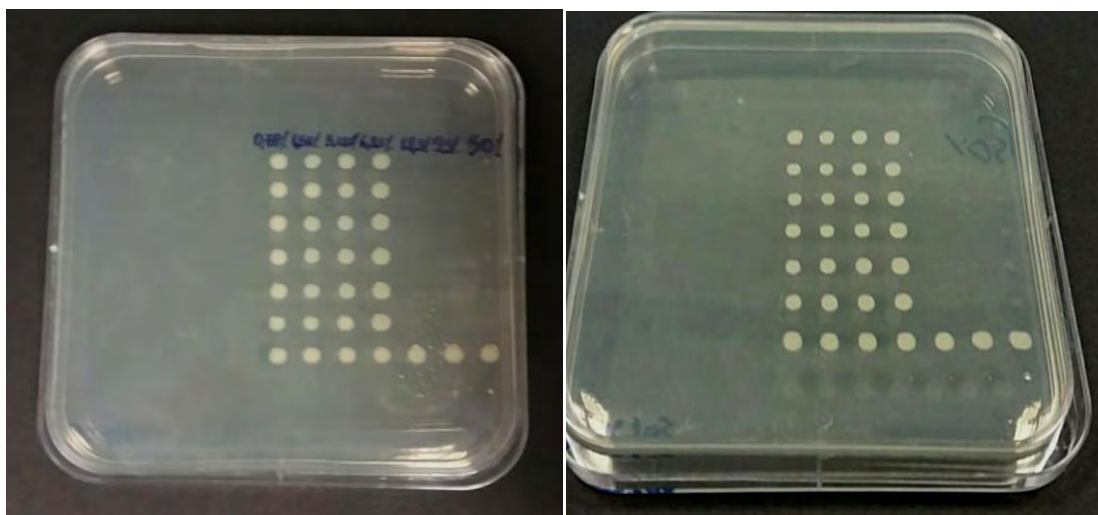
Στην Εικόνα 20, απεικονίζεται η πλάκα μικροτιτλοποίησης μετά το πέρας των 24 ωρών. Τα πηγαδάκια στα οποία παρουσιάζεται θολερότητα οφείλονται στην ανάπτυξη των βακτηρίων, ενώ στα πηγαδάκια τα οποία είναι διαυγή έχουμε πλήρη αναστολή ανάπτυξης του βακτηρίου.



Εικόνα 20. Πλάκα μικροτιτλοποίησης μετά το πέρας των 24 ωρών.

Στις Εικόνες 21 και 22, απεικονίζονται τα τρυβλία για την ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση, μετά την επώαση των 24 ωρών. Στα τρυβλία από τα δεξιά προς τα αριστερά είναι οι αντίστοιχες αραιώσεις 50% v/v, 25% v/v, 12.5% v/v, 6.25% v/v,

3.125% v/v, 1.56% v/v και 0.78% v/v. Την τελευταία σειρά αποτελεί το αρνητικό control και για το λόγο αυτό παρατηρείται ανάπτυξη σε όλες τις αραιώσεις. Στις αραιώσεις που δεν παρατηρείται ανάπτυξη του βακτηρίου έχει θανατωθεί το βακτήριο.



Εικόνα 21 και Εικόνα 22. Ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση σε τετράγωνα τρυβλία μετά το πέρας των 24 ωρών.

4.2 Προσδιορισμός των μηχανισμών δράσης της αντιβακτηριακής ικανότητας των δειγμάτων μελιού με τον καθορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*Minimum Inhibitory Concentration*) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης μετά την προσθήκη α) καταλάσης β) πρωτεΐνάσης K.

Με τη μέθοδο της μικροτιτλοποίησης προσδιορίστηκε η ελάχιστη συγκέντρωση του μελιού που απαιτείται για την αναστολή της ανάπτυξης των βακτηριακών ειδών *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium*, *S. infantis* και *C. freundii* με την προσθήκη α) καταλάσης και β) πρωτεΐνάσης K. Στους Πίνακες 10, 11, 12, 13 και 14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης μετά την προσθήκη καταλάσης και πρωτεΐνάσης K.

Πίνακας 10. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) έναντι του *Acinetobacter baumannii* μετά την προσθήκη α)καταλάσης, β)πρωτεΐνης Κ

	<i>Acinetobacter baumannii</i>		
A/A	MIC	MIC με Καταλάση	MIC με Πρωτεΐνη Κ
5	12.5% v/v	25% v/v	12.5% v/v
10	12.5% v/v	25% v/v	12.5% v/v
13	12.5% v/v	50% v/v	25% v/v
14	12.5% v/v	25% v/v	25% v/v
15	12.5% v/v	25% v/v	25% v/v
17	12.5% v/v	25% v/v	25% v/v
18	12.5% v/v	25% v/v	12.5% v/v
19	6.25% v/v	25% v/v	12.5% v/v
20	12.5% v/v	25% v/v	12.5% v/v
21	12.5% v/v	25% v/v	12.5% v/v

Με την προσθήκη της πρωτεΐνης Κ παρατηρείται, ότι σε πέντε (5, 10, 18, 20 και 21) μέλια δεν μεταβάλλεται η τιμή του MIC. Αντιθέτως, πέντε (13, 14, 15, 17 και 19) μέλια έχουν μια μικρή αύξηση του MIC, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα, ότι για τα συγκεκριμένα μέλια η αντιβακτηριακή τους δράση οφείλεται εν μέρει στην παρουσία αντιβακτηριακών πρωτεϊνών ή ολιγοπεπτιδίων που υπάρχουν στο μέλι.

Με την προσθήκη της καταλάσης παρατηρείται, ότι σε οκτώ (5, 10, 14, 15, 17, 18, 20 και 21) μέλια παρουσιάζεται μια μικρή μεταβολή στο MIC. Συνεπώς, η αντιβακτηριακή δράση εν μέρει οφείλεται στην παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Για το μέλι 13 και το μέλι 19 υπήρξε μεγαλύτερη μεταβολή στο MIC, από το 12.5% v/v στο 50% v/v και από το 6.25% v/v στο 25% v/v, αντιστοίχως, γεγονός που σημαίνει, ότι το υπεροξείδιο του υδρογόνου συμβάλλει περισσότερο στην αντιβακτηριακή δράση του συγκεκριμένου μελιού.

