

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Αντιβακτηριακή δράση ποικίλων τύπων Ελληνικού
μελιού διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης
έναντι *Pseudomonas aeruginosa*

Antibacterial activity of various types of Greek honey of
different geographical origin against *Pseudomonas*
aeruginosa



Αντώνογλου Δημήτριος του Γεωργίου

2020

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Μόσιαλος Δημήτριος (επιβλέπων): Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Αμούτζιας Γρηγόριος: Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοπληροφορικής με έμφαση στην Μικροβιολογία του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δημητρίου Τηλέμαχος: Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό του εργαστηρίου Μικροβιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Μόσιαλο Δημήτριο για την εξαιρετική συνεργασία μας.

Επιπλέον, εκφράζω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της επιτροπής κ. Αμούτζια Γρηγόριο και κ. Δημητρίου Τηλέμαχο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Τσαδήλα Χριστίνα για τη συνεχή καθοδήγηση που μου παρείχε.

Περιεχόμενα

| | |
|--|----|
| Περίληψη..... | 6 |
| Abstract..... | 7 |
| 1. Εισαγωγικό μέρος | |
| 1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 8 |
| 1.2 Το μέλι..... | 10 |
| 1.2.1 Σύσταση μελιού..... | 11 |
| 1.2.2 Αντιβακτηριακή δράση..... | 11 |
| 1.2.3 Αντιοξειδωτική δράση..... | 14 |
| 1.2.4 Αντικαρκινική δράση..... | 15 |
| 1.2.5 Αντιφλεγμονώδης δράση και επούλωση πληγών..... | 16 |
| 1.2.6 Αντι-ιική δράση..... | 16 |
| 1.3 Είδη μελιού που χρησιμοποιήθηκαν..... | 17 |
| 1.3.1 Μέλι Manuka..... | 17 |
| 1.3.2 Πευκόμελο..... | 18 |
| 1.3.3 Βαμβακόμελο..... | 18 |
| 1.3.4 Μέλι ελάτης..... | 19 |
| 1.3.5 Θυμαρίσιο μέλι..... | 19 |
| 1.3.6 Μέλι ερείκης..... | 20 |
| 1.3.7 Μέλι καστανιάς..... | 20 |
| 2. Πειραματικό μέρος | |
| 2.1 Σκοπός της μελέτης..... | 21 |
| 2.2 Μέθοδοι και υλικά..... | 21 |
| 2.3 Εκτίμηση της αντιβακτηριακής δράσης δειγμάτων μελιού μέσω προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum inhibitory concentration, MIC)..... | 23 |
| 2.4 Εκτίμηση του μηχανισμού της αντιβακτηριακής δράσης του μελιού μέσω προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης(MIC) μετά από προσθήκη Α) καταλάσης και Β) πρωτεϊνάσης Κ..... | 26 |

| | |
|--|-----------|
| 3. Αποτελέσματα | |
| 3.1 Εκτίμηση της αντιβακτηριακής δράσης δειγμάτων μελιού μέσω προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum inhibitory concentration, MIC)..... | 27 |
| 3.2 Εκτίμηση του μηχανισμού της αντιβακτηριακής δράσης του μελιού μέσω προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης(MIC) μετά από προσθήκη Α) καταλάσης και Β) πρωτεΐνάσης Κ..... | 30 |
| 4. Συζήτηση..... | 37 |
| 5. Βιβλιογραφία..... | 38 |

Περίληψη

Το μέλι αποτελεί ένα από τα πολλά προϊόντα που παράγουν οι μέλισσες (*Apis mellifera*), μαζί με την πρόπολη, το κερι, το βασιλικό πολτό και το δηλητήριο, και κατέχει σημαντικά οφέλη για την υγεία του ανθρώπου. Η χρησιμότητα του είχε γίνει γνωστή από την αρχαιότητα όπου, πέρα από αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής των ανθρώπων, χρησιμοποιούνταν ευρέως και για τη θεραπεία πληγών. Οι εξαιρετικές φαρμακευτικές ικανότητες του μελιού έχουν αρχίσει να επαναξιολογούνται τις τελευταίες δεκαετίες, λόγω της αυξημένης συχνότητας διαφόρων ασθενειών και της αυξημένης εμφάνισης βακτηρίων με ανθεκτικότητα σε διάφορα αντιβιοτικά. Έτσι, η ανάγκη παρασκευής νέων φαρμάκων έχει οδηγήσει σε αξιολόγηση της χρήσης του μελιού καθώς έχει αποδειχθεί σε πολλές μελέτες η αποτελεσματικότητά του ως αντιμικροβιακός παράγοντας. Συγκεκριμένα για τα βακτήρια, δεν έχει βρεθεί κάποιου είδους ανθεκτικότητα σε αυτό, και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά συγκεκριμένων πολύ επικίνδυνων για τον άνθρωπο βακτηρίων έχει αυξηθεί, καθίσταται επιτακτική η μελέτη πολλών διαφορετικής προέλευσης μελιών. Μέχρι στιγμής, η πλειοψηφία της έρευνας που έχει πραγματοποιηθεί αφορά το μέλι Manuka, που παράγεται από το θάμνο *Leptospermum scoparium* και το οποίο αναμφισβήτητα εμφανίζει σημαντικές αντιβακτηριακές, και όχι μόνο, ιδιότητες λόγω ορισμένων πολύ δραστικών ουσιών που περιέχει, η κυριότερη εκ των οποίων είναι η μεθυλγλυοξάλη (MGO). Όμως, κατά καιρούς έχουν δημοσιευθεί μελέτες που επιδεικνύουν αντίστοιχες ή και καλύτερες αντιβακτηριακές ικανότητες από άλλα μέλια, πολλά από τα οποία παράγονται στη χώρα μας και δεν έχουν μελετηθεί ιδιαίτερα.

Στο πλαίσιο αυτής της μελέτης εξετάστηκε η αντιβακτηριακή δράση 80 ελληνικών μελιών από διαφορετικές περιοχές σε σύγκριση με την αντιβακτηριακή δράση του μελιού Manuka. Τα μέλια που μελετήθηκαν προέρχονται από ποικίλα είδη φυτών, όπως από βαμβάκι, πεύκο, θυμάρι, καστανιά, έλατο και ερείκη. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να συγκριθεί η διαφορετική αντιβακτηριακή ικανότητα πολλών διαφορετικών μελιών. Το βακτήριο που χρησιμοποιήθηκε είναι η *Pseudomonas aeruginosa*, ένα από τα σημαντικότερα παθογόνα βακτήρια που προσβάλλει τον ανθρώπινο οργανισμό όταν πάσχει ήδη από κάποια άλλη ασθένεια, όπως η κυστική ίνωση. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της αντιβακτηριακής δράσης των δειγμάτων έναντι του συγκεκριμένου παθογόνου είναι ο προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης του μελιού (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοδότησης 96 θέσεων. Στη συνέχεια, μετά από σύγκριση των τιμών MIC των δειγμάτων και του Manuka έγινε εκτίμηση του πιθανού μηχανισμού της αντιβακτηριακής δράσης των δειγμάτων που είχαν MIC μικρότερο σε σχέση με το Manuka και σε μερικά που είχαν ίσο με αυτό. Οι πιθανοί μηχανισμοί που εξετάστηκαν είναι η αντιβακτηριακή δράση μέσω υπεροξειδίου του υδρογόνου και η δράση μέσω αντιβακτηριακών πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν καταλάση και πρωτεΐνάση K αντίστοιχα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, και τα 80 δείγματα εμφάνισαν αντιβακτηριακή δράση κατά της *P. aeruginosa*, οκτώ εκ των οποίων έδειξαν ισχυρότερη δράση από το Manuka. Όσον αφορά τους μηχανισμούς δράσης, ελέγχθηκαν 27 δείγματα εκ των οποίων τα 8 ήταν αυτά με καλύτερη από το Manuka δράση και τα υπόλοιπα 19 είχαν το ίδιο καλή δράση με αυτό. Ο κυρίαρχος μηχανισμός εκ των δύο στα συγκεκριμένα δείγματα φάνηκε να είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου, καθώς η καταλάση προκάλεσε αύξηση του MIC σε όλα τα δείγματα εκτός από ένα, ενώ η πρωτεΐνάση K προκάλεσε αύξηση του MIC σε 16 δείγματα.

Abstract

Honey is one of the many products produced by honeybees (*Apis Melifera*), along with propolis, beeswax, royal jelly and bee venom, and it holds many valuable benefits for human health. Its value was first recognized during ancient times where, apart from being an important food in people's diet, it was widely used as a wound healing agent. The excellent pharmaceutical capabilities of honey have been revisited the last few decades because of the increase in frequency of various diseases and the rise in pathogens with resistance to various antibiotics. Therefore, the need for increased production of new medicine has led to the assessment of the use of honey, since its properties as an antimicrobial agent have been shown in many researches. Specifically for bacteria, there hasn't been found any specific resistance towards honey, and in view of the fact that resistance towards antibiotics has been constantly increasing, the need of studying the properties of different types of honey has arisen. Until now, the majority of research conducted has been on Manuka honey, produced from a bush called *Leptospermum scoparium*, which is an undoubtedly multipotent honey that exhibits powerful antibacterial activity owing to the presence of various bioactive compounds, the most important of which is methylglyoxal (MGO). However, there have been publications that prove equal or higher antibacterial activity of various types of honey, many of which are produced in our country and have been barely studied.

In this study, the antibacterial activity of 80 different Greek honeys from different locations was determined in comparison with the antibacterial activity of Manuka honey. The honeys studied have different plant origin, such as from cotton, thyme, chestnut, heather, fir and pine. This way the antibacterial activity of different types of honey can be compared to each other's as well. The microorganism used for this study was *Pseudomonas aeruginosa*, which is a very important pathogen that infects mostly patients suffering from other diseases, such as cystic fibrosis. The assay used in this study is the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of the samples by using 96-well microtiter plates. Moreover, after comparison of the MIC values of the samples and Manuka, the mechanism of action for the antibacterial activity was determined for the samples that had an equal or lower MIC value than Manuka. The possible mechanisms examined were the presence of hydrogen peroxide and/or antibacterial peptides and proteins. Therefore, catalase and proteinase K were used respectively in order to uncover the presence of those mechanisms.

According to the results, all of the 80 samples examined have antibacterial activity against *P. aeruginosa*, 8 of which have a more potent activity than Manuka honey. In terms of the mechanisms of that activity, 27 honey samples were examined further with 8 out of them being the ones that showed better results than Manuka honey and the remaining 19 being a few of the ones that showed equal MIC value. Hydrogen peroxide seemed to be the prevalent mechanism of the 2 as the use of catalase lead to an increase of the MIC value of all the samples except for 1, whereas proteinase K caused the increase of the MIC value for 16 out of 27 samples examined.

1.Εισαγωγικό μέρος

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένα αρνητικό κατά Gram ραβδόμορφο βακτήριο που ανήκει στην οικογένεια των *Pseudomonadaceae*. Τα βακτήρια αυτής της οικογένειας μπορεί να διαφέρουν αρκετά στο μέγεθος, αλλά συνήθως έχουν μήκος 1,5-3 μm και πλάτος 0,5 μm. Στο περιβάλλον μπορούν να εντοπιστούν μόνοι τους, σε ζεύγη ή σε μικρές αλυσίδες. Επίσης, διαθέτουν ένα πολικό μαστίγιο χάρη στο οποίο αποκτούν σημαντική κινητικότητα (Stratton,1983). Η εξωτερική μεμβράνη της *P. aeruginosa* χαρακτηρίζεται από μικρή διαπερατότητα λόγω της έκφρασης συγκεκριμένων πορινών και λιποπρωτεϊνών. Αυτές οι πρωτεΐνες προσδίδουν πολλές ικανότητες στο βακτήριο, όπως είναι η ενεργή και παθητική μεταφορά μορίων, η προσκόλληση σε κύτταρα και η ενεργοποίηση της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά μέσω διαφόρων μηχανισμών. Η πεπτιδογλυκάνη είναι ένα ακόμη σημαντικό συστατικό του περιβλήματος που βρίσκεται κάτω ακριβώς από την εξωτερική μεμβράνη και έχει ως κύριο ρόλο την παροχή μηχανικής αντοχής και σταθερότητας στο βακτήριο και την εξισορρόπηση της οσμωτικής πίεσης του κυτταροπλάσματος. Αποτελείται από γραμμικές αλυσίδες εναλασσόμενων αμινοσακχάρων, της N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνης και του N-ακέτυλο-μουραμικού οξέος(Curran et al., 2018).



Εικόνα 1: *Pseudomonas aeruginosa*

Ως παθογόνο βακτήριο η *P. aeruginosa* μπορεί να μολύνει ένα μεγάλο εύρος οργανισμών. Σε αυτούς περιλαμβάνονται θερμόαιμα και ψυχρόαιμα σπονδυλωτά, έντομα, φυτά και ζώα της ξηράς και της θάλασσας. Μέσω του μαστιγίου και άλλων στοιχείων της εξωτερικής μεμβράνης έχει την ικανότητα να εισέρχεται στα επιθηλιακά κύτταρα των πνευμόνων, γεγονός που απαιτεί αποδυναμωμένους στενοσυνδέσμους. Αυτό επιτυγχάνεται κατά τον κυτταρικό θάνατο ή πολλαπλασιασμό σε συνδυασμό με παραγωγή εξωτοξινών. Για το λόγο αυτό αποτελεί ένα από τα πιο συχνά νοσοκομειακά παθογόνα βακτήρια και μπορεί να προκαλέσει σοβαρές λοιμώξεις σε ασθενείς που πάσχουν από κάποια άλλη ασθένεια, όπως η κυστική ίνωση. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί σύνδεση της μολυσματικότητας του βακτηρίου με λήψη συγκεκριμένων αντιβιοτικών τα οποία προκαλούν αλλαγές στο μικροβίωμα των πνευμόνων και σε στοιχεία του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως είναι τα μακροφάγα που βρίσκονται εκεί (Curran et al., 2018). Υπάρχουν και πολλά παράγωγα μόρια του βακτηρίου που ενισχύουν την παθογένεια του. Μια σημαντική κατηγορία είναι οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS), μόρια τα οποία αναγνωρίζονται από υποδοχείς του κυττάρου ξενιστή, καθώς και ένας μεγάλος αριθμός εξωτοξινών με πιο ισχυρή από αυτές την εξωτοξίνη A, που μπορεί να

αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση. Σημαντική είναι και η λευκοσιδίνη που έχει την ικανότητα να προκαλεί θάνατο των λευκοκυττάρων του ασθενή. Το βακτήριο παράγει επίσης και μεγάλο αριθμό ενζύμων, τα οποία συμβάλλουν στην παθογένεια του. Τέτοια είναι η ελαστάση, η κολλαγενάση, πρωτεάσες, φωσφολιπάσες και η λεκιθινάση. Ένας άλλος λόγος που η *P.aeruginosa* είναι ένα από τα πιο επικίνδυνα παθογόνα βακτήρια είναι η ανθεκτικότητα σε αντιμικροβιακούς παράγοντες. Το γονιδίωμα της φέρει μια πληθώρα αμυντικών γονιδίων, τα οποία εντοπίζονται τόσο στο χρωμόσωμα όσο και στα πλασμίδια. Με τον τρόπο αυτό πολλά αντιβιοτικά καθίστανται μη αποτελεσματικά και για το λόγο αυτό διεξάγεται συνεχής έρευνα για βελτίωση τους ή παραγωγή νέων (Stratton, 1983).

Η *P. aeruginosa* αναπτύσσεται στα περισσότερα θρεπτικά μέσα σε θερμοκρασίες από 30°C μέχρι 37°C και ως υποχρεωτικά αερόβιο βακτήριο απαιτείται οξυγόνο για την ανάπτυξη της, αν και έχει παρατηρηθεί μικρή ανάπτυξη και απουσία οξυγόνου με την παρουσία νιτρικών. Η μορφολογία των αποικιών του βακτηρίου μπορεί να διαφέρει, και μάλιστα έχουν παρατηρηθεί τεσσάρων ειδών διαφορετικές αποικίες. Η πιο συχνή από αυτές εμφανίζει επίπεδη μορφολογία με 1-5mm διάμετρο, τραχιά επιφάνεια και ακανόνιστα άκρα. Άλλες αποικίες μπορεί να εμφανίζουν διαφορές στο μέγεθος και να μην είναι τόσο επίπεδες, ενώ υπάρχουν και αυτές που χαρακτηρίζονται από μια βλενώδη υφή, χαρακτηριστική των ασθενών με κυστική ίνωση. Σε μια καλλιέργεια *P. aeruginosa* συχνά διακρίνεται και μια χρωστική, η πυοκυανίνη, η οποία διαχέεται στο θρεπτικό μέσο προσδίδοντας μπλε ή μπλε-πράσινο χρώμα. Η παρουσία αυτής της χρωστικής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ταυτοποίηση του βακτηρίου αλλά η απουσία της δεν αποκλείει την ύπαρξη του. Μια άλλη χρωστική που παράγεται συχνά από τα περισσότερα στελέχη είναι η πυοβερδίνη, μια υδατοδιαλυτή πτεριδίνη που προσδίδει κίτρινο χρώμα στην καλλιέργεια. Η ανίχνευση αυτής της χρωστικής μπορεί να πραγματοποιηθεί και με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας λόγω του παραγόμενου φθορισμού. Τέλος, μια καλλιέργεια *P. aeruginosa* έχει χαρακτηριστική οσμή, που οφείλεται στην παραγόμενη από την τρυπτοφάνη 2-αμινοακετοφαινόνη (Stratton,1983).



Εικόνα 2: καλλιέργεια *Pseudomonas aeruginosa* σε τρυβλίο

1.2 Το μέλι

Το μέλι είναι ένα από τα πιο εκτιμημένα και πολύτιμα φυσικά προϊόντα, γνωστό στην ανθρωπότητα από την αρχαιότητα. Παράγεται από το νέκταρ των λουλουδιών που συλλέγουν οι μέλισσες (*Apis mellifera*) και έχει σημαντική θρεπτική αξία και φαρμακευτικές ιδιότητες. Μέλια από νέκταρ διαφορετικών φυτικών πηγών διαφέρουν στο χρώμα, στη γεύση, στην οσμή και σε άλλες ιδιότητες όπως οι αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές. Στην αρχαιότητα χρησιμοποιούνταν ως φυσικό γλυκαντικό λόγω των υψηλών επιπέδων φρουκτόζης που το καθιστούν 25% πιο γλυκό από τη ζάχαρη. Η οσμή του οφείλεται κυρίως σε διάφορους εστέρες, αλκοόλες και αλδεΐδες. Τα οφέλη του για την ανθρώπινη υγεία έχουν μελετηθεί εδώ και πολλά χρόνια και έχει αποδειχθεί η χρησιμότητά του ως αντιοξειδωτικός, αντιφλεγμονώδης, αντιβακτηριακός και αντιδιαβητικός παράγοντας καθώς και ως μέσο που προάγει την καλή λειτουργία του αναπνευστικού, του καρδιαγγειακού και του νευρικού συστήματος (Samarghandian et al., 2017).

Η παραγωγή του μελιού ολοκληρώνεται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο γίνεται συλλογή του νέκταρ από τις μέλισσες, το οποίο στη συνέχεια ενοποιείται με διάφορες φαρυγγειακές εκκρίσεις από τις μέλισσες. Έπειτα το νέκταρ αποθηκεύεται στην κυψέλη όπου ωριμάζει με την παράλληλη απομάκρυνση της υγρασίας του μέσω της συμβολής των εργατριών μελισσών, αποδίδοντας τελικά το ώριμο μέλι (Maddocks et al., 2013).



Εικόνες 3 και 4: Το μέλι και η μέλισσα, *Apis mellifera*

1.2.1 Σύσταση μελιού

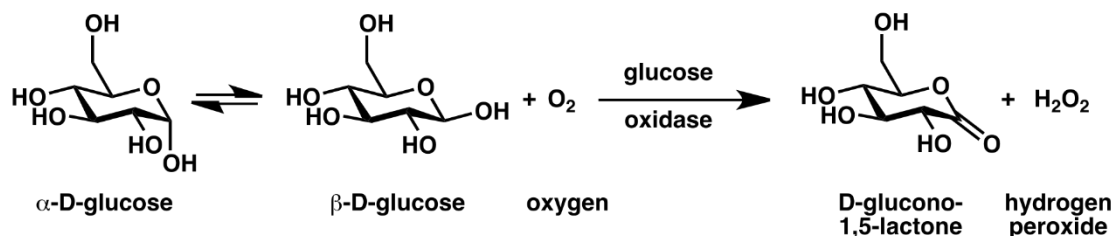
Υπάρχουν πάνω από 300 διαφορετικά είδη μελιών, με την ποικιλότητα αυτή να οφείλεται στα διαφορετικά είδη νέκταρ που μπορούν να συλλέξουν οι μέλισσες. Το βασικό συστατικό του μελιού είναι οι υδατάνθρακες σε ποσοστό 95-97% του ξηρού του βάρους. Επιπρόσθετα, το μέλι περιλαμβάνει ενώσεις όπως πρωτεΐνες, βιταμίνες, αμινοξέα, μέταλλα και οργανικά οξέα, καθώς και φλαβονοειδή, πολυφαινόλες, αναγωγικές ενώσεις, αλκαλοειδή, γλυκοσίδες, και ανθρακινόνη. Οι μονοσακχαρίτες φρουκτόζη και γλυκόζη είναι τα πιο σημαντικά σάκχαρα του μελιού και σε αυτά αποδίδεται το μεγαλύτερο μέρος της θρεπτικής αξίας του. Άλλες ενώσεις με διατροφική αξία είναι δισακχαρίτες όπως η σουκρόζη, γαλακτόζη, α και β-τρεχαλόζη και τρισακχαρίτες όπως η μελεζιτόζη και η μαλτοτριόζη. Πολλές από αυτές τις ουσίες σχηματίζονται κατά την ωρίμανση και βρίσκονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις από τους μονοσακχαρίτες. Το γλυκονικό οξύ, ένα ακόμα σημαντικό συστατικό, είναι το κύριο οργανικό οξύ στο μέλι που μαζί με τα ακετικό, φορμικό και κιτρικό οξύ είναι υπεύθυνα για το χαμηλό pH (Samarghandian et al., 2017).

Από τα αμινοξέα, η προλίνη βρίσκεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, ενώ τα ένζυμα διαστάση, ινβεράση, οξειδάση της γλυκόζης, καταλάση και όξινη φωσφατάση αποτελούν τα κύρια πρωτεϊνικά συστατικά του μελιού. Τα επίπεδα βιταμινών είναι σχετικά χαμηλά, όμως περιλαμβάνονται όλες οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες με την βιταμίνη C να έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση. Όσον αφορά τα μέταλλα, έχουν βρεθεί 31 μέταλλα στο μέλι, όπως φωσφόρος, νάτριο, κάλιο, ασβέστιο, θείο, μαγνήσιο και λίθιο. Στο μέλι μπορούν να εντοπιστούν και περίπου 600 πτητικές ενώσεις σε χαμηλές συγκεντρώσεις, όπως αλδεΐδες, αλκοόλες, υδατάνθρακες, κετόνες, όξινοι εστέρες, βενζόλιο και τα παράγωγα του, φουράνιο και κυκλικές ενώσεις. Τα φλαβονοειδή και οι πολυφαινόλες είναι βασικές βιοδραστικές ουσίες με αντιοξειδωτική δράση. Έχουν βρεθεί 39 διαφορετικά είδη πολυφαινόλων, αλλά δεν υπάρχουν όλες και σε ίδιες συγκεντρώσεις σε όλα τα μέλια καθώς αυτό εξαρτάται από τη φυτική πηγή, το κλίμα και τις γεωγραφικές συνθήκες (Samarghandian et al., 2017).

1.2.2 Αντιβακτηριακή δράση

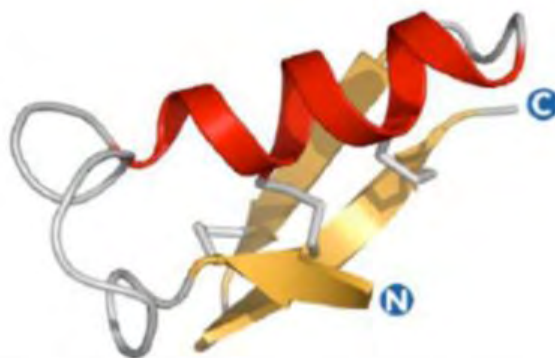
Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες είναι πολύ σημαντικοί για την μείωση της κατανομής μολυσματικών ασθενειών. Όμως, καθώς αναπτύσσονται και εξαπλώνονται ανθεκτικά στελέχη βακτηρίων, η αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών ολοένα και μειώνεται, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο ασθενειών που προκαλούνται από βακτήρια. Συνεπώς, είναι ύψιστης σημασίας η εύρεση εναλλακτικών θεραπευτικών προσεγγίσεων, οδηγώντας στην επανεκτίμηση αρχαίων φαρμάκων, όπως διάφορα φυτά και προϊόντα που σχετίζονται με αυτά, συμπεριλαμβανομένου του μελιού. Το μέλι εμφανίζει σημαντική βακτηριοστατική και βακτηριοκτόνο δράση έναντι πολλών παθογόνων βακτηρίων του ανθρώπου, κυρίως θετικών κατά Gram βακτηρίων (Dzuga et al., 2018). Συγκεκριμένα, το μέλι από το φυτό *Leptospermum scoparium*, που ονομάζεται Manuka και είναι ένα από τα πιο γνωστά και μελετημένα μέλια, έχει βρεθεί ότι είναι αποτελεσματικό έναντι πολλών παθογόνων βακτηρίων του ανθρώπου. Ωστόσο, πολλά άλλα ανερχόμενα μέλια ενδέχεται να εμφανίζουν πλεονεκτήματα, όπως είναι η μεγαλύτερη αντιμικροβιακή ικανότητα, η αυξημένη τοπική παραγωγή και η ενισχυμένη δράση κατά συγκεκριμένων ειδών μικροοργανισμών (Lusby et al., 2005).

Η αντιμικροβιακή ικανότητα του μελιού οφείλεται σε πολλούς παράγοντες, που μπορεί να είναι: α) Το υψηλό ιξώδες, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων και της χαμηλής περιεκτικότητας σε νερό, κάτι που δημιουργεί ένα προστατευτικό φραγμό κατά της ανάπτυξης βακτηρίων. β) Η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων στο μέλι που προκαλεί την αύξηση της οσμωτικής πίεσης και οδηγεί στην μεταφορά νερού από το εσωτερικό των βακτηρίων στο περιβάλλον τους. Επομένως, τα βακτήρια αφυδατώνονται και δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να αναπτυχθούν. γ) Η οξύτητα του μελιού, με pH μεταξύ 3,2 και 4,5 είναι ένας εξίσου σημαντικός παράγοντας καθώς τα περισσότερα βακτήρια αναπτύσσονται σε βέλτιστα pH από 6,5 έως 7,5. Η οξύτητα οφείλεται στην παρουσία οργανικών οξέων, κυρίως του γλυκονικού. Εντούτοις, δεν επαρκεί από μόνη της για την αναστολή λόγω της αραιώσης που υφίσταται το μέλι. δ) Το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂) είναι ένα σημαντικός παράγοντας με έντονη αντιβακτηριακή δράση στο μέλι. Παράγεται από τη γλυκόζη με τη δράση του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης, το οποίο ενεργοποιείται όταν το μέλι αραιώνεται. Σε φυσιολογικές συνθήκες δεν είναι ενεργό λόγω του χαμηλού pH.



Εικόνα 5: Παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου από γλυκόζη

ε) Άλλες ενώσεις όπως η μεθυλγλυοξάλη(MGO), μια οργανική ένωση που βρίσκεται σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις στο μέλι Manuka, στο οποίο θεωρείται πως είναι ο κύριος συντελεστής της αντιβακτηριακής του ικανότητας. στ) Έχει επίσης βρεθεί η ύπαρξη στο μέλι διαφόρων αντιμικροβιακών πεπτιδίων(Albaridi,2019).Μια σημαντική κατηγορία είναι οι ντεφενσίνες, πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από ιδιαίτερα πολυμορφικά γονίδια. Διακρίνονται σε τύπου 1 και 2, με την τύπου 1 να αποτελεί συστατικό του μελιού και του βασιλικού πολτού, ενώ η τύπου 2 συμμετέχει περισσότερο στην ανοσία της μέλισσας(Ilyason et al., 2012). Η ντεφενσίνη τύπου 1 παράγεται στους σιελογόνους αδένες της μέλισσας και ενσωματώνεται στο μέλι κατά την πρωταρχική του επεξεργασία. Στο Manuka η ντεφενσίνη τύπου 1 είναι τροποποιημένη σε σχέση με άλλα μέλια και αυτό θεωρείται πως είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης με τη μεθυλγλυοξάλη (Maddocks et al., 2013).