Επομένως, αν λάβουμε υπόψη και τους δύο μηχανισμούς, στα πέντε (5, 10, 18, 20 και 21) μέλια η αντιβακτηριακή δράση τους οφείλεται μόνο στην παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου, ενώ στα υπόλοιπα πέντε (13, 14, 15, 17 και 19) μέλια το υπεροξείδιο του υδρογόνου καθώς και οι πρωτεΐνες, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιβακτηριακή τους δράση.

Πίνακας 11. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) έναντι της *Klebsiella pneumoniae* μετά την προσθήκη α) καταλάσης, β) πρωτεΐνης Κ

	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
A/A	MIC	MIC με Καταλάση	MIC με Πρωτεΐνη Κ
5	12.5% v/v	25% v/v	12.5% v/v
10	12.5% v/v	25% v/v	12.5% v/v
13	12.5% v/v	50% v/v	25% v/v
14	12.5% v/v	25% v/v	25% v/v
15	12.5% v/v	25% v/v	25% v/v
17	6.25% v/v	25% v/v	12.5% v/v
18	6.25% v/v	25% v/v	12.5% v/v
19	12.5% v/v	25% v/v	25% v/v
20	12.5% v/v	25% v/v	12.5% v/v
21	6.25% v/v	25% v/v	12.5% v/v

Παρατηρείται, ότι σε τρία (5, 10 και 20) μέλια, με την προσθήκη της πρωτεΐνης Κ δεν μεταβάλλεται η τιμή του MIC. Τα επτά (13, 14, 15, 17, 18, 19 και 21) μέλια παρουσιάζουν μια μικρή αύξηση του MIC, γεγονός που υποδεικνύει, ότι για τα συγκεκριμένα μέλια η αντιβακτηριακή τους δράση οφείλεται εν μέρει και στην παρουσία αντιβακτηριακών πρωτεϊνών ή ολιγοπεπτιδίων που υπάρχουν στο μέλι.

Τα έξι (5, 10, 14, 15, 19 και 20) από τα δέκα μέλια που εξετάστηκαν εμφανίζουν μια μικρή μεταβολή του MIC με την προσθήκη της καταλάσης. Επομένως, η αντιβακτηριακή δράση εν μέρει οφείλεται στην παρουσία του υπεροξειδίου του

υδρογόνου. Για τα υπόλοιπα τέσσερα (13, 17, 18 και 21) μέλια, υπάρχει μεγαλύτερη μεταβολή του MIC, με αποτέλεσμα να οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι το υπεροξείδιο του υδρογόνου έχει μεγαλύτερη επίδραση στην αντιβακτηριακή δράση των συγκεκριμένων μελιών.

Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη και τους δύο μηχανισμούς, για τα τρία (5, 10 και 20) μέλια, η αντιβακτηριακή δράση τους οφείλεται μόνο στην παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου, ενώ στα επτά (13, 14, 15, 17, 18, 19 και 21) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου αλλά και οι πρωτεΐνες αποτελούν σημαντικό παράγοντα για την αντιβακτηριακή τους δράση με το υπεροξείδιο του υδρογόνου να παρουσιάζει την πιο ισχυρή δράση.

Πίνακας 12. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) έναντι του *Citrobacter freundii* μετά την προσθήκη α) καταλάσης, β) πρωτεΐνης Κ

Α/Α	<i>Citrobacter freundii</i>		
	MIC	MIC με Καταλάση	MIC με Πρωτεΐνη Κ
5	12.5% v/v	25% v/v	12.5% v/v
10	12.5% v/v	25% v/v	12.5% v/v
13	12.5% v/v	50% v/v	25% v/v
14	25% v/v	25% v/v	25% v/v
15	25% v/v	50% v/v	25% v/v
17	12.5% v/v	25% v/v	12.5% v/v
18	12.5% v/v	25% v/v	12.5% v/v
19	12.5% v/v	25% v/v	25% v/v
20	12.5% v/v	25% v/v	12.5% v/v
21	12.5% v/v	25% v/v	12.5% v/v

Με την προσθήκη πρωτεΐνης Κ, παρατηρείται, ότι για τα οκτώ (5, 10, 14, 15, 17, 18, 20 και 21) μέλια δεν μεταβάλλεται η τιμή του MIC. Τα μέλια 13 και 19 έχουν μια μικρή αύξηση του MIC συμπεραίνοντας, ότι για τα συγκεκριμένα μέλια η

αντιβακτηριακή τους δράση οφείλεται εν μέρει και στην παρουσία αντιβακτηριακών πρωτεϊνών ή ολιγοπεπτιδίων που υπάρχουν στο μέλι.

Με την προσθήκη της καταλάσης γίνεται αντιληπτό, ότι για τα οκτώ (5, 10, 15, 17, 18, 19, 20 και 21) μέλια μεταβάλλεται ελάχιστα η τιμή MIC. Επομένως, η αντιβακτηριακή δράση εν μέρει οφείλεται στην παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Στο μέλι 13, στο οποίο η μεταβολή του MIC είναι μεγαλύτερη, το υπεροξείδιο του υδρογόνου παίζει μεγαλύτερο ρόλο στην αντιβακτηριακή δράση των συγκεκριμένων μελιών. Το μέλι 14, δεν παρουσίασε καμία μεταβολή στη τιμή MIC με την προσθήκη της καταλάσης.

Έτσι, λαμβάνοντας υπόψη και τους δύο μηχανισμούς, για τα επτά (5, 10, 15, 17, 18, 20 και 21) μέλια η αντιβακτηριακή δράση τους οφείλεται μόνο στην παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου, ενώ σε δύο (13 και 19) μέλια και το υπεροξείδιο του υδρογόνου, αλλά και οι πρωτεΐνες αναδεικνύονται σημαντικές ως προς την αντιβακτηριακή τους δράση με το υπεροξείδιο του υδρογόνου να έχει πιο ισχυρή δράση. Το μέλι 14 δεν εμφάνισε καμία μεταβολή στη τιμή MIC με καμία από τις δύο προσθήκες των ενζύμων.

Πίνακας 13. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) έναντι της *Salmonella typhimurium* μετά την προσθήκη α)καταλάσης, β)πρωτεΐνης Κ

	<i>Salmonella typhimurium</i>		
A/A	MIC	MIC με Καταλάση	MIC με Πρωτεΐνη Κ
5	12.5% v/v	25% v/v	12.5% v/v
10	12.5% v/v	25% v/v	12.5% v/v
13	12.5% v/v	50% v/v	25% v/v
14	25% v/v	25% v/v	25% v/v
15	25% v/v	25% v/v	25% v/v
17	12.5% v/v	25% v/v	25% v/v
18	12.5% v/v	25% v/v	12.5% v/v
19	12.5% v/v	25% v/v	25% v/v
20	12.5% v/v	25% v/v	12.5% v/v
21	12.5% v/v	25% v/v	12.5% v/v

Η τιμή του MIC δεν μεταβάλλεται με την προσθήκη πρωτεΐνης Κ στα επτά (5, 10, 14, 15, 18, 20 και 21) από τα δέκα μέλια που εξετάστηκαν. Τα μέλια 13, 17 και 19 εμφανίζουν μια μικρή αύξηση του MIC και ως εκ τούτο γίνεται αντιληπτό ότι για τα συγκεκριμένα μέλια η αντιβακτηριακή τους δράση οφείλεται εν μέρει και στην παρουσία αντιβακτηριακών πρωτεϊνών ή ολιγοπεπτιδίων που υπάρχουν στο μέλι.

Με την προσθήκη της καταλάσης παρατηρείται ότι σε επτά (5, 10, 17, 18, 19, 20 και 21) μέλια μεταβάλλεται η τιμή MIC από το 12.5% v/v στο 25% v/v. Επομένως, η αντιβακτηριακή δράση εν μέρει οφείλεται στην παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Για το μέλι 13, η μεταβολή του MIC είναι μεγαλύτερη από το 12.5% v/v στο 50% v/v γεγονός που σημαίνει ότι το υπεροξείδιο του υδρογόνου δρα καταλυτικά στην αντιβακτηριακή δράση των συγκεκριμένων μελιών. Τα μέλια 14 και 15 δεν παρουσίασαν καμία μεταβολή στη τιμή MIC με την προσθήκη της καταλάσης.

Επομένως, αν λάβουμε υπόψη και τους δύο μηχανισμούς, για τα πέντε (5, 10, 18, 20 και 21) μέλια η αντιβακτηριακή δράση τους οφείλεται μόνο στην παρουσία το υπεροξειδίου του υδρογόνου, για τρία (13, 17 και 19) μέλια και το υπεροξείδιο του υδρογόνου αλλά και οι πρωτεΐνες, επενεργούν καθοριστικά στην αντιβακτηριακή τους δράση με το υπεροξείδιο του υδρογόνου να έχει πιο ισχυρή δράση, ενώ δύο (14 και 15) μέλια δεν εμφάνισαν καμία μεταβολή στη τιμή MIC με τη προσθήκη πρωτεΐνης K και με τη προσθήκη καταλάσης.

Πίνακας 14. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) έναντι της *Salmonella infantis* μετά την προσθήκη α)καταλάσης, β)πρωτεΐνης K

A/A	<i>Salmonella infantis</i>		
	MIC	MIC με Καταλάση	MIC με Πρωτεΐνη K
5	12.5% v/v	25% v/v	25% v/v
10	12.5% v/v	25% v/v	12.5% v/v
13	25% v/v	50% v/v	25% v/v
14	25% v/v	25% v/v	25% v/v
15	25% v/v	25% v/v	25% v/v
17	12.5% v/v	25% v/v	25% v/v
18	12.5% v/v	25% v/v	12.5% v/v
19	12.5% v/v	25% v/v	25% v/v
20	12.5% v/v	25% v/v	12.5% v/v
21	12.5% v/v	50% v/v	12.5% v/v

Με την προσθήκη πρωτεΐνης K στα επτά (10, 13, 14, 15, 18, 20 και 21) μέλια δεν μεταβλήθηκε η τιμή του MIC. Στα υπόλοιπα τρία (5, 17 και 19) εμφανίζεται μια μικρή αύξηση του MIC συμπεραίνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο, ότι για τα συγκεκριμένα μέλια η αντιβακτηριακή τους δράση οφείλεται εν μέρει και στην παρουσία αντιβακτηριακών πρωτεϊνών ή ολιγοπεπτιδίων που υπάρχουν στο μέλι.

Το μέλι 5, στο οποίο για τη *S. typhimurium* δε μεταβλήθηκε η τιμή MIC με την προσθήκη πρωτεΐνης K σε αντίθεση με τα αποτελέσματα για την τιμή MIC στη *S. infantis*, όπου και υπήρχε μια μικρή αύξηση του MIC. Το ίδιο παρατηρείται και στο μέλι 13, όπου για τη *S. typhimurium* υπήρξε μια μικρή αύξηση του MIC, άρα εν μέρει η παρουσία πρωτεϊνών επιδρά στην αντιβακτηριακή δράση του μελιού, ενώ αντιθέτως στη *S. infantis* δεν υπήρξε μεταβολή στη τιμή του MIC. Επομένως, ο μηχανισμός δράσης των μελιών σε βακτήρια του ίδιου γένους που παρατηρείται να διαφέρει για το ίδιο μέλι, παρουσιάζει ένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Με την προσθήκη της καταλάσης διαπιστώνεται ότι για τα επτά (5, 10, 13, 17, 18, 19 και 20) μέλια μεταβάλλεται η τιμή MIC. Συνεπώς, η αντιβακτηριακή δράση εν μέρει οφείλεται στην παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Για το μέλι 21, η μεταβολή του MIC είναι μεγαλύτερη από το 12.5% v/v στο 50% v/v, άρα το υπεροξείδιο του υδρογόνου παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιβακτηριακή δράση των συγκεκριμένων μελιών. Τα μέλια 14 και 15 δεν παρουσίασαν καμία μεταβολή στη τιμή MIC με την προσθήκη της καταλάσης.

Συνακολούθως, αν λάβουμε υπόψη και τους δύο μηχανισμούς, για τα πέντε (10, 13, 18, 20 και 21) μέλια η αντιβακτηριακή δράση τους οφείλεται μόνο στην παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου ενώ στα μέλια 5, 17 και 19 και το υπεροξείδιο του υδρογόνου αλλά και οι πρωτεΐνες δρουν καταλυτικά στην αντιβακτηριακή τους δράση με το υπεροξείδιο του υδρογόνου να έχει την πιο ισχυρή δράση. Τα μέλια 14 και 15 δεν εμφάνισαν καμία μεταβολή στη τιμή MIC με τη προσθήκη πρωτεΐνης K και με τη προσθήκη καταλάσης.