Εικόνα 6: Τριτοταγής δομή της ντεφενσίνης-1 του μελιού. (Alvarez-Suarez et al., 2014)

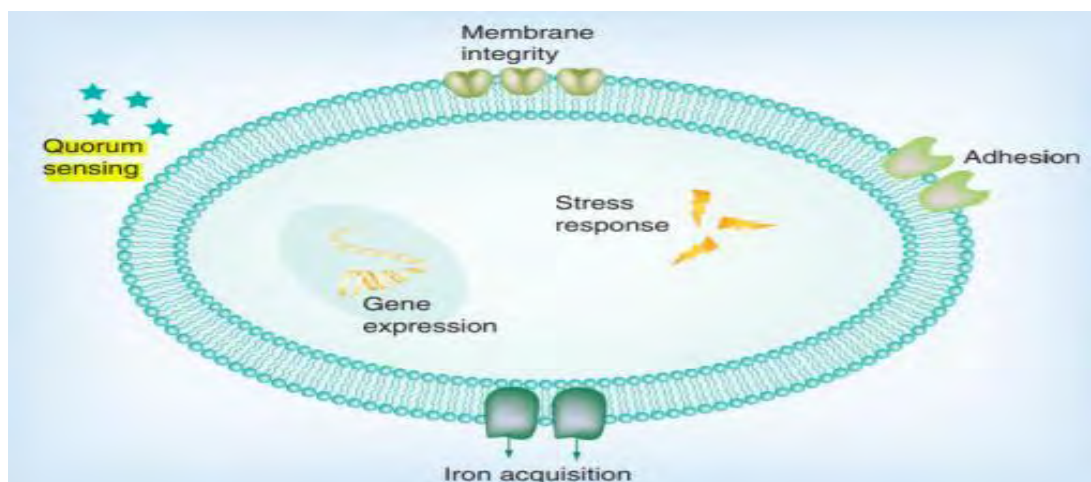
Διαφορές ανάμεσα στην αντιβακτηριακή ικανότητα διαφορετικών μελιών μπορεί να οφείλονται και στην διαφορετική γεωγραφική και φυτική προέλευση, καθώς επίσης και στις συνθήκες συγκομιδής, επεξεργασίας και αποθήκευσης (Mandal et al., 2011). Φαίνεται πως υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στο είδος και την προέλευση του νέκταρ και στη συγκέντρωση υπεροξειδίου και MGO (Alvarez-Suarez et al., 2014).

Μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί ανθεκτικότητα των βακτηρίων στο μέλι, όπως έχουν δείξει πειράματα με χρήση μελιού Manuka (Blair et al., 2009, Cooper et al., 2010). Ένας λόγος για τον οποίον μπορεί να συμβαίνει αυτό είναι μια πιθανή συνεργική δράση των διαφόρων συστατικών του μελιού, η οποία να ασκεί πίεση σε πολλούς μηχανισμούς του βακτηρίου, με αποτέλεσμα την ανικανότητα του να ανταποκριθεί εγκαίρως. Αυτό θα ήταν και ένα σημαντικό πλεονέκτημα έναντι των αντιβιοτικών, που συνήθως στοχεύουν σε έναν μόνο μηχανισμό του βακτηρίου, όπως η αντιγραφή, η μετάφραση και η σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Συνεπώς, η εξελικτική πίεση που ενδεχομένως ασκεί το μέλι είναι τόσο ισχυρή που να μην υπάρχει το περιθώριο για εμφάνιση ανθεκτικότητας σε αυτό (Maddocks et al., 2013). Ενδεικτικά, η βακτηριοκτόνος δράση του μελιού έχει βρεθεί πως μπορεί να οφείλεται στην αποικοδόμηση του DNA, στην αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και στην καταστροφή δομικών στοιχείων των βακτηρίων, που οδηγεί σε αλλαγές στο σχήμα και στην επιφάνεια τους. Επίσης, τα μονοανθικά μέλια μπορούν να εμποδίζουν την πρόσδεση βακτηρίων σε ιστούς, που είναι απαραίτητο βήμα για τη μόλυνση, και αναστέλλουν το σχηματισμό βιοφίλμ (Israïli, 2013).

Ο σχηματισμός βιοφίλμ, δηλαδή η στενή προσκόλληση βακτηρίων μεταξύ τους μέσω της έκκρισης διαφόρων ουσιών, είναι ένας σημαντικός μηχανισμός της μολυσματικότητας των βακτηρίων, καθώς πολλές φορές τα βακτήρια που το αποτελούν καθίστανται ανθεκτικά στη δράση αντιβιοτικών, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο εμφάνισης χρόνιων μολύνσεων. Το μέλι έχει βρεθεί πως μπορεί να διασπάσει το βιοφίλμ με διάφορους τρόπους: α) Η υψηλή περιεκτικότητα του μελιού σε γλυκόζη και φρουκτόζη φαίνεται πως παρεμβάλλεται ανάμεσα στα βακτήρια, εμποδίζοντας την προσκόλληση των κυττάρων, όπως έχουν δείξει μελέτες στην *P. aeruginosa* (Lerrer et al., 2007) β) Στον *Staphylococcus pyogenes* η προσκόλληση προς σχηματισμό βιοφίλμ σε μια πληγή επιτυγχάνεται μέσω της σύνδεσης δύο συγκολλητινών (Sof και SfbI) στην φμπρονεκτίνη, μια εξωκυτταρική γλυκοπρωτεΐνη που επιτρέπει τη προσκόλληση των βακτηρίων στα κύτταρα της πληγής του ξενιστή. Αυτή η σύνδεση μπορεί να διασπαστεί από τις υψηλές συγκεντρώσεις MGO του Manuka, που μπορούν να μειώσουν την έκφραση των συγκολλητινών (Maddocks et al., 2012) γ) Η μεθυλγλυοξάλη μπορεί άμεσα να εισέρχεται στο βιοφίλμ και να προκαλεί θάνατο βακτηρίων που το αποτελούν, σε βακτήρια όπως το *Proteus mirabilis* και το *Enterobacter cloacae* (Majtan et al., 2013). Διαπιστώθηκε πως συγκεντρώσεις Manuka 0,5% w/v, δηλαδή πολύ μικρότερες από την τιμή της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης του (MIC), ήταν ικανές να εμποδίσουν το σχηματισμό βιοφίλμ (Maddocks et al., 2013).

Ένας άλλος μηχανισμός που επηρεάζεται από τη δράση του μελιού είναι η αίσθηση μεγέθους πληθυσμού (Quorum sensing), όπως έχουν δείξει πειράματα με μέλι Manuka σε *P. aeruginosa* (Kronka et al., 2013). Ως αίσθηση μεγέθους πληθυσμού αναφέρεται η ικανότητα των βακτηρίων να επάγουν τη ρύθμιση διαφορετικών γονιδίων τους ανάλογα με την πυκνότητα του βακτηριακού πληθυσμού στον οποίον ανήκουν. Μια ομάδα παραγόντων μολυσματικότητας η έκφραση των οποίων ρυθμίζεται από το μηχανισμό αυτό είναι τα σιδηροφόρα. Τα μόρια αυτά στην *P. aeruginosa* είναι η πυοβερδίνη και η πυοχελίνη και

προσδίδουν στο βακτήριο την ικανότητα να συσσωρεύει σίδηρο από το περιβάλλον του, γεγονός το οποίο σχετίζεται άμεσα με την παθογένεια του και είναι πολύ σημαντικό για τη δημιουργία αποικιών. Έχει βρεθεί πως το μέλι Manuka έχει τη δυνατότητα να μειώνει την έκφραση γονιδίων που εξαρτώνται από την αίσθηση μεγέθους πληθυσμού καταλήγοντας στη μείωση της έκφρασης σιδηροφόρων, και κατά συνέπεια μειώνοντας τη μολυσματικότητα του βακτηρίου (Wang et al., 2012).



Εικόνα 7: Σύνοψη των βασικότερων αντιβακτηριακών μηχανισμών του μελιού Manuka (Maddocks et al., 2013)

Συμπερασματικά, το μέλι ασκεί την αντιβακτηριακή του δράση λειτουργώντας τόσο ως βακτηριοκτόνο όσο και βακτηριοστατικό μέσω της αναστολής διαφόρων μηχανισμών του βακτηρίου. Κατά συνέπεια, και δεδομένου της δυσκολίας αντιμετώπισης συγκεκριμένων βακτηριακών μολύνσεων, το μέλι μπορεί να χορηγηθεί ενδεχομένως μελλοντικά σε συνδυασμό με αντιβιοτικά για την αντιμετώπιση βακτηριακών ασθενειών (Maddocks et al., 2013).

1.2.3 Αντιοξειδωτική δράση

Ως οξειδωτικές ουσίες χαρακτηρίζονται οι ισχυρά δραστικές ουσίες οι οποίες δέχονται ηλεκτρόνια σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και οδηγούν τελικά στην παραγωγή ελεύθερων ριζών, δηλαδή ουσιών με ένα ελεύθερο μονήρες ηλεκτρόνιο. Μεταξύ αυτών κυρίαρχο ρόλο φαίνεται να έχουν οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), όπως το μονήρες οξυγόνο, η σουπεροξειδική ανιονική ρίζα, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, η ρίζα υδροξυλίου καθώς επίσης και το όζον και το νιτροξειδίο που συμπεριφέρονται όπως οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Η παραγωγή αυτών γίνεται συνήθως ενδογενώς κατά τον αερόβιο μεταβολισμό των οργανισμών στα μιτοχόνδρια ή μέσω χημικής μετατροπής ασταθών μορίων σε άλλα μέσω μη συχνών χημικών αντιδράσεων όπως η αυτοξείδωση (Erejuwa et al., 2012). Επίσης, δραστικές ρίζες μπορούν να παραχθούν και ως απόκριση σε φλεγμονή όταν τα φαγοκύτταρα τις απελευθερώνουν ως άμυνα κατά των βακτηρίων. Τέλος, παραγωγή ριζών μπορεί να συμβεί μέσω επίδρασης εξωγενών παραγόντων όπως είναι ο καπνός του τσιγάρου, οι ιονίζουσες ακτινοβολίες, οι οργανικοί διαλύτες, ορισμένοι ρύποι, τα φυτοφάρμακα κ.ά. (Θρασυβούλου και συν., 2002). Η ικανότητα των κυττάρων να εξουδετερώνουν τις ρίζες αυτές εξαρτάται από το σύστημα αντιοξειδωτικών που διαθέτουν, τα οποία μπορεί να είναι ενδογενή και εξωγενή. Τα ενδογενή αποτελούνται από τη δισμουτάση του σουπεροξειδίου, την καταλάση και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, όπως επίσης και μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά που είναι η γλουταθειόνη, οι βιταμίνες C και E και διάφορα μικρά μόρια. Τα

εξωγενή αντιοξειδωτικά αποτελούνται από θρεπτικά στοιχεία και άλλες ενώσεις που προέρχονται από εξωγενείς πηγές (Erejuwa et al., 2012).

Το μέλι μπορεί να συμβάλλει στην ανθρώπινη υγεία μέσω της λειτουργίας του ως αντιοξειδωτικό, καταστρέφοντας τις ρίζες αυτές. Οι υπεύθυνες ενώσεις για τις αντιοξειδωτικές ικανότητες είναι τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, οι βιταμίνες, ορισμένα ένζυμα και μια μικρή ποσότητα μετάλλων, κυρίως χαλκού και σιδήρου (Chua et al., 2013). Το χρώμα του μελιού θεωρείται ότι σχετίζεται άμεσα με την αντιοξειδωτική του ικανότητα. Όσο πιο σκουρόχρωμο είναι το μέλι τόσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα του σε φαινολικές ενώσεις και άρα τόσο μεγαλύτερη είναι η αντιοξειδωτική του ικανότητα (Shekilango et al., 2016).

Η αντιοξειδωτική δράση του μελιού μπορεί να συμβάλλει στην πρόληψη διαφόρων οξειών και χρόνιων διαταραχών όπως φλεγμονών, αλλεργιών, καρδιαγγειακών νοσημάτων, του διαβήτη και του καρκίνου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η στεφανιαία νόσος, όπου τα φλαβονοειδή δρώντας ως αντιοξειδωτικά, αντιθρομβωτικά και αντισπασμικά μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου μέσω της βελτίωσης της αγγειοδιαστολής, της μείωσης της ικανότητας πήξης των αιμοπεταλίων και της αναστολής των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, έρευνες έχουν δείξει πως η χορήγηση μελιού σε ποντικούς με σακχαρώδη διαβήτη αύξησε τη δράση του αντιοξειδωτικού συστήματός τους, μέσω της ενίσχυσης της δραστηριότητας της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης, της αναγωγής της γλουταθειόνης, της καταλάσης και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Samarghandian et al., 2017).

Όπως συμβαίνει και με την αντιβακτηριακή ικανότητα, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η φυτική προέλευση του μελιού. Σε σύγκριση με το Manuka έχει βρεθεί πως τα τοπικά μέλια μπορεί να έχουν ίση ή και καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα με αυτό. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στην ύπαρξη μεγαλύτερων συγκεντρώσεων πολυφαινόλων, είτε στην παρουσία πολυφαινόλων διαφορετικής χημικής σύστασης. Συνεπώς, θα ήταν σημαντική η έρευνα περισσότερων τοπικών μελιών ως πιθανά αντιοξειδωτικά (Stagkos et al., 2018).

1.2.4 Αντικαρκινική δράση

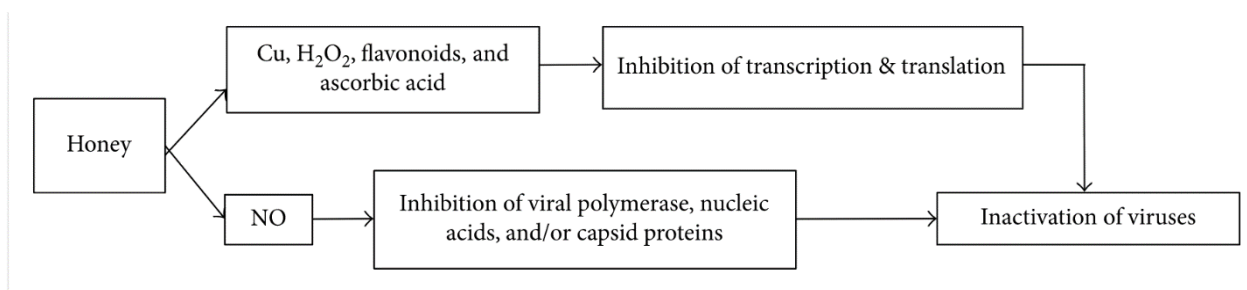
Το μέλι έχει επίσης την ικανότητα να προκαλεί απόπτωση σε πολλά είδη καρκινικών κυττάρων. Αυτό επιτυγχάνεται από τη ρύθμιση της έκφρασης προαποπτωτικών και αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών μέσω της δράσης των φαινολικών ενώσεων. Συγκεκριμένα, προκαλεί αύξηση της έκφρασης της p53, της κασπάσης 3 και της πρωτεΐνης Bax ενώ αντίθετα μειώνει την έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl2. Πειράματα με χρήση Manuka σε ποντίκια έχουν δείξει πως επιτυγχάνεται αποπτωτική δράση είτε με χορήγηση μελιού δια της στοματικής οδού είτε με ενδοφλέβια ένεση, λειτουργώντας με διαφορετικούς μηχανισμούς και στις δύο περιπτώσεις. Η ικανότητα να προκληθεί απόπτωση εξαρτάται από τη συγκέντρωση του μελιού και το είδος της κυτταρικής σειράς (Samarghandian et al., 2017). Τα φλαβονοειδή και οι φαινόλες στο μέλι μπορούν ακόμη να σταματήσουν τον κυτταρικό κύκλο καρκινικών κυττάρων του εντέρου στη φάση G0/G1 (Jaganathan et al., 2009). Επομένως, το μέλι έχει τη δυνατότητα να χρησιμεύσει μελλοντικά ως φυσικός αντικαρκινικός παράγοντας με τη ταυτόχρονη του χορήγηση με άλλους αποπτωτικούς παράγοντες.

1.2.5 Αντιφλεγμονώδης δράση και επούλωση πληγών

Από την αρχαιότητα ήταν γνωστή η συμβολή του μελιού στη θεραπεία πληγών. Το υψηλό ιξώδες του μελιού παρέχει προστασία γύρω από την πληγή, παρεμποδίζοντας την μόλυνση από μικροοργανισμούς. Παράλληλα, μειώνεται ο χρόνος της φλεγμονής, λόγω της ελάττωσης της παραγωγής και του πολλαπλασιασμού των φλεγμονωδών κυττάρων στην εστία της πληγής ενώ διεγείρεται ο πολλαπλασιασμός ινοβλαστών και επιθηλιακών κυττάρων (Alvarez- Suarez et al., 2014). Επίσης, το μέλι προκαλεί αύξηση της παραγωγής λεμφοκυττάρων, φαγοκυττάρων, μονοκυττάρων και μακροφάγων που απελευθερώνουν κυτοκίνες και ιντερλευκίνες όπως οι TNF- α , IL-1 β και IL-6, ενισχύοντας την απόκριση του ανοσοποιητικού και επιταχύνοντας την επούλωση (Ahmed et al., 2018). Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων σε μια πληγή μπορεί να επαχθεί και από το υπεροξειδίο του υδρογόνου του μελιού, το οποίο ταυτόχρονα διεγείρει την αγγειογένεση. (Tazkaree et al., 2017) Ένας σημαντικός μηχανισμός που επάγεται από το υπεροξειδίο του υδρογόνου είναι η ενεργοποίηση μέσω οξειδωσης πρωτεϊνών σερίνης και μεταλλοπρωτεασών, που συνήθως είναι ανενεργές λόγω της ύπαρξης ορισμένων αναστολέων τους. Οι πρωτεάσες αυτές έχουν την ικανότητα να καταστρέφουν βακτήρια και νεκρά κύτταρα στην περιοχή της πληγής. Τέλος, το υπεροξειδίο του υδρογόνου μπορεί να ενεργοποιήσει υποδοχείς ινσουλίνης ώστε να αυξηθεί τελικά η πρόσληψη αμινοξέων και γλυκόζης για κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμό, όπου συμμετέχουν και οι βιταμίνες, τα ιχνοστοιχεία, τα σάκχαρα και τα αμινοξέα του μελιού (Ahmed et al., 2018).

1.2.6 Αντι-ικική δράση

In vitro μελέτες έχουν παρουσιάσει την αντι-ικική δράση έναντι διαφόρων τύπων ιών όπως *Rubella*, *Herpes simplex* και *varicella zoster*. Η αντι-ικική δράση του μελιού μπορεί να αποδοθεί σε διάφορα συστατικά του. Μερικά από αυτά είναι ο χαλκός, το ασκορβικό οξύ, τα φλαβονοειδή και το υπεροξειδίο του υδρογόνου, τα οποία οδηγούν στην αναστολή του κύκλου ζωής του ιού μέσω παρεμπόδισης των μηχανισμών της μεταγραφής και της μετάφρασης. Επίσης, το μέλι περιέχει μονοξειδίο του αζώτου (NO) το οποίο προσδίδει άμυνα έναντι τόσο σε DNA όσο και σε RNA ιούς. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω αναστολής της ικικής πολυμεράσης, παρεμποδίζοντας την αντιγραφή, και μέσω αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες των νεοσχηματιζόμενων ιικών σωματίων (Ahmed et al., 2018).



Εικόνα 8: Μηχανισμοί της αντι-ικικής δράσης του μελιού (Ahmed et al., 2018)

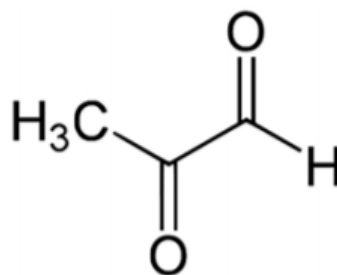
1.3 Είδη μελιού που χρησιμοποιήθηκαν

1.3.1 Μέλι Manuka

Το μέλι Manuka παράγεται από το νέκταρ των ανθών του θάμνου Manuka ή αλλιώς *Leptospermum scoparium*, ένα ενδημικό φυτό της Νέας Ζηλανδίας. Όπως όλα τα μέλια αποτελείται από υδατάνθρακες, μέταλλα, πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα, φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή, με τη συγκεντρώση των φαινολικών να ξεπερνά πολλά μέλια, αποκτώντας έτσι ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα (Alvarez- Suarez et al., 2014). Όμως αυτό που το καθιστά τόσο πλούσιο διατροφικά και του προσδίδει σημαντική αντιβακτηριακή δράση είναι η υψηλή του συγκέντρωση σε μεθυλγλυοξάλη (MGO), μια ουσία που παράγεται από τη διυδροξυακετόνη που περιέχεται στο νέκταρ των ανθών του φυτού Manuka (Adams et al., 2009). Οι συγκεντρώσεις της γενικότερα είναι περίπου 828 mg/kg σε σχέση με τα υπόλοιπα μέλια που περιέχουν συγκεντρώσεις 24 mg/kg. Η MGO θεωρείται ως το κύριο δραστικό συστατικό στο Manuka και μέτρο του δείκτη της αντιμικροβιακής ικανότητας του που ονομάζεται “Unique Manuka Factor” (UMF). Η συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι χαμηλότερη σε σχέση με άλλα μέλια, οπότε δεν διαδραματίζει τόσο σημαντικό ρόλο όσο σε αυτά. Έρευνες έχουν δείξει πως πέρα από τη MGO στην αντιβακτηριακή δράση συμβάλλουν και άλλοι παράγοντες, που μέσω πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) έχουν ταυτοποιηθεί ως αλειφατικές ή αρωματικές ενώσεις (Maddocks et al., 2013). Οι κυτταρικές διαδικασίες στις οποίες επιδρά το Manuka ποικίλλουν. Μερικές από αυτές είναι η ενεργοποίηση των μακροφάγων μέσω της πρωτεΐνης απαλβουμίνη 1 που οδηγεί τελικά στην παραγωγή μορίων όπως ο TNF-α, η IL-1β και η IL-6, τα οποία συμβάλλουν στην καταπολέμηση βακτηριακών μολύνσεων και στην επιτάχυνση της επούλωσης βλαβών των ιστών (Johnston et al., 2018), η μείωση των βλαβών στο DNA και των επιπέδων μαλονδιαλδεΐδης και η μείωση της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Alvarez- Suarez et al., 2014).



Εικόνα 9: *Leptospermum scoparium*



Εικόνα 10: Χημικός τύπος της μεθυλγλυοξάλης (MGO)

1.3.2 Πευκόμελο

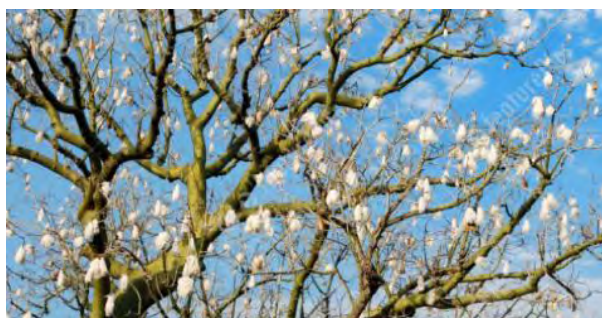
Το μέλι από πεύκο παράγεται από μέλισσες που συλλέγουν νέκταρ που εκκρίνεται από το έντομο *Marchalina hellenica*, που τρέφεται από τους χυμούς των πεύκων στα οποία ζει ως παράσιτο, και αποτελεί το 65% περίπου της ελληνικής παραγωγής μελιού. Τα κυριότερα μέρη στα οποία βρίσκεται είναι η Θάσος, η Χαλκιδική, η Εύβοια, η Σκόπελος, η Σκιάθος, η Ζάκυνθος, η Ρόδος και η Κρήτη. Όσον αφορά τα φυσικά του χαρακτηριστικά, έχει κεχριμπαρένιο χρώμα και αρκετά παχύρρευστη υφή και παράλληλα διαθέτει την ικανότητα να κρυσταλλώνει με πολύ βραδύ ρυθμό λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζης. Επίσης διαθέτει υψηλό pH και αγωγιμότητα και χαμηλά ανάγοντα σάκχαρα. Τα περισσότερα είδη πευκόμελου έχουν υψηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικών σε σχέση με μέλια ανθών, γεγονός που οφείλεται στα υψηλά επίπεδα φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων, στα οποία αποδίδεται εν μέρει και το χρώμα (Θρασυβούλου και συν., 2002).



Εικόνα 11: Πεύκο

1.3.3 Βαμβακόμελο

Το βαμβάκι είναι φυτό που ανθίζει από τον Ιούλιο μέχρι τα μέσα Αυγούστου. Είναι μελισσοκομικό φυτό και σε αυτό παρασιτούν αφίδες που παράγουν μελιτώδεις εκκρίσεις, τις οποίες συλλέγουν μαζί με το νέκταρ οι μέλισσες. Συνεπώς, λόγω της ύπαρξης των μελιτωμάτων από τις αφίδες θεωρείται μη αμιγές μέλι και μάλιστα το ποσοστό του σε γυρεόκοκκους είναι αρκετά χαμηλό λόγω των μικρών τους συγκεντρώσεων στους χυμούς του βαμβακιού. Ένα χαρακτηριστικό του βαμβακόμελου είναι οι πολύ υψηλές συγκεντρώσεις σε γλυκόζη και φρουκτόζη που οδηγούν στη γρήγορη κρυστάλλωση του. Θεωρείται πως έχει την υψηλότερη βακτηριοκτόνο δράση από όλα τα άλλα μέλια αφού είναι το πλουσιότερο σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (Θρασυβούλου και συν., 2002).



Εικόνα 12: Βαμβάκι

1.3.4 Μέλη ελάτης

Ένα από τα πιο γνωστά ελληνικά μέλια είναι το μέλι ελάτης το οποίο υπολογίζεται πως αποτελεί το 5-10% της συνολικής παραγωγής μελιού στην Ελλάδα. Στην Ελλάδα συναντάται η ελάτη η κεφαλληνιακή η οποία καλύπτει μεγάλες εκτάσεις στις ορεινές περιοχές νότια του Ολύμπου, στην Ευρυτανία, στο Καρπενήσι, στον Ταΰγετο, στην Αρκαδία, στην Πάρνηθα και αλλού. Η ευρωπαϊκή ελάτη φύεται σε όλη την Ευρώπη μέχρι τον Καύκασο και συναντάται μόνο σε μεμονωμένα σημεία των βόρειων ελληνικών συνόρων. Στην οροσειρά της Πίνδου συναντάται η υβριδογενής ελάτη η οποία είναι προϊόν διασταύρωσης της ευρωπαϊκής ελάτης με την ελληνική. Όπως και το βαμβακόμελο, ανήκει στην κατηγορία μελιών μελιτώματος και προέρχεται από τις εκκρίσεις αφίδων που παρασιτούν στα έλατα. Το μέλι ελάτου ξεχωρίζει για τη χαρακτηριστική του εμφάνιση και το χρώμα του ποικίλλει ανάλογα με την περιοχή προέλευσης του με τις αποχρώσεις του συνήθως να είναι το μαύρο, το κόκκινο και το περλέ. Όπως και το πευκόμελο δεν κρυσταλλώνει εύκολα λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη. Τέλος, το pH του είναι υψηλότερο από όλες τις άλλες κατηγορίες μελιού και περιέχει χαμηλά ανάγοντα σάκχαρα, όπως φρουκτόζη και δεξτρόζη (Θρασυβούλου και συν., 2002).



Εικόνα 13: Έλατο

1.3.5 Θυμαρίσιο μέλι

Το μέλι αυτό παράγεται από πολλά είδη θυμαριού. Από τα 350 είδη θυμαριού, τα αξιοσημείωτα είδη για την παραγωγή μελιού είναι το *T. Capitatus*, το *T. Vulgaris* και το *T. Serpyllum*. Γενικότερα το θυμάρι ανθίζει σε ξηρές και βραχώδεις Μεσογειακές περιοχές και είναι γνωστό για το άρωμα και τη γεύση του. Στην Ελλάδα παράγεται κυρίως σε νησιά αλλά και σε περιοχές της ηπειρωτικής Ελλάδας. Το χρώμα του είναι κεχριμπαρένιο όταν είναι σε ρευστή μορφή και ανοιχτό καφέ όταν κρυσταλλώνει, το οποίο συμβαίνει σε χρονικό διάστημα από 6 μέχρι 18 μήνες (Θρασυβούλου και συν., 2002).