5. Συζήτηση

Η ανάπτυξη και η εξάπλωση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά παθογόνων βακτηρίων αποτελεί σοβαρό πρόβλημα παγκοσμίως. Για τον λόγο αυτό, οι επιστήμονες προσπαθούν να βρουν λύση στο πρόβλημα, παράγοντας φάρμακα στα οποία τα μικρόβια δεν θα είναι ανθεκτικά (Khan et al., 2018) και αναζητώντας εναλλακτικές λύσεις όπως είναι τα φυτά και τα φυτικά προϊόντα όπως το μέλι (Wasihun and Kasa, 2016). Πρόσφατα αναφέρθηκε από τον Meo και τους συνεργάτες του ότι το μέλι διαδραματίζει βασικό ρόλο στη σύγχρονη ανάπτυξη της ιατρικής (Meo et al., 2017). Οι ευεργετικές δράσεις του μελιού είναι ήδη γνωστές από την αρχαιότητα, τόσο από τον Ιπποκράτη, πατέρα της Ιατρικής που υπέδειξε μέσα από τα συγγράμματα του τη διατροφική και φαρμακολογική αξία του μελιού, όσο και από τον Διοσκουρίδη (50 μ.Χ.), ο οποίος περιέγραψε τη θεραπευτική χρήση του μελιού για τα κοίλα έλκη, τα ηλιακά εγκαύματα, τις φλεγμονές του λαιμού και των αμυγδαλών. Η διατροφική ποιότητα του μελιού είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική και παρουσιάζει σημαντικές ιδιότητες έναντι φλεγμονών, μολυσματικών παραγόντων, όπως τα βακτήρια και οι μύκητες, καθώς επίσης στη μείωση του βήχα και την επούλωση πληγών (Khan et al., 2018).

Ο αντιβακτηριακός μηχανισμός του μελιού δεν είναι πλήρως κατανοητός μέχρι σήμερα (Cooper, 2014; Bradshaw, 2011). Ωστόσο, από πολλούς ερευνητές αναφέρεται ότι το μέλι αναστέλλει τη βακτηριακή ανάπτυξη εξαιτίας διαφορετικών παραγόντων. Η υψηλή συγκέντρωση των σακχάρων, το χαμηλό pH, η παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου, οι πρωτεϊνικές ενώσεις, οι φαινολικές ενώσεις ή άλλα μη αναγνωρισμένα συστατικά που υπάρχουν στο μέλι παρέχουν αντιμικροβιακή δράση (Mundo et al., 2004). Η βοτανική προέλευση είναι υπεύθυνη για το επίπεδο της αντιβακτηριακής δράσης και βασίζεται κυρίως στις περιβαλλοντικές και γεωγραφικές συνθήκες στις οποίες παράγεται το μέλι (Meo et al., 2017).

Μία από τις γνωστές ποικιλίες μελιού είναι το μέλι Manuka (*Leptospermum scoparium*), το οποίο έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζει ανασταλτική δράση έναντι 60 βακτηριακών ειδών συμπεριλαμβανομένων αερόβιων και αναερόβιων, Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων (Mandal and Mandal, 2011). Ωστόσο,

πρόσφατες μελέτες σχετικά με τις αντιβακτηριακές ιδιότητες διαφόρων τύπων μελιού που παράγονται παγκοσμίως έχουν αναφέρει παρόμοια ή ανώτερη αντιβακτηριακή δράση σε σύγκριση με το μέλι Manuka (Stagos et al., 2018).

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της αντιβακτηριακής δράσης διαφόρων τύπων μελιού της ευρύτερης περιοχής του Ολύμπου έναντι πέντε Gram αρνητικών βακτηρίων (*A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *S. infantis* και *S. typhimurium*), όπως επίσης και η διερεύνηση των μηχανισμών που συμβάλλουν σε αυτή.

Για την εκτίμηση της αντιβακτηριακής δράσης των μελιών χρησιμοποιήθηκε η *in vitro* μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*Minimum Inhibitory Concentration*) με την χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (*microtiter plates*) και για την διάκριση τους σε αυτά με βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνο δράση χρησιμοποιήθηκε η *in vitro* μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (*Minimum Bactericidal Concentration*).

Για την διερεύνηση των μηχανισμών της αντιμικροβιακής δράσης των μελιών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*Minimum Inhibitory Concentration*) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (*microtiter plates*) μετά την προσθήκη α) καταλάσης, η οποία υποδεικνύει ότι το υπεροξείδιο του υδρογόνου συμβάλλει στην αντιβακτηριακή δράση, β) πρωτεΐνάσης K, η οποία υποδεικνύει ότι πρωτεΐνες ή ολιγοπεπτίδια που υπάρχουν στο μέλι συμβάλλουν στην αντιβακτηριακή του δράση.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μέρος μιας προσπάθειας που γίνεται στο εργαστήριο να διερευνηθεί, εάν μέλια της περιοχής του Ολύμπου εμφανίζουν αντιβακτηριακή δράση έναντι παθογόνων βακτηρίων, συγκρινόμενα με το μέλι Manuka.

Όσον αφορά το *A. baumannii*, τα δέκα δείγματα μελιών που μελετήθηκαν με την μέθοδο προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης όλα παρουσίασαν αντιβακτηριακή δράση. Ένα μόνο μέλι, το μέλι 19 (άνθη και κωνοφόρα) έδωσε μικρότερη τιμή MIC (6.25% v/v) σε σχέση με το μέλι Manuka

(12.5% v/v). Τα υπόλοιπα εννέα μέλια εμφάνισαν εφάμιλλη δράση με αυτή του Manuka. Στην μέθοδο προσδιορισμού της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης και τα δέκα μέλια, καθώς και το μέλι Manuka έδωσαν τιμή MBC ίδια με τη τιμή του MIC, καταλήγοντας έτσι στο συμπέρασμα, ότι όλα τα μέλια που μελετήθηκαν παρουσιάζουν βακτηριοκτόνο δράση. Αναφορικά με τους μηχανισμούς στους οποίους οφείλεται η αντιβακτηριακή τους δράση, το υπεροξειδίο του υδρογόνου παίζει σημαντικό ρόλο δεδομένου ότι και στα δέκα μέλια παρατηρήθηκε αύξηση του MIC, παρόλα αυτά πέντε (13, 14, 15, 17 και 19) μέλια, παρουσίασαν μεταβολή του MIC και με την προσθήκη πρωτεΐνης K, με αποτέλεσμα η αντιβακτηριακή τους δράση να καθορίζεται και από το υπεροξειδίο του υδρογόνου αλλά και από την παρουσία πρωτεϊνών και ολιγοπεπτιδίων που υπάρχουν σε αυτά.