Εικόνα 14: Θυμάρι

1.3.6 Μέλι ερείκης

Αυτό το είδος μελιού παράγεται σε πολλές περιοχές της χώρας και διακρίνεται σε μέλι φθινοπωρινής και ανοιξιιάτικης ερείκης. Το φθινοπωρινό ρεικόμελο έχει σχεδόν χάλκινο χρώμα και προέρχεται από την ερείκη τη σπονδυλανθή (*Erica manipuriflora*), έναν θάμνο με μωβ άνθη που ανθίζει το φθινόπωρο και προμηθεύει τις μέλισσες με την τελευταία γύρη που θα βρουν πριν τον χειμώνα. Το ανοιξιιάτικο ρεικόμελο έχει υπόγλυκη γεύση και κεχριμπαρένιο χρώμα και έντονο άρωμα. Παράγεται από την ερείκη την δενδρώδη (*Erica Arborea*), έναν ξυλώδη θάμνο με λευκά άνθη που μπορεί να φτάσει τα 3 μέτρα ύψος και ανθίζει την άνοιξη. Το ανοιξιιάτικο ρεικόμελο χαρακτηρίζεται από υψηλότερη συγκέντρωση γλυκόζης σε σχέση με το φθινοπωρινό αλλά και τα δύο είδη διακατέχονται από υψηλή υγρασία και αγωγιμότητα σε σχέση με άλλα ανθόμελα (Θρασυβούλου και συν., 2002).



Εικόνα 15: Ερείκη

1.3.7 Μέλι καστανιάς

Παράγεται από το νέκταρ και τις μελιτώδεις εκκρίσεις της καστανιάς (*Castanea sativa*), που είναι αξιόλογο μελισσοκομικό φυτό και αρκετά διαδεδομένο στην ορεινή ζώνη της Ελλάδας. Οι μελιτώδεις εκκρίσεις παράγονται από την αφίδα *Myzocallis castanicola* που συναντάται στην κάτω επιφάνεια των φύλλων αλλά και πάνω στα εχινόμορφα κύπελα που περιβάλλουν τους καρπούς. Οι εκκρίσεις διαρκούν από το Μάιο μέχρι τον Ιούλιο ή και λίγο αργότερα. Όλα τα είδη μελιών καστανιάς έχουν υψηλές τιμές pH, αγωγιμότητας, τέφρας και υψηλές συγκεντρώσεις ενζύμων. Επίσης, συγκριτικά με άλλα μέλια έχει μικρότερη περιεκτικότητα σε ζύμες και ανθίσταται περισσότερο στη ζύμωση. Ανάλογα με την προέλευση του ποικίλλει από ανοιχτό καφέ μέχρι σκούρο καφέ και μαύρο αν πρόκειται για μελίτωμα και έχει πολύ έντονη και πικρή γεύση που συνοδεύεται από έντονη οσμή (Θρασυβούλου και συν., 2002).



Εικόνα 16: Καστανιά

2. Πειραματικό μέρος

2.1 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι η εκτίμηση της αντιβακτηριακής ικανότητας μελιών ποικίλης γεωγραφικής και βοτανικής προέλευσης έναντι του Gram αρνητικού βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*. Μελετήθηκαν 80 διαφορετικά δείγματα μελιών στα οποία περιλαμβάνονται μέλια από έλατο, πεύκο, θυμάρι, καστανιά, ερείκη και βαμβάκι. Για τη μελέτη της αντιβακτηριακής ικανότητας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοδότησης. Στη συνέχεια, για τα δείγματα που εμφάνισαν τιμή MIC χαμηλότερη από εκείνη του Manuka και για μερικά από αυτά που εμφάνισαν την ίδια τιμή MIC πραγματοποιήθηκε εκτίμηση του μηχανισμού δράσης του μελιού κατά των βακτηρίων μέσω της τεχνικής MIC με χρήση Α)καταλάσης, η οποία διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου του μελιού και Β)πρωτεΐνάσης K, η οποία καταστρέφει πρωτεΐνες και πεπτίδια.

2.2 Μέθοδοι και υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Μικροπλάκες 96-θέσεων (96 well microplates)
- Αυτόματες πιπέτες των 10 μl, 200 μl και 1000 μl
- Tips των 200μl και 1000μl
- Eppendorfs των 1,5 ml
- Κυψελίδες
- Γυάλινα vials
- dH₂O
- 80 δείγματα μελιών
- Μικροβιολογικός κρίκος
- Τρυβλία petri

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Φασματοφωτόμετρο
- Vortex
- Αναδευόμενος επωαστήρας
- Microplate reader
- Ζυγός
- Χύτρα αποστείρωσης

Ως θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη βακτηρίων σε υγρή καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε Mueller Hinton Broth σε σκόνη της εταιρείας LabM. Για στερεή καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε Mueller Hinton Agar σε σκόνη της ίδιας εταιρείας.

Το βακτήριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* 1773.

Δείγματα μελιών

Για την εκτίμηση της αντιβακτηριακής δράσης ελέγχθηκαν 80 δείγματα μελιών ποικίλης φυτικής προέλευσης από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας. Μετά την αποστολή των μελιών από τους παραγωγούς τους έγινε φύλαξη τους σε κατάλληλο μέρος εντός του χώρου του εργαστηρίου για την καλύτερη διατήρησή τους. Η επιλογή των δειγμάτων για έλεγχο έγινε με στόχο την κάλυψη όσο το δυνατόν περισσότερων περιοχών και φυτών προέλευσης. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται όλα τα μέλια που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 1: Πληροφορίες για τα 80 δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη

| Κωδικός Αριθμός δείγματος | Είδος φυτού | Γεωγραφική Προέλευση | Κωδικός Αριθμός δείγματος | Είδος φυτού | Γεωγραφική Προέλευση |
|---------------------------|-------------|----------------------|---------------------------|-------------|------------------------|
| 2 | Έλατο | Αργολίδα | 50 | Πεύκο | Ρόδος |
| 3 | Θυμάρι | Τήνος | 60 | Θυμάρι | Λέσβος |
| 4 | Θυμάρι | Άνδρος | 64 | Πεύκο | Ρόδος |
| 5 | Θυμάρι | Άνδρος | 65 | Πεύκο | Εύβοια |
| 6 | Θυμάρι | Σίκινος | 66 | Βαμβάκι | Θεσσαλία |
| 7 | Θυμάρι | Ίος | 71 | Ερείκη | Άνδρος |
| 8 | Πεύκο | Κορινθία | 72 | Ερείκη | Άνδρος |
| 9 | Έλατο | Αργολίδα | 73 | Ερείκη | Χαλκιδική |
| 10 | Έλατο | Αργολίδα | 74 | Πεύκο | Θάσος |
| 11 | Έλατο | Αργολίδα | 78 | Πεύκο | Εύβοια |
| 12 | Έλατο | Αργολίδα | 79 | Πεύκο | Εύβοια |
| 13 | Πεύκο | Κορινθία | 82 | Πεύκο | Χανιά |
| 14 | Έλατο | Αργολίδα | 83 | Πεύκο | Χανιά |
| 15 | Έλατο | Κορινθία | 84 | Βαμβάκι | Αξιός |
| 16 | Θυμάρι | Κορινθία | 85 | Καστανιά | Άγιο Όρος |
| 17 | Θυμάρι | Αττική | 86 | Πεύκο | Θάσος |
| 19 | Θυμάρι | Αττική | 87 | Καστανιά | Φλώρινα |
| 20 | Πεύκο | Εύβοια | 88 | Πεύκο | Θάσος |
| 21 | Ερείκη | Άνδρος | 89 | Ερείκη | Χαλκιδική |
| 22 | Θυμάρι | Άνδρος | 90 | Πεύκο | Θάσος |
| 23 | Θυμάρι | Σέριφος | 91 | Πεύκο | Θάσος |
| 24 | Θυμάρι | Σέριφος | 92 | Βαμβάκι | Θεσσαλονίκη |
| 25 | Θυμάρι | Καρδίτσα | 93 | Πεύκο | Θάσος |
| 26 | Πεύκο | Εύβοια | 94 | Ερείκη | Χαλκιδική |
| 27 | Θυμάρι | Πάρος | 95 | Πεύκο | Χαλκιδική |
| 28 | Βαμβάκι | Καρδίτσα | 96 | Πεύκο | Θάσος |
| 29 | Βαμβάκι | Καρδίτσα | 98 | Πεύκο | Χαλκιδική |
| 30 | Πεύκο | Εύβοια | 99 | Πεύκο | Θάσος |
| 31 | Θυμάρι | Νάξος | 100 | Πεύκο | Χαλκιδική |
| 33 | Θυμάρι | Χίος | 101 | Πεύκο | Θάσος |
| 34 | Θυμάρι | Ίος | 104 | Πεύκο | Κασσάνδρεια Χαλκιδικής |
| 35 | Θυμάρι | Χανιά | 105 | Πεύκο | Ποταμιά Θάσου |
| 36 | Θυμάρι | Χανιά | 106 | Πεύκο | Κασσάνδρεια Χαλκιδικής |

| | | | | | |
|-----|---------|-------------------|-----|--------------------|------------------------|
| 39 | Ερείκη | Άνδρος | 107 | Ερείκη | Ουρανούπολη Χαλκιδικής |
| 41 | Βαμβάκι | Λάρισα | 108 | Ερείκη | Μεσημέρι Θεσ/νίκης |
| 42 | Θυμάρι | Χανιά | 109 | Πεύκο | Κοκκινομηλιά Εύβοιας |
| 47 | Θυμάρι | Σύρος | 110 | Ερείκη | Γομάτι Χαλκιδικής |
| 48 | Θυμάρι | Ίος | 113 | Βελανιδιά/Καστανιά | Βέρμιο Ημαθίας |
| 49 | Θυμάρι | Ρόδος | 115 | Καστανιά | Άγιο Όρος |
| 117 | Ερείκη | Γομάτι Χαλκιδικής | 133 | Κωνοφόρα | Κρήτη |

Χρησιμοποιήθηκε επίσης μέλι Manuka της εταιρείας Steens με Unique Manuka Factor 24+ (MGO 1122).

2.3 Εκτίμηση της αντιβακτηριακής δράσης δειγμάτων μελιού μέσω προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum inhibitory concentration, MIC)

Προετοιμασία καλλιέργειας

Αρχικά παρασκευάστηκε κατάλληλη ποσότητα Mueller Hinton Broth με βάση της οδηγίες που αναγράφονται στη συσκευασία του θρεπτικού υλικού. Από αυτό τον όγκο προστέθηκαν 5 ml σε γυάλινο vial. Στη συνέχεια, έγινε προετοιμασία της καλλιέργειας *P. aeruginosa*, με χρήση καλλιέργειας που υπήρχε στους -80 από την οποία λήφθηκαν 100 μl που προστέθηκαν στο vial που είχε προετοιμαστεί. Η καλλιέργεια έμεινε στον κλίβανο για επώαση 16 ωρών στους 37 °C.

Παράλληλα με αυτή τη διαδικασία, χρησιμοποιήθηκε σε τρυβλία με άγαρ Mueller Hinton η μέθοδος του plate streaking για να επιβεβαιωθεί ότι η αρχική καλλιέργεια της *P. aeruginosa* ήταν αμιγής και δεν υπήρχε κάποια επιμόλυνση από άλλο βακτήριο. Αφού επιβεβαιώθηκε ότι η καλλιέργεια ήταν αμιγής προχώρησε η πειραματική διαδικασία.

Αρχή μεθόδου- πειραματική διαδικασία

Ως ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση χαρακτηρίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση μιας αντιμικροβιακής ουσίας που θα αναστέλλει την ορατή ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού μετά από επώαση 16 ωρών στους 37°C. Στην συγκεκριμένη περίπτωση η ουσία αυτή είναι το μέλι το οποίο αραιώνεται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε μία πλάκα 96 θέσεων. Οι αραιώσεις είναι διαδοχικές. Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις 25%, 12,5%, 6,25% , 3,125% , 1,56% και 0,78%. Η αραιώση έγινε με Mueller Hinton Broth, διότι επιτρέπει ικανοποιητική ανάπτυξη των περισσότερων παθογόνων βακτηρίων (Clinical Microbiology and Infection, 2003). Έτσι γίνεται μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε κάθε θέση της πλάκας αμέσως μετά την προσθήκη του βακτηρίου και μετά από επώαση 16 ωρών στους 37 °C. Για να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα γίνεται πριν την προσθήκη αραιώση της καλλιέργειας για παρασκευή εναιωρήματος θολερότητας ίσης με 0,5 McFarland που αντιστοιχεί σε πυκνότητα $1,5 \times 10^8$ cfu/ml. (Mosialos and Anthimidou, 2012). Αυτό με τη σειρά του αντιστοιχεί σε απορρόφηση ίση με 0,132 στα 600 nm και συνεπώς πραγματοποιούνταν αραιώσεις της καλλιέργειας μέχρι την τιμή αυτή. Μετά έγινε μια περαιτέρω αραιώση 10%

έτσι ώστε τα 10 μl καλλιέργειας που προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι να αντιστοιχούν σε 5 x 10⁴ CFUs.