Αναφορικά με την *K. pneumoniae* και τα δέκα δείγματα μελιών που μελετήθηκαν με την μέθοδο προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης παρουσίασαν αντιβακτηριακή δράση. Τα τρία από τα δέκα μέλια, το 17 (βότανα) το 18 (Ακακία, Έλατο, τσάι του βουνού) και το 21 (άνθη και κωνοφόρα) έδωσαν μικρότερη τιμή MIC (6.25% v/v) σε σχέση με το μέλι Manuka (12.5% v/v). Τα υπόλοιπα επτά μέλια εμφάνισαν ίδια δράση με αυτή του Manuka. Στην μέθοδο προσδιορισμού της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης και τα δέκα μέλια καθώς και το μέλι Manuka εμφάνισαν τιμή MBC ίδια με τη τιμή του MIC. Όσον αφορά τους μηχανισμούς στους οποίους οφείλεται η αντιβακτηριακή τους δράση, στα περισσότερα μέλια, τόσο το υπεροξειδίο του υδρογόνου όσο και οι πρωτεΐνες και τα ολιγοπεπτίδια, συμβάλλουν στην αντιβακτηριακή τους δράση, με εξαίρεση τα μέλια 5, 10 και 20, των οποίων η δράση επηρεάζεται μόνο από το υπεροξειδίο του υδρογόνου.

Όλα τα δείγματα μελιών που μελετήθηκαν για το *C. freundii* με την μέθοδο προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης, παρουσίασαν αντιβακτηριακή δράση. Τα οκτώ από τα δέκα δείγματα μελιών έδωσαν τιμή MIC ίση με αυτή του Manuka (12.5% v/v). Επιπλέον, με τη μέθοδο προσδιορισμού της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης και τα δέκα μέλια, καθώς και το μέλι Manuka έδωσαν τιμή MBC ίδια με τη τιμή του MIC. Όσον αφορά τους μηχανισμούς

στους οποίους οφείλεται η αντιβακτηριακή τους δράση, το υπεροξείδιο του υδρογόνου έχει καθοριστικό ρόλο στην αντιβακτηριακή δράση, με εξαίρεση το μέλι 13 και το μέλι 19 στα οποία οι πρωτεΐνες και το υπεροξείδιο του υδρογόνου συμβάλλουν συνεργιστικά στην αντιβακτηριακή τους δράση. Στο μέλι 14 δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στο MIC με την προσθήκη καταλάσης και την προσθήκη πρωτεΐνης K.

Στη *S. infantis* και τη *S. typhimurium* και τα δέκα δείγματα μελιών που μελετήθηκαν με την μέθοδο προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης παρουσίασαν αντιβακτηριακή δράση. Τα επτά από τα δέκα δείγματα μελιών για τη *S. infantis* και οκτώ από τα δέκα για τη *S. typhimurium* έδωσαν τιμή MIC ίση με αυτή του Manuka (12.5%v/v). Στην μέθοδο προσδιορισμού της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης και τα δέκα μέλια καθώς και το μέλι Manuka εμφάνισαν τιμή MBC ίδια με τη τιμή του MIC. Επιπλέον, για τους μηχανισμούς δράσης, το υπεροξείδιο του υδρογόνου αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην αντιβακτηριακή δράση των μελιών, καθώς στα περισσότερα μέλια μεταβλήθηκε η τιμή MIC μετά την προσθήκη καταλάσης, ενώ στα μέλια 5, 17 και 19 για τη *S. infantis*, και 13, 17 και 19 για τη *S. typhimurium* μεταβλήθηκε η τιμή MIC και με την προσθήκη πρωτεΐνης K. Σε αυτό το σημείο παρατηρήθηκε ότι τα μέλια με διαφορετική βοτανική προέλευση, παρουσιάζουν διαφορετικό μηχανισμό δράσης σε βακτήρια του ίδιου γένους. Σε δύο μέλια, το 14 και το 15 και στα δύο βακτήρια, δεν παρατηρήθηκε μεταβολή της τιμής MIC με την προσθήκη καταλάσης και πρωτεΐνης K.

Συγκεντρωτικά, στη παρούσα μελέτη, όλα τα δείγματα των μελιών ανεξαρτήτως της βοτανικής προέλευσης, έδειξαν, ότι όχι μόνο αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων, αλλά έχουν και την ικανότητα να τα θανατώνουν. Μερικά από τα δείγματα των μελιών που εξετάστηκαν, παρουσίασαν μεγαλύτερη αντιβακτηριακή δράση σε σχέση με το μέλι Manuka. Επομένως, τα μέλια της περιοχής του Ολύμπου παρουσίασαν βακτηριοκτόνο δράση σε πέντε Gram αρνητικά βακτήρια, στις ίδιες συγκεντρώσεις που παρατηρήθηκε και αναστολή της ανάπτυξης των συγκεκριμένων βακτηρίων.

Όσον αφορά τους μηχανισμούς δράσης, σχεδόν σε όλα τα μέλια και στα πέντε βακτήρια, η αντιβακτηριακή δράση οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στο υπεροξείδιο του υδρογόνου. Ωστόσο, στα περισσότερα βακτηριακά είδη που εξετάστηκαν, οι πρωτεΐνες δεν συνέβαλλαν στην αντιμικροβιακή δράση του μελιού σε τόσο μεγάλο βαθμό με εξαίρεση την *K. pneumoniae* στην οποία στα επτά από τα δέκα μέλια οι πρωτεΐνες δρούσαν συνδυαστικά με το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Σε δύο μέλια, το μέλι 13 (άνθη και καστανιά) και το μέλι 19 (άνθη και κωνοφόρα) φαίνεται ότι η αντιβακτηριακή δράση τους οφείλεται στην παρουσία και των πρωτεϊνών, καθώς υπήρξε μεταβολή στη τιμή MIC σε όλα τα υπό εξέταση βακτήρια (εξαίρεση τη *S. infantis* για το μέλι 13) μετά την προσθήκη της πρωτεΐνης K.

Συμπερασματικά, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, δημιουργούνται νέες προοπτικές για τη θεραπευτική δράση του μελιού. Πιο συγκεκριμένα, δύο από τα βακτήρια που μελετήθηκαν (*A. baumannii*, *K. pneumoniae*), ανήκουν στα έξι παθογόνα βακτήρια ("ESKAPE") που συνδέονται με την υγειονομική περίθαλψη, γεγονός που σημαίνει ότι λόγω της ισχυρής αντιβακτηριακής δράσης που εμφάνισαν τα μέλια Ολύμπου έναντι αυτών των βακτηρίων, θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια εναλλακτική θεραπεία. Ωστόσο, συνίσταται να γίνουν περαιτέρω μελέτες για την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων, να εξεταστούν τα μέλια και σε άλλα παθογόνα βακτήρια κλινικής σημασίας, καθώς επίσης να γίνουν μελέτες για να αποδειχθεί και η *in vivo* αντιβακτηριακή τους δράση.