Σε κάθε πλάκα 96 θέσεων έγινε έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης 4 δειγμάτων καθώς επίσης και του Manuka, ώστε να υπάρξει σύγκριση με αυτό. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε Mueller Hinton Broth ως θετικό και αρνητικό control. Η διάταξη των δειγμάτων στην πλάκα ήταν ως εξής:

Πίνακας 2: Αναπαράσταση του τρόπου τοποθέτησης των δειγμάτων στην μικροπλάκα 96 θέσεων

| Αραιώση | 25 % | 12,5 % | 6,25 % | 3,125 % | 1,56 % | 0,78 % | 25% | 12,5 % | 6,25 % | 3,125 % | 1,56 % | 0,78 % |
|--------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| 1 ^η επανάληψη | Δ1 | Δ1 | Δ1 | Δ1 | Δ1 | Δ1 | Δ3 | Δ3 | Δ3 | Δ3 | Δ3 | Δ3 |
| 2 ^η επανάληψη | Δ1 | Δ1 | Δ1 | Δ1 | Δ1 | Δ1 | Δ3 | Δ3 | Δ3 | Δ3 | Δ3 | Δ3 |
| 3 ^η επανάληψη | Δ1 | Δ1 | Δ1 | Δ1 | Δ1 | Δ1 | Δ3 | Δ3 | Δ3 | Δ3 | Δ3 | Δ3 |
| | - control | - control | - control | - control | - control | - control | Manuka | Manuka | Manuka | Manuka | Manuka | Manuka |
| | + control | + control | +control | +control | +control | +control | Manuka | Manuka | Manuka | Manuka | Manuka | Manuka |
| 1 ^η επανάληψη | Δ2 | Δ2 | Δ2 | Δ2 | Δ2 | Δ2 | Δ4 | Δ4 | Δ4 | Δ4 | Δ4 | Δ4 |
| 2 ^η επανάληψη | Δ2 | Δ2 | Δ2 | Δ2 | Δ2 | Δ2 | Δ4 | Δ4 | Δ4 | Δ4 | Δ4 | Δ4 |
| 3 ^η επανάληψη | Δ2 | Δ2 | Δ2 | Δ2 | Δ2 | Δ2 | Δ4 | Δ4 | Δ4 | Δ4 | Δ4 | Δ4 |

Η κάθε αραιώση για κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε τρεις επαναλήψεις για μεγαλύτερη αξιοπιστία. Το Manuka αραιώθηκε με τον ίδιο τρόπο που αραιώθηκαν και τα δείγματα. Οι αραιώσεις έγιναν ως εξής: Αρχικά σε Eppendorf των 1,5 ml φτιάχτηκε διάλυμα μελιού συγκέντρωσης 50% v/v με προσθήκη 500 μl Mueller Hinton σε 500 μl δείγματος. Μετά από καλή ανάδευση έγινε μεταφορά 500 μl διαλύματος σε άλλο Eppendorf που περιείχε 500 μl Mueller Hinton με αποτέλεσμα το μέλι σε αυτό το Eppendorf να βρισκόταν σε συγκέντρωση 25%. Ομοίως ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία και για τις επόμενες αραιώσεις.

Σε κάθε θέση στην πλάκα 96 θέσεων (με εξαίρεση τις θέσεις για το θετικό και αρνητικό control) τοποθετούνταν:

1. 90 μl Mueller Hinton Broth
2. 100 μl δείγματος αντίστοιχης αραιώσης όπως φαίνεται στον πίνακα
3. 10 μl καλλιέργειας *P. aeruginosa* μετά από τις αραιώσεις που προαναφέρθηκαν

Κατά συνέπεια η αραιώση του μελιού στις πρώτες θέσεις μετατρεπόταν από 50% σε 25% διότι μόνο η μισή ποσότητα διαλύματος σε αυτές ήταν το αραιωμένο μέλι. Ομοίως η συγκέντρωση του μελιού υποδιαιρέθηκε και στις επόμενες αραιώσεις για να προκύψουν οι τελικές αραιώσεις που αναφέρονται και στον πίνακα.

Στις θέσεις για το θετικό control προστέθηκε :

1. 190 μl Mueller Hinton Broth
2. 10 μl καλλιέργειας *P. aeruginosa* μετά από τις αραιώσεις που προαναφέρθηκαν

Τέλος, στο αρνητικό control προστέθηκαν μόνο 200 μl Mueller Hinton Broth. Ρόλος του αρνητικού control είναι ο έλεγχος για πιθανές επιμολύνσεις του θρεπτικού υλικού.

Για τον υπολογισμό της οπτικής πυκνότητας σε κάθε πηγαδάκι χρησιμοποιείται ο τύπος

$$OD = T_{24} - T_0 \text{ (Thomas Patton et al. 2005)}$$

Όπου,

T_{24} : η απορρόφηση σε ένα συγκεκριμένο πηγαδάκι μετά από την επώαση 16 ωρών

T_0 : η απορρόφηση σε ένα συγκεκριμένο πηγαδάκι αμέσως μετά την προσθήκη βακτηρίου

Στη συνέχεια μπορεί να υπολογιστεί η % αναστολή σε κάθε πηγαδάκι από τον τύπο:

$$\text{Percent Inhibition} = 1 - (\text{OD test well} / \text{OD of corresponding control well}) \text{ (Thomas Patton et al. 2005)}$$

OD test well: Η οπτική πυκνότητα που υπολογίστηκε από τον προηγούμενο τύπο

OD of corresponding control well: Το αντίστοιχο θετικό control πηγαδάκι.

Για παράδειγμα, η τιμή OD για το πηγαδάκι της στήλης 1, σειράς 1 διαιρείται με την τιμή OD για το πηγαδάκι control της στήλης 1, σειράς 6.

Η τιμή του MIC για κάθε δείγμα μπορεί να βρεθεί με βάση την τιμή του OD για κάθε πηγαδάκι.

2.4 Εκτίμηση του μηχανισμού της αντιβακτηριακής δράσης του μελιού μέσω προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης μετά από προσθήκη Α) καταλάσης και Β) πρωτεΐνης Κ

Προκειμένου να βρεθεί ο πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου το μέλι ασκεί την αντιβακτηριακή του δράση χρησιμοποιήθηκαν πρωτεΐνη Κ και καταλάση. Η πρωτεΐνη Κ καταστρέφει πιθανά πεπτίδια με αντιβακτηριακή δράση, όπως οι ντεφενσίνες, ενώ η καταλάση μετατρέπει το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε οξυγόνο και νερό. Επομένως, αύξηση του MIC μετά από δράση της πρωτεΐνης Κ σημαίνει πως η αντιβακτηριακή δράση οφείλεται μερικώς στην ύπαρξη αντιμικροβιακών πεπτιδίων και πρωτεϊνών ενώ αύξηση του MIC μετά από δράση της καταλάσης σημαίνει πως η δράση οφείλεται εν μέρει στο H₂O₂. Είναι πιθανόν να προκαλείται αύξηση του MIC σε κάποιο δείγμα μετά την προσθήκη και των δύο ουσιών, το οποίο υποδηλώνει ισχυρή δράση και πρωτεϊνών αλλά και του H₂O₂ στο δείγμα αυτό. Το H₂O₂ θεωρείται υπεύθυνο για το μεγαλύτερο μέρος της αντιβακτηριακής δράσης (Brudzynski et al., 2011) οπότε αναμένεται να έχει στα περισσότερα δείγματα σημαντικότερη αντιβακτηριακή δράση συγκριτικά με τις πρωτεΐνες.

Πειραματική διαδικασία

Ομοίως όπως και στην προηγούμενη πειραματική διαδικασία, έγινε προετοιμασία της καλλιέργειας. Προστέθηκαν δηλαδή, 100 μl καλλιέργειας *P. aeruginosa* σε 5ml Mueller Hinton Broth και ακολούθησε επώαση στον κλίβανο για 16 ώρες στους 37°C. Πριν την προσθήκη της καλλιέργειας στην πλάκα 96 θέσεων έγινε αραιώση της καλλιέργειας μέχρι να προκύψει εναιώρημα θολρότητας ίσης με 0,5 McFarland, το οποίο αντιστοιχεί σε οπτική πυκνότητα ίση με 0,132 μετά από μέτρηση στα 600 nm στο φασματοφωτόμετρο.

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 Mueller 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.

Για την παρασκευή του stock πρωτεΐνης Κ (Mundo et al., 2004) συγκέντρωσης 10 mg/ml, 10 mg από την πρωτεΐνη Κ (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 Mueller Hinton Broth) προστέθηκαν 15 μl πρωτεΐνης Κ 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 τιμή της οπτικής πυκνότητας και του ποσοστού αναστολής των βακτηρίων μπορεί να υπολογιστεί με τους τύπους που χρησιμοποιήθηκαν και προηγουμένως.

3.Αποτελέσματα

3.1 Εκτίμηση της αντιβακτηριακής δράσης δειγμάτων μελιού μέσω προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum inhibitory concentration, MIC)

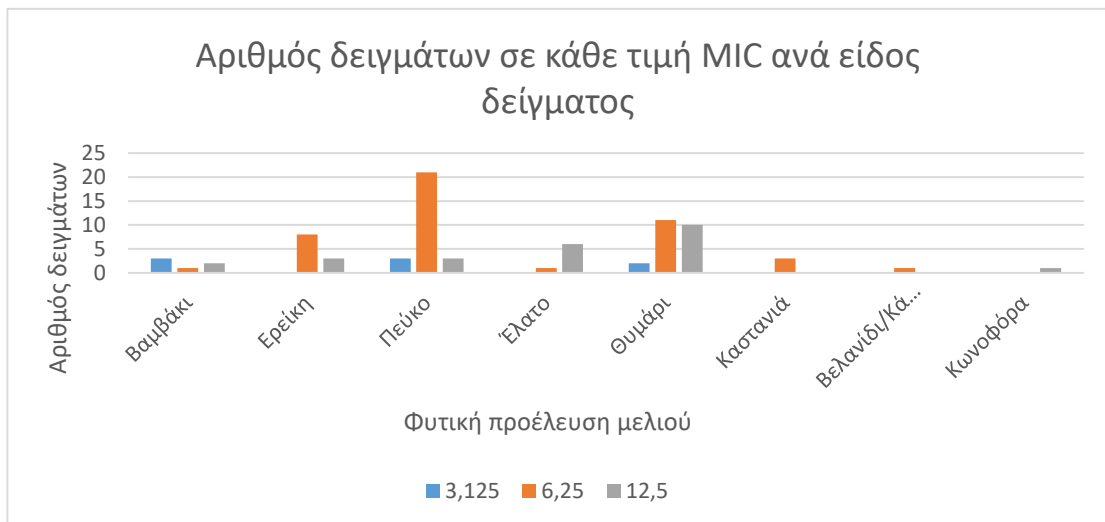
Οι τιμές MIC που υπολογίστηκαν για όλα τα δείγματα παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 3: Τιμές MIC έναντι της *P. aeruginosa* για τα 80 δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν

| Κωδικός Αριθμός δείγματος | Είδος φυτού | Γεωγραφική Προέλευση | MIC (% v/v) | Κωδικός Αριθμός δείγματος | Είδος φυτού | Γεωγραφική Προέλευση | MIC (% v/v) |
|---------------------------|-------------|----------------------|-------------|---------------------------|-------------|------------------------|-------------|
| 2 | Έλατο | Αργολίδα | 6,25% | 50 | Πεύκο | Ρόδος | 6,25% |
| 3 | Θυμάρι | Τήνος | 6,25% | 60 | Θυμάρι | Λέσβος | 12,5% |
| 4 | Θυμάρι | Άνδρος | 3,125% | 64 | Πεύκο | Ρόδος | 6,25% |
| 5 | Θυμάρι | Άνδρος | 6,25% | 65 | Πεύκο | Εύβοια | 6,25% |
| 6 | Θυμάρι | Σίκινος | 12,5% | 66 | Βαμβάκι | Θεσσαλία | 3,125% |
| 7 | Θυμάρι | Ίος | 12,5% | 71 | Ερείκη | Άνδρος | 12,5% |
| 8 | Πεύκο | Κορινθία | 12,5% | 72 | Ερείκη | Άνδρος | 6,25% |
| 9 | Έλατο | Αργολίδα | 12,5% | 73 | Ερείκη | Χαλκιδική | 12,5% |
| 10 | Έλατο | Αργολίδα | 12,5% | 74 | Πεύκο | Θάσος | 6,25% |
| 11 | Έλατο | Αργολίδα | 12,5% | 78 | Πεύκο | Εύβοια | 6,25% |
| 12 | Έλατο | Αργολίδα | 12,5% | 79 | Πεύκο | Εύβοια | 6,25% |
| 13 | Πεύκο | Κορινθία | 12,5% | 82 | Πεύκο | Χανιά | 6,25% |
| 14 | Έλατο | Αργολίδα | 12,5% | 83 | Πεύκο | Χανιά | 6,25% |
| 15 | Έλατο | Κορινθία | 12,5% | 84 | Βαμβάκι | Αξιός | 3,125% |
| 16 | Θυμάρι | Κορινθία | 12,5% | 85 | Καστανιά | Άγιο Όρος | 6,25% |
| 17 | Θυμάρι | Αττική | 12,5% | 86 | Πεύκο | Θάσος | 6,25% |
| 19 | Θυμάρι | Αττική | 12,5% | 87 | Καστανιά | Φλώρινα | 6,25% |
| 20 | Πεύκο | Εύβοια | 6,25% | 88 | Πεύκο | Θάσος | 6,25% |
| 21 | Ερείκη | Άνδρος | 12,5% | 89 | Ερείκη | Χαλκιδική | 6,25% |
| 22 | Θυμάρι | Άνδρος | 6,25% | 90 | Πεύκο | Θάσος | 6,25% |
| 23 | Θυμάρι | Σέριφος | 6,25% | 91 | Πεύκο | Θάσος | 6,25% |
| 24 | Θυμάρι | Σέριφος | 6,25% | 92 | Βαμβάκι | Θεσσαλονίκη | 6,25% |
| 25 | Θυμάρι | Καρδίτσα | 12,5% | 93 | Πεύκο | Θάσος | 6,25% |
| 26 | Πεύκο | Εύβοια | 12,5% | 94 | Ερείκη | Χαλκιδική | 6,25% |
| 27 | Θυμάρι | Πάρος | 6,25% | 95 | Πεύκο | Χαλκιδική | 3,125% |
| 28 | Βαμβάκι | Καρδίτσα | 12,5% | 96 | Πεύκο | Θάσος | 6,25% |
| 29 | Βαμβάκι | Καρδίτσα | 12,5% | 98 | Πεύκο | Χαλκιδική | 3,125% |
| 30 | Πεύκο | Εύβοια | 6,25% | 99 | Πεύκο | Θάσος | 6,25% |
| 31 | Θυμάρι | Νάξος | 6,25% | 100 | Πεύκο | Χαλκιδική | 3,125% |
| 33 | Θυμάρι | Χίος | 6,25% | 101 | Πεύκο | Θάσος | 6,25% |
| 34 | Θυμάρι | Ίος | 12,5% | 104 | Πεύκο | Κασσάνδρεια Χαλκιδικής | 6,25% |
| 35 | Θυμάρι | Χανιά | 12,5% | 105 | Πεύκο | Ποταμιά Θάσου | 6,25% |
| 36 | Θυμάρι | Χανιά | 12,5% | 106 | Πεύκο | Κασσάνδρεια Χαλκιδικής | 6,25% |
| 39 | Ερείκη | Άνδρος | 6,25% | 107 | Ερείκη | Ουρανούπολη Χαλκιδικής | 6,25% |

| | | | | | | | |
|-----|---------|----------------------|--------|-----|--------------------|-------------------------|-------|
| 41 | Βαμβάκι | Λάρισα | 3,125% | 108 | Ερείκη | Μεσημέρι Θες/νίκης | 6,25% |
| 42 | Θυμαρί | Χανιά | 6,25% | 109 | Πεύκο | Κοκκινομηλιά Εύβοιας | 12,5% |
| 47 | Θυμαρί | Σύρος | 6,25% | 110 | Ερείκη | Γομάτι Χαλκιδικής | 6,25% |
| 48 | Θυμαρί | Ίος | 6,25% | 113 | Βελανιδιά/Καστανιά | Βέρμιο Ημαθίας | 6,25% |
| 49 | Θυμαρί | Ρόδος | 3,125% | 115 | Καστανιά | Άγιο Όρος | 6,25% |
| 117 | Ερείκη | Γομάτι Χαλκιδικής | 6,25% | 133 | Κωνοφόρα | Κρήτη | 12,5% |