Επιπροσθέτως, η ανασταλτική και η βακτηριοκτόνος δράση που προσδίδουν τα μέλια που εξετάστηκαν στη παρούσα μελέτη, σε βακτήρια σημαντικά για τα τρόφιμα (*S. infantis*, *S. typhimurium*), λόγω των τροφικών δηλητηριάσεων που προκαλούνται από αυτά, μπορούν να αποτελέσουν ενθαρρυντικά δεδομένα για τη πιθανή χρήση τους ως φυσικά συντηρητικά στη βιομηχανία τροφίμων.

Εν κατακλείδι, τα μέλια του Ολύμπου έδωσαν εφάμιλλη, και ορισμένα, καλύτερη δράση από το διεθνώς αναγνωρισμένο μέλι Manuka, γεγονός που μπορεί να τα καταστήσει ένα προϊόν υψηλής προστιθέμενης αξίας συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη της τοπικής οικονομίας της Θεσσαλίας και κατ' επέκταση της Ελλάδας.

6. Βιβλιογραφία

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

1. Abeshu, M. and Gelata, B. (2016). Medicinal uses of honey. *Biology and Medicine*, 8(2).
2. Adams, C., Manley-Harris, M. and Molan, P. (2009). The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydrate Research*, 344(8), pp. 1050-1053.
3. Adams, C., Boulton, C., Deadman, B., Farr, J., Grainger, M., Manley-Harris, M. and Snow, M. (2008). Isolation by HPLC and characterization of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydrate Research*, 343(4), pp. 651–659.
4. Ajibola, A., Chamunorwa, J. and Erlwanger, K. (2012). Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. *Nutrition & Metabolism*, 9(1), pp. 61–73.
5. Alvarez-Suarez, J., Tulipani, S., Diaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., Damiani, E., Astolfi, P., Bompadre, S. and Battino, M. (2010). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9), pp. 2490–2499.
6. Alvarez-Suarez, J., Gasparri, M., Forbes-Hernandez, T., Mazzoni, L. and Giampieri, F. (2014). The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey. *Foods*, 3(3), pp. 420–432.
7. Alzahrani, H., Alsabehi, R., Boukraa, L., Abdellah, F., Bellik, Y. and Bakhotmah, B. (2012). Antibacterial and Antioxidant Potency of Floral Honeys from Different Botanical and Geographical Origins. *Molecules*, 17(9), pp. 10540-10549.
8. Ananias, K., Melo, A. and Moura, C. (2013). Analysis of moisture content, acidity and contamination by yeast and molds in *Apis mellifera* L. honey from central Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), pp. 679–683.

9. Anthimidou, E. and Mossialos, D. (2013). Antibacterial Activity of Greek and Cypriot Honeys Against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in Comparison to Manuka Honey. *Journal of Medicinal Food*, 16(1), pp. 42-47.
10. Atrott, J. and Henle, T. (2009). Methyglyoxal in Manuka honey – Correlation with antibacterial properties. *Czech Journal of Food Science*, 27(1), pp.163-165.
11. Bobis, O., Dezmirean, D. and Moise, A. (2018). Honey and Diabetes: The Importance of Natural Simple Sugars in Diet for Preventing and Treating Different Type of Diabetes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, pp. 1-12.
12. Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R. and Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: A review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), pp. 677-689.
13. Bogdanov, S. (2015). Honey as nutrient and functional food. In S. Bogdanov (Ed.), *The honey book*, pp.1–48. Retrieved from <http://www.bee-hexagon.net/files/file/>.
14. Bradshaw, C. (2011). An in vitro comparison of the antimicrobial activity of honey, iodine and silver wound dressings. *Bioscience Horizons*, 4(1), pp. 61–70.
15. Brudzynski, K., Abubaker, K., St- Martin, L. and Castle, A. (2011). Re-Examining the Role of Hydrogen Peroxide in Bacteriostatic and Bactericidal Activities of Honey. *Frontiers in Microbiology*, 2(213).
16. Bueno-Costa, F., Zambiasi, R., Bohmer, B., Chaves, F., Silva, W., Zanusso, J. and Dutra, I. (2016). Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *LWT - Food Science and Technology*, 65, pp. 333-340.
17. Burns, D., Dillon, A., Warren, J. and Walker, M. (2018). A Critical Review of the Factors Available for the Identification and Determination of Manuka Honey. *Food analytical methods*, 11(6), pp. 1561-1567.
18. Carnwath, R., Graham, E., Reynolds, K. and Pollock, P. (2014). The antimicrobial activity of honey against common equine wound bacterial isolates. *The Veterinary Journal*, 199(1), pp. 110–114.

19. Carter, D., Blair, S., Cokcetin, N., Bouzo, D., Brooks, P., Schothauer, R. and Harry, E. (2016). Therapeutic Manuka Honey: No Longer So Alternative. *Frontiers in Microbiology*, 7.
20. Chopra, T., Marchaim, D., Awali, R., Krishna, A., Johnson, P., Tansek, R., Chaudary, K., Lephart, P., Slim, J., Hothi, J., Ahmed, H., Pogue, J., Zhao, J. and Kaye, K. (2013). Epidemiology of Bloodstream Infections Caused by *Acinetobacter baumannii* and Impact of Drug Resistance to both Carbapenems and Ampicillin Sulbactam on Clinical Outcomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(12), pp. 6270–6275.
21. Chua, L. and Chan, G. (2013). Honey protein extraction and determination by mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(10), pp.3063–3074.
22. Clement, H. (2007). Σύγχρονη Μελισσοκομία. Εκδόσεις Ψύχαλου, Αθήνα, pp. 354, 398-412.
23. Cooper, R. (2014). Honey as an effective antimicrobial treatment for chronic wounds: is there a place for it in modern medicine? *Chronic Wound Care Management and Research*, 1, pp. 15–22.
24. Cortes, G., Borrell, N., Astorza, B., Gomez, C., Sauleda, J. and Alberti, S. (2002). Molecular Analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumonia* in a murin model of pneumonia. *Infection and Immunity*, 70(5), pp. 2583-2590.
25. Cortes, M., Vigil, P. and Montenegro, G. (2011). The medicinal value of honey: a review on its benefits to human health, with a special focus on its effects on glycemic regulation. *Ciencia e Investigacion Agraria*, 38(2), pp. 303-317.
26. Decré, D., Verdet, C., Emirian, A., Gourrierc, T., Petit, J., Offenstadt, G., Maury, E., Brisse, S. and Arlet, G. (2011). Emerging Severe and Fatal Infections Due to *Klebsiella pneumoniae* in Two University Hospitals in France. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(8), pp. 3012-3014.
27. De-Melo, A., Almeida-Muradian, L., Sancho, M. and Pascual-Mate, A. (2017). Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research*, 57(1), pp. 5-37.

28. da Silva, P., Gauche, C., Gonzaga, L., Costa, A. and Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, pp. 309-323.
29. Fabrega, A. and Vila, J. (2013). *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), pp. 308–341.
30. Gart, E., Suchodolski, J., Welsh, T., Alaniz, R., Randel, R. and Lawhon, S. (2016). *Salmonella typhimurium* and multidirectional communication in the gut. *Frontiers in Microbiology*, 7.
31. Greenwood, D., Slack, R., Peutherer, J. and Barer, M. (2011). Ιατρική Μικροβιολογία. Elsevier, New York, USA, p. 356.
32. Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A. and Sleator, R. (2012). *Acinetobacter baumannii*. An emerging opportunistic pathogen. *Virulence*, 3(3), pp. 243-250.
33. Jagessar, R. and Alleyne, R. (2011). Antimicrobial potency of the aqueous extract of leaves of terminalia catappa. *Academic Research International*, 1(3), pp.362-371.
34. Kalaba, V., Golic, B., Sladojevic, Z., and Kalaba, D. (2017). Incidence of *Salmonella Infantis* in poultry meat and products and the resistance of isolates to antimicrobials. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 85.
35. Khan, S., Anjum, S., Rahman, K., Ansari, M., Khan, W., Kamal, S., Khattak, B., Muhammad, A. and Khan, H. (2018). Honey: Single food stuff comprises many drugs. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), pp. 320–325.
36. Krusna, N., Kowsalya, A., Radha, S. and Narayanan, R. (2007). Honey as a natural preservative of milk. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45(5), pp. 459–464.
37. Kwakman, P., te Velde, A., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, C. and Zaat, S. (2010). How honey kills bacteria. *The FASEB Journal*, 24(7), pp. 2576–2582.
38. Kwakman, P. and Zaat, S. (2012). Antibacterial components of honey. *IUBMB Life*, 64(1), pp. 48–55.

39. Lee, H., Churey, J. and Worobo, R. (2008). Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1–2), pp.240–244.
40. Lee, C., Lee J., Park, K., Jeon, J., Kim, Y., Cha, C., Jeong, B. and Lee, S. (2017). Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumonia*: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(483).
41. Leon-Ruiz, V., Vera, S., Gonzalez-Porto, A. and San Andres, M. (2013). Analysis of water soluble vitamins in honey by isocratic RP-HPLC. *Food Analytical Methods*, 6(2), pp. 488–496.
42. Maddocks, S. and Jenkins, R. (2013). Honey: A sweet solution to the growing problem of antimicrobial resistance? *Future Microbiology*, 8(11), pp. 1419–1429.
43. Mandal, M. and Mandal, S. (2011). Honey: Its medicinal property antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2), pp. 154–160.
44. Martin, R. and Bachman, M. (2018). Colonization, Infection, and the Accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(4).
45. Mato, I., Huidobro, J., Lozano, J. and Sancho, M. (2003). Significance of nonaromatic organic acids in honey. *Journal of Food Protection*, 6(12), pp. 2371–2376.
46. Mavrick, E., Wittmann, S., Barth, G. and Henle, T. (2008). Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(4), pp. 483–489.
47. McLoone, P., Warnock, M. and Fyfe, L. (2016). Honey: A realistic antimicrobial for disorders of the skin. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 49(2), pp. 161–167.
48. Meo, S., Al-Asiri, S., Mahesar, A. and Ansari, M. (2017). Role of honey in modern medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(5), pp. 975–978.
49. Mohamed, S., Mohamed, M., Khalil, M., Azmy, M. and Mabrouk, M. (2018). Combination of essential oil and ciprofloxacin to inhibit/eradicate biofilms in

- multidrug – resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Applied Microbiology*, 125(1), pp. 5-28.
50. Molan, P. (1992). The antibacterial nature of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World*, 73(1), pp. 5-28.
 51. Montefour, K., Frieden, J., Hurst, S., Helmich, C., Headley, D., Martin, M. and Boyle, D. (2008). *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant pathogen in critical care. *Critical care nurse*, 28(1), pp. 1-13.
 52. Mundo, M., Padilla-Zakour, O. and Worobo, R. (2004). Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *International Journal of Food Microbiology*, 97(1), pp. 1–8.
 53. Oryan, A., Alemzadeh, E. and Moshiri, A., (2016). Biological properties and therapeutic activities of honey in wound healing: A narrative review and meta-analysis. *Journal of Tissue Viability* , 25(2), pp. 98-118.
 54. Papadopoulos, T., Petridou, E., Zdragas, A., Mandilara, G., Vafeas, G., Passiotou, M. and Vatopoulos, A. (2017). Multiple clones and low antimicrobial resistance rates for *Salmonella enterica* serovar *Infantis* populations in Greece. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 51, pp. 54–58.
 55. Paterson D. (2006). The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clinical Infectious Diseases*, 43(2), pp. 43–8.
 56. Patton, T., Barrett J., Brennan J. and Moran N. (2006). Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey. *Journal of Microbiological Methods*, 64(1), pp. 84-95.
 57. Peleg, A., Seifert, H. and Paterson, D. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), pp. 538-582.
 58. Qin, H., Lo, N., Loo, J., Lin, X., Yim, A., Tsui, S., Lau, T., Ip, M. and Chan, T. (2018). Comparative transcriptomics of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in response to antibiotic treatments. *Scientific reports*, 8(1).
 59. Ramalivhana, J., Obi, C., Samie, A., Iweriebor, B., Uaboi-Egbenni, P., Idiaghe, J. and Momba, M. (2013). Antibacterial activity of honey and medicinal plant