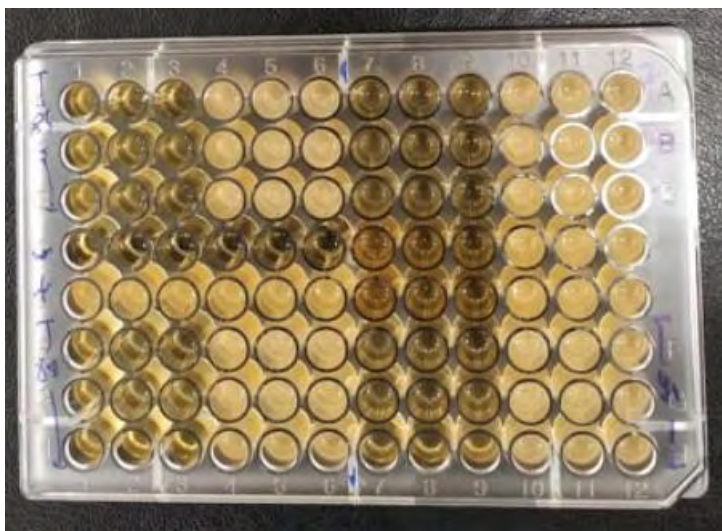
Αρχικά να σημειωθεί ότι η τιμή MIC για το Μαυκα υπολογίστηκε σε συγκέντρωση 6,25% v/v. Από τον πίνακα παρατηρείται ότι υπήρχαν 46 δείγματα με MIC ίσο με 6,25% v/v δηλαδή ήταν παρόμοιας αντιβακτηριακής ικανότητας με το Μαυκα (57,5% των δειγμάτων), 26 δείγματα με MIC ίσο με 12,5% v/v δηλαδή κατώτερης αντιβακτηριακής ικανότητας σε σχέση με το Μαυκα (32,5% των δειγμάτων) και 8 δείγματα με MIC ίσο με 3,125% v/v δηλαδή καλύτερης αντιβακτηριακής ικανότητας σε σχέση με το Μαυκα (10% των δειγμάτων). Από τα 8 αυτά δείγματα, τα 3 ήταν μέλι πεύκου, 3 μέλι βαμβακιού και 2 μέλι θυμαριού. Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται ο αριθμός των δειγμάτων τα οποία έχουν μια συγκεκριμένη εκ των τριών πιθανών τιμών MIC που υπάρχουν στον πίνακα για κάθε τύπο δείγματος.



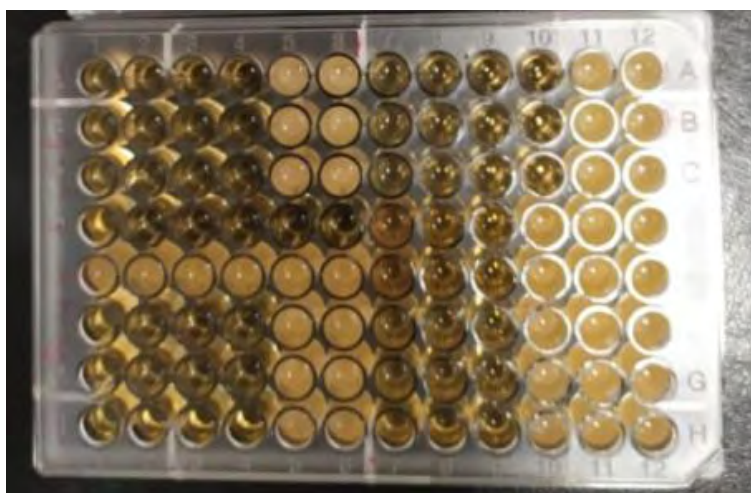
Διάγραμμα 1: Απεικονίζεται ο αριθμός των δειγμάτων που αντιστοιχούν σε κάθε τιμή MIC

Παρατηρείται ότι η τιμή MIC για τα δείγματα που προέρχονται από έναν συγκεκριμένο τύπο φυτού μπορεί να ποικίλλει. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες όπως οι συνθήκες καλλιέργειας του φυτού ή η διαφορετική περιεκτικότητα σε συγκεκριμένες αντιβακτηριακές ουσίες του μελιού. Επίσης, διακρίνεται μια σταθερή αντιβακτηριακή δράση για τα δείγματα πευκόμελου με τιμή MIC 6,25% v/v και μικρή απόκλιση στις άλλες 2 τιμές. Τα δείγματα μελιών θυμαριού κατανέμονται σχεδόν εξίσου σε τιμές MIC 6,25% v/v και 12,5% v/v με μόλις 2 δείγματα στην τιμή 3,125% v/v. Τα δείγματα βαμβακιού εμφανίζουν τη μεγαλύτερη αντιβακτηριακή δράση σε σχέση με τον συνολικό αριθμό δειγμάτων αυτού του είδους που ελέγχθηκαν, καθώς το 50% των βαμβακόμελων έχει MIC 3,125% v/v. Τα δείγματα μελιού ελάτης εμφανίζουν τη χαμηλότερη αντιβακτηριακή δράση σε σχέση με τα άλλα είδη δειγμάτων καθώς έξι στα επτά δείγματα που εξετάστηκαν έχουν MIC 12,5% v/v. Τέλος, τα δείγματα μελιού ερείκης εμφανίζουν στην πλειοψηφία τους MIC 6,25% και τα δείγματα

μελιού καστανιάς εμφανίζουν επίσης MIC στην συγκέντρωση αυτή, το οποίο συμφωνεί με υπάρχουσα βιβλιογραφία για τα δύο αυτά είδη μελιών (Albaridi, 2019). Τα αποτελέσματα αυτά απαιτούν πιο ακριβή διερεύνηση των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών κάθε είδους μελιού καθώς επίσης και θα ήταν πιο αξιόπιστη η ανάλυση περισσότερων δειγμάτων από την κάθε κατηγορία.



Φωτογραφία 1: Αντιβακτηριακή δράση έναντι *P. aeruginosa* μέσω εκτίμησης του MIC. Στην συγκεκριμένη εικόνα ελέγχθηκαν τα δείγματα 86,88,80 και 91. Η θολερότητα υποδηλώνει ανάπτυξη του βακτηρίου στα συγκεκριμένα πηγαδάκια. Η ελάχιστη συγκέντρωση που παρεμποδίζει την ανάπτυξη βακτηρίων είναι 6,25% v/v για όλα τα δείγματα. Φαίνεται επίσης πως η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του Manuka είναι 6,25% v/v.



Φωτογραφία 2: Εκτίμηση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης για τα δείγματα 41,66,84 και 92. Τα δείγματα 41,66 και 84 έχουν ισχυρή αντιβακτηριακή δράση με MIC 3,125% v/v.

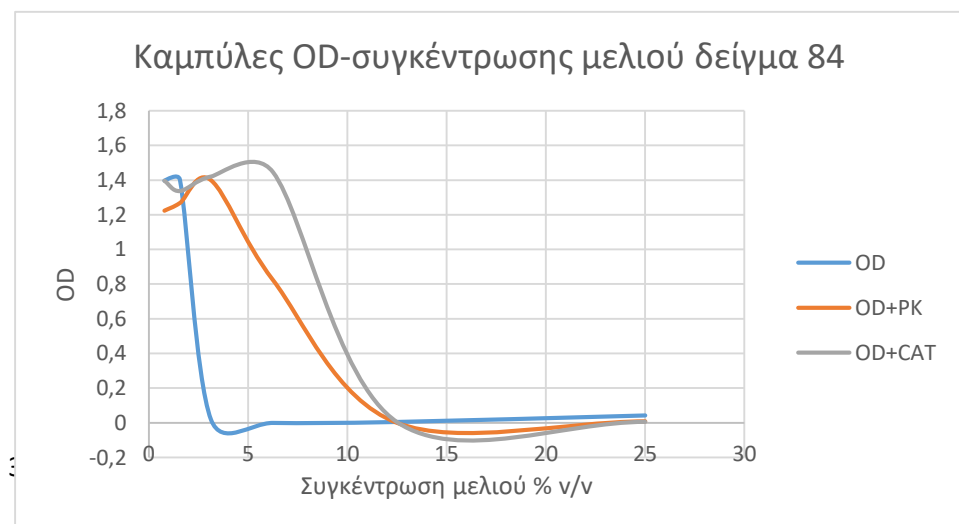
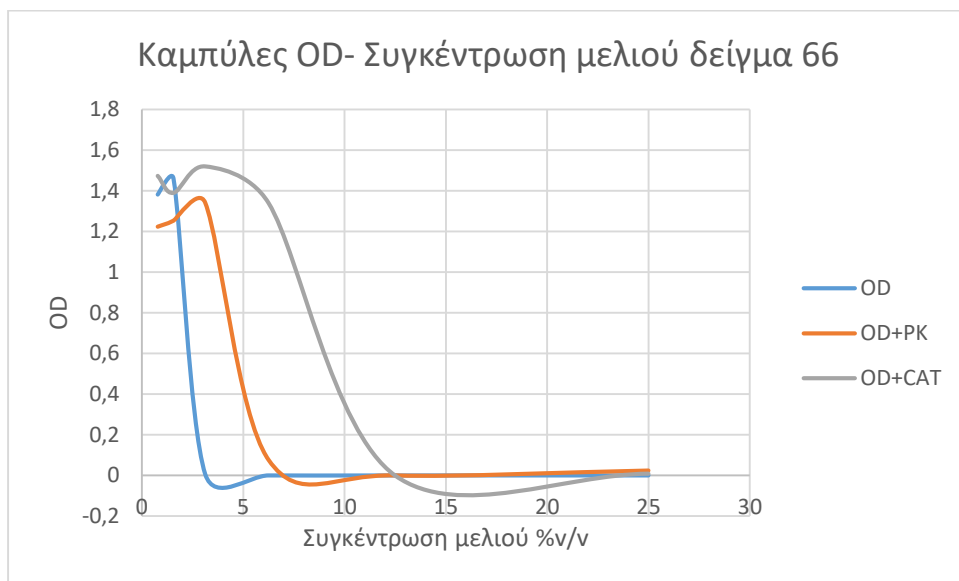
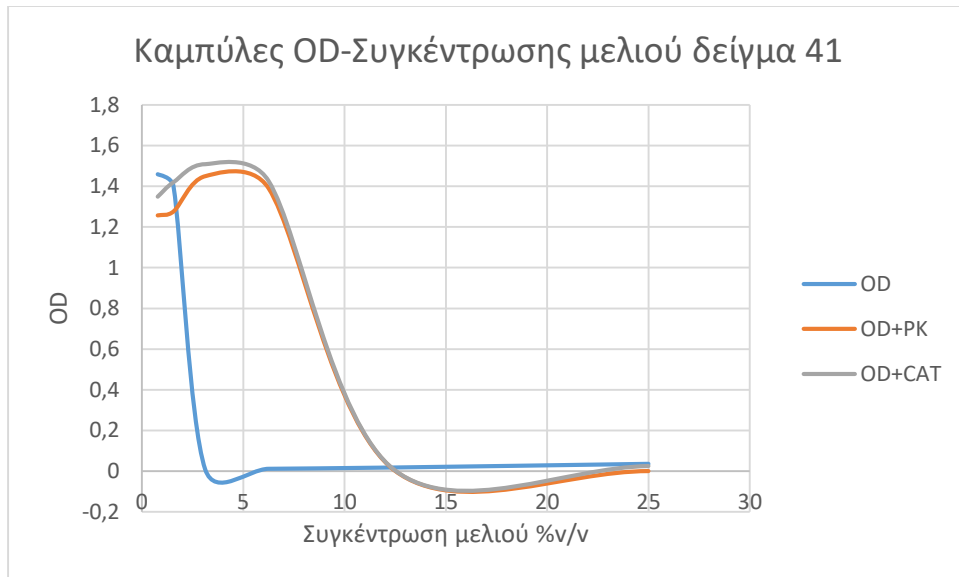
3.2 Εκτίμηση του μηχανισμού της αντιβακτηριακής δράσης του μελιού μέσω προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης μετά από προσθήκη Α) καταλάσης και Β) πρωτεΐνης Κ

Από τα 80 δείγματα που ελέγχθηκαν για αντιβακτηριακή δράση μέσω προσδιορισμού MIC, ελέγχθηκαν 27 για τον πιθανό μηχανισμό δράσης μέσω προσθήκης πρωτεΐνης Κ ή καταλάσης. Από αυτά, τα 8 είχαν καλύτερη δράση από το Manuka με MIC 3,125% v/v και τα 19 είχαν MIC ίσο με το Manuka, δηλαδή 6,25% v/v. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα.

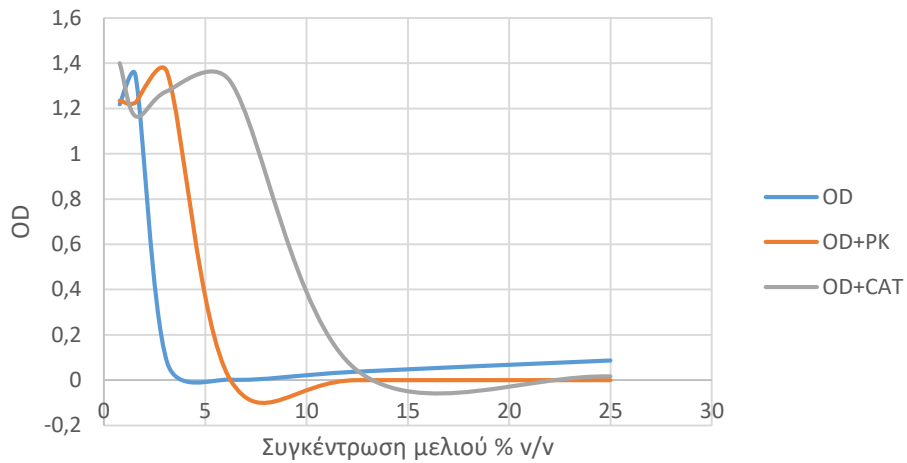
Πίνακας 4: Τιμές MIC 27 δειγμάτων μετά από προσθήκη καταλάσης και πρωτεΐνης Κ

| Αριθμός Δείγματος | Είδος Φυτού | Γεωγραφική προέλευση | MIC (% v/v) | MIC με πρωτεΐνη Κ | MIC με καταλάση |
|-------------------|---------------------|------------------------|-------------|-------------------|-----------------|
| 4 | Θυμάρι | Άνδρος | 3,125% | 6,25% | 12,5% |
| 24 | Θυμάρι | Σέριφος | 6,25% | 12,5% | 12,5% |
| 31 | Θυμάρι | Νάξος | 6,25% | 6,25% | 12,5% |
| 33 | Θυμάρι | Χίος | 6,25% | 6,25% | 12,5% |
| 39 | Ερείκη | Άνδρος | 6,25% | 12,5% | 12,5% |
| 41 | Βαμβάκι | Λάρισα | 3,125% | 12,5% | 12,5% |
| 42 | Θυμάρι | Χανιά | 6,25% | 6,25% | 12,5% |
| 49 | Θυμάρι | Ρόδος | 3,125% | 6,25% | 6,25% |
| 64 | Πεύκο | Ρόδος | 6,25% | 6,25% | 12,5% |
| 66 | Βαμβάκι | Θεσσαλία | 3,125% | 6,25% | 12,5% |
| 74 | Πεύκο | Θάσος | 6,25% | 6,25% | 12,5% |
| 78 | Πεύκο | Εύβοια | 6,25% | 6,25% | 12,5% |
| 79 | Πεύκο | Εύβοια | 6,25% | 6,25% | 12,5% |
| 82 | Πεύκο | Χανιά | 6,25% | 6,25% | 12,5% |
| 84 | Βαμβάκι | Αξιός | 3,125% | 12,5% | 12,5% |
| 85 | Καστανιά | Άγιο Όρος | 6,25% | 6,25% | 25% |
| 87 | Καστανιά | Φλώρινα | 6,25% | 6,25% | 12,5% |
| 92 | Βαμβάκι | Θεσσαλονίκη | 6,25% | 6,25% | 12,5% |
| 94 | Ερείκη | Χαλκιδική | 6,25% | 12,5% | 25% |
| 95 | Πεύκο | Χαλκιδική | 3,125% | 6,25% | 12,5% |
| 98 | Πεύκο | Χαλκιδική | 3,125% | 12,5% | 12,5% |
| 100 | Πεύκο | Χαλκιδική | 3,125% | 6,25% | 12,5% |
| 107 | Ερείκη | Ουρανούπολη Χαλκιδικής | 6,25% | 6,25% | 25% |
| 108 | Ερείκη | Μεσημέρι Θεσ/νικής | 6,25% | 6,25% | 12,5% |
| 113 | Βελανίδι με Κάστανο | Βέρμιο Βέροιας | 6,25% | 6,25% | 6,25% |
| 115 | Καστανιά | Άγιο Όρος | 6,25% | 6,25% | 25% |
| 117 | Ερείκη | Γομάτι Χαλκιδικής | 6,25% | 12,5% | 25% |

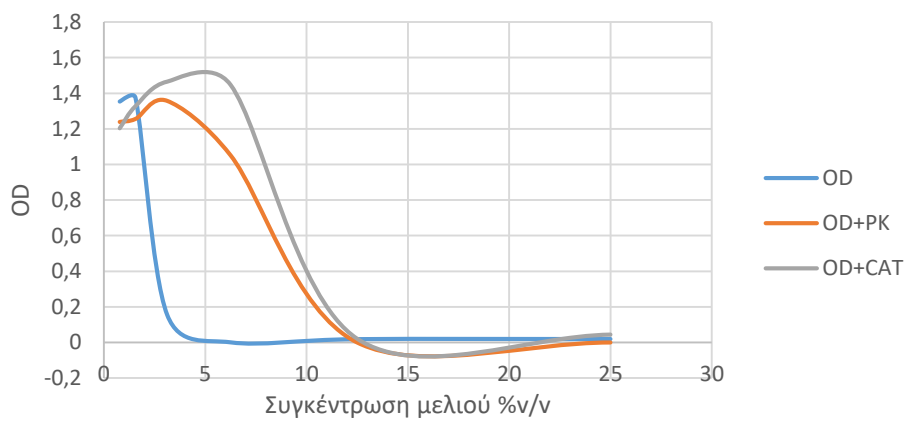
Ακολουθούν τα διαγράμματα OD σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του μελιού για τα μέλια που εμφάνισαν καλύτερη δράση από το Manuka, δηλαδή είχαν MIC 3,125% v/v. Σε κάθε διάγραμμα απεικονίζονται 3 καμπύλες, μία για τις φυσιολογικές τιμές OD, μία για τιμές OD μετά από προσθήκη πρωτεΐνης K και μια για τιμές OD μετά από προσθήκη καταλάσης.



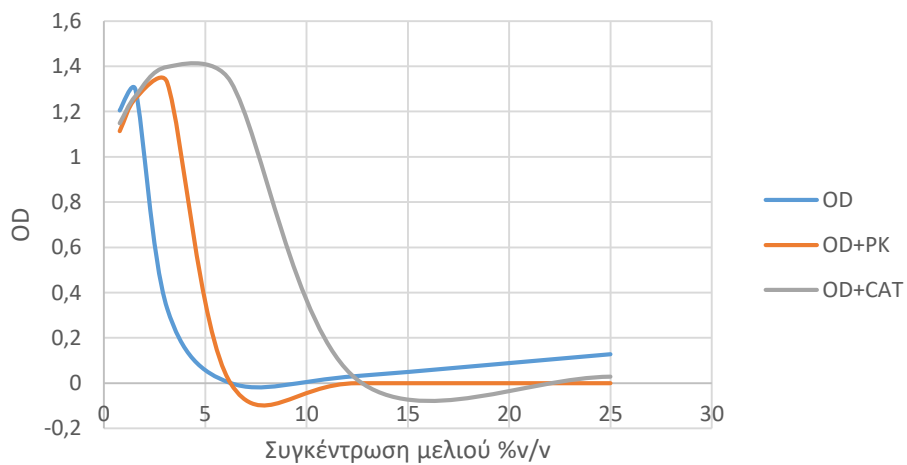
Καμπύλες OD-συγκέντρωση μελιού δείγμα 95

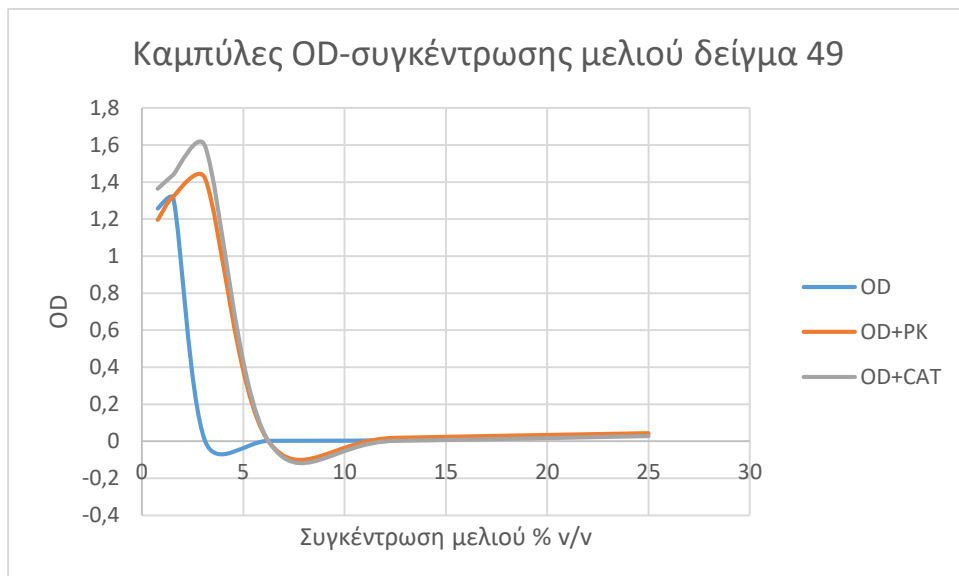
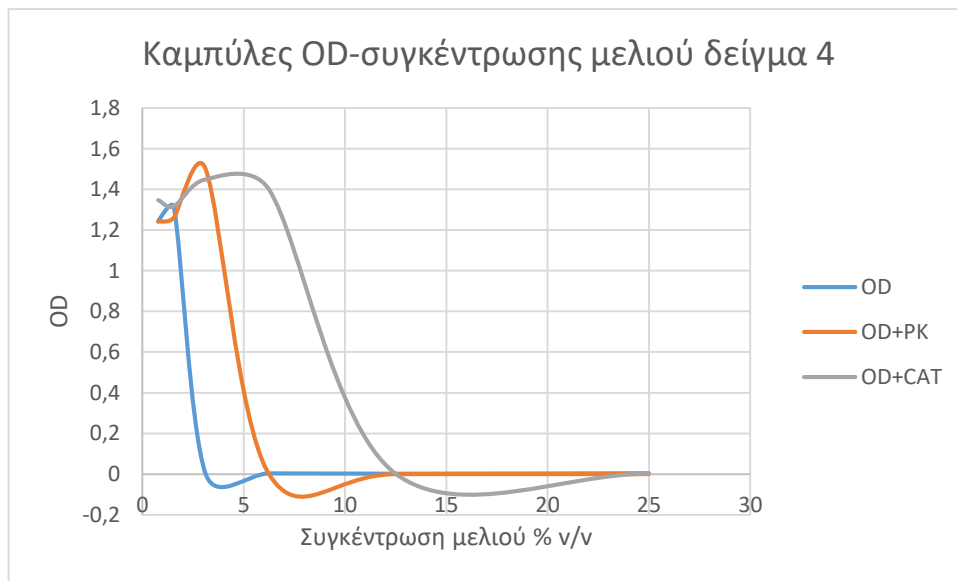


Καμπύλες OD-συγκέντρωσης μελιού δείγμα 98



Καμπύλες OD-Συγκέντρωσης μελιού δείγμα 100

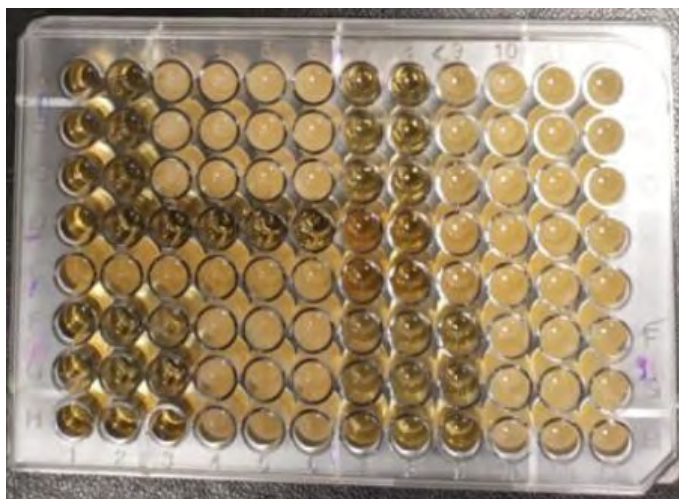




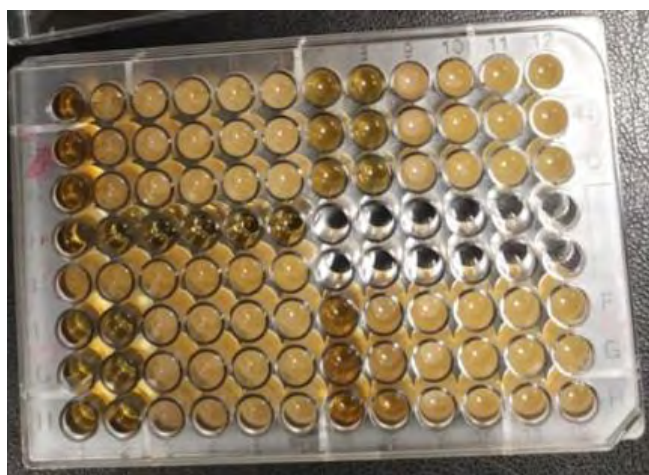
Διάγραμματα 2-9: Καμπύλες της οπτικής πυκνότητας της *P. aeruginosa* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του μελιού για τα δείγματα με MIC 3,125 πριν και μετά την προσθήκη καταλάσης και πρωτεϊνάσης K

Αρχικά, μπορεί να παρατηρηθεί ότι το σημείο τομής κάθε καμπύλης με τον άξονα x συμπίπτει με την τιμή MIC καθώς φαίνεται σε ποια συγκέντρωση μελιού ξεκινά να εμποδίζεται η ανάπτυξη των βακτηρίων. Το MIC μετά από προσθήκη καταλάσης αυξήθηκε σε 12,5% v/v σε 7 δείγματα και σε 6,25% v/v μόνο στο δείγμα 49. Για τα 7 αυτά δείγματα η καμπύλη αυτή (γκρι χρώμα) φαίνεται να έχει την ίδια μορφή, με ορισμένες μικρές διαφορές στην κλίση της από δείγμα σε δείγμα. Με την προσθήκη πρωτεϊνάσης K, το MIC των δειγμάτων 41, 84 και 98 αυξήθηκε σε 12,5% v/v ενώ για τα υπόλοιπα αυξήθηκε σε 6,25% v/v. Για τα δείγματα με MIC 6,25% v/v φαίνεται μια απότομη πτώση του OD και οι καμπύλες έχουν την ίδια μορφή, ενώ για τα δείγματα με MIC 12,5% v/v υπάρχουν διαφορές στην καμπυλότητα στην περιοχή όπου μειώνεται το OD. Στα δείγματα 41, 84, 98 και 49 το MIC μετά από προσθήκη πρωτεϊνάσης K και καταλάσης έχει την ίδια τιμή. Αξίζει να αναφερθεί πως η μεταβολή του OD μετά από προσθήκη των ουσιών αυτών φαίνεται να συμπίπτει για τα δείγματα 41 και 49 καθώς συμπίπτουν οι