- extracts against Gram negative microorganisms. *Academic journals*, 13(4), pp. 616-625.
60. Rezaei, M., Akya, A., Elahi, A., Ghadiri, K. and Jafari, S. (2016). The clonal relationship among the *Citrobacter freundii* isolated from the main hospital in Kermanshah, west of Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 8(3), pp. 175–180.
 61. Rogers, K., Sim, M., Stewart, S., Phillips, A., Cooper, J., Douance, C., Pyne, R. and Rogers, P. (2014). Investigating C-4 Sugar Contamination of Manuka Honey and Other New Zealand Honey Varieties Using Carbon Isotopes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(12), pp. 2605-2614.
 62. Samarghandian, S., Farkhondeh, T. and Samini, F. (2017). Honey and health: A review of recent clinical research. *Pharmacognosy Research*, 9(2), pp. 121-127.
 63. Sanz, M., Polemis, N., Morales, V., Corzo, N., Drakoularakou, A., Gibson, G. and Rastall, R. (2005). In vitro investigation into the potential prebiotic activity of honey oligosaccharides. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53(8), pp. 2914-2921.
 64. Sherlock, O., Dolan, A., Athman, R., Power, A., Gethin, G., Cowman, S. and Humphreys, H. (2010). Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Complementary and Alternative Medicine*, 10 (47), pp. 1-5.
 65. Shin, H. and Ustunol, Z. (2005). Carbohydrate composition of honey from different floral sources and their influence on growth of selected intestinal bacteria: An in vitro comparison. *Food Research International*, 38(6), pp. 721–728.
 66. Simon, A., Traynor, K., Santos, K., Blaser, G., Bode, U. and Molan, P. (2009). Medical honey for wound care – Still the ‘Latest Resort’?. *Evidence- based Complementary and Alternative Medicine*, 6(2), pp. 165-173.
 67. Snow, M. and Manley-Harris, M. (2004). On the nature of non-peroxide antibacterial activity in New Zealand Manuka honey. *Food Chemistry*, 84(1), pp. 145–147.

68. Spricigo, D., Bardina, C., Cortes, P. and Llagostera, M. (2013). Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 165(2), pp. 169–174.
69. Stagos, D., Soulitsiotis, N., Tsadila, C., Papaeconomou, S., Arvanitis C., Ntontos, A., Karkanta, F., Adamou-Androulaki, S., Petrotos, K., Spandidos, D., Kouretas, D. and Mossialos, D. (2018). Antibacterial and antioxidant activity of different types of honey derived from Mount Olympus in Greece. *International Journal of Molecular Medicine*, 42(2), pp. 726-734.
70. Szweda, P. (2017). Antimicrobial activity of honey. Honey Analysis. *InTech*, pp. 215-232.
71. Trivedi, M., Branton, A., Trivedi, D., Gangwar, M. and Jana, M. (2015). Antimicrobial Susceptibility, Biochemical Characterization and Molecular Typing of Biofield Treated *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of health and medical informatics*, 6(5).
72. Tsen, H., Hu, H., Lin, J., Huang, C. and Wang, T. (2000). Analysis of the *Salmonella typhimurium* isolates from food- poisoning cases by molecular subtyping methods. *Food microbiology*, 17(2), pp. 143-152.
73. Voidarou, C., Alexopoulos, A., Plessas, S., Karapanou, A., Mantzourani, I., Stavropoulou, E., Fotou, K., Tzora, A., Skoufos, I. and Bezirtzoglou, E. (2011). Antibacterial activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Anaerobe*, 17(6), pp. 375-379.
74. Wang, J., Chang, S., Chen, Y. and Luh, K. (2000). Comparison of antimicrobial susceptibility of *Citrobacter freundii* isolates in two different time periods. *The Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 33(4), pp. 258-262.
75. Wang, Y., Huang, T., Yang, Y., Kuo, S., Chen, C., Liu, C., Liu, Y., Chen, T., Chang, F., Wu, S., How, C. and Lee, Y. (2018). Biofilm formation is not associated with worse outcome in *Acinetobacter baumannii* bacteraemic pneumonia. *Scientific Reports*, 8(1).
76. Wasihun, A. and Kasa, B. (2016). Evaluation of antibacterial activity of honey against multidrug resistant bacteria in Ayder Referral and Teaching Hospital, Northern Ethiopia. *Springer Plus*, 5(842).

77. Weston, R. (2000). The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chemistry*, 71 (2), pp. 235-239.
78. White jr, J., Subers, M. and Schepartz, A. (1963). The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 73(1), pp. 57-70.
79. Yaghoobi, R., Kazerouni, A. and Kazerouni, O. (2013). Evidence for Clinical Use of Honey in Wound Healing as an Anti-bacterial, Anti-inflammatory Anti-oxidant and Anti-viral Agent: A Review. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 8(3), pp. 100–104.

Ελληνική βιβλιογραφία

1. Θρασυβούλου, Α., Μανίκης Ι., Τανανάκη Χ., Τσέλλιος, Καραμπουρνιώτη Σ. και Δήμου Μ. (2002). *Η ταυτότητα του ελληνικού μελιού, φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που στηρίζουν την ποιότητα του προϊόντος*, 1ο Επιστημονικό Συνέδριο Μελισσοκομίας –Σηροτροφίας, Αθήνα, 29 Νοεμβρίου–1 Δεκεμβρίου 2002.
2. Θρασυβούλου, Α. (2005). Πρακτική μελισσοκομία. Εκδόσεις Μελισσοκομική Επιθεώρηση, Επανομή Θεσσαλονίκης, pp. 22-26, 180-190.
3. Καμαράτος, Α., Βέρρας, Χ., Τζιρόγιαννης, Κ., Κανέλλος, Η., Μπακάλης, Ι., Δημητριάδου, Α., Ηρακλειανού, Σ. και Μελιδώνης, Α. (2012). Επιθέματα μελιού Manuka για τη θεραπεία ελκών του νευροπαθητικού διαβητικού ποδιού. *Επιστημονικά Χρονικά*, 17(3), pp. 153-157.
4. Νικολαΐδης, Ι. (2005). Μελισσοκομία Σύγχρονες μέθοδοι εντατικής εκμετάλλευσης, 8^η έκδοση. Αθήνα, p. 273.
5. Παπαδόπουλος, Η. (2014). Μέλισσα εκτροφή και νοσήματα. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη, pp. 26-28, 139-149.
6. Πόγγας, Ν. και Χαρβάλου, Α. (2008). Ιατρική Μικροβιολογία Ι. Εκδόσεις Οδυσσέας, Αθήνα, pp. 54-56.
7. Υφαντίδης, Δ. (2005). Η σύγχρονη μελισσοκομία ως επιστήμη και πράξη, pp. 505-506.

8. Χαριζάνης, Π. (2014). Μέλισσα και μελισσοκομική τεχνική, Γ' έκδοση, Αθήνα, pp. 201-202.

Ιστοσελίδες

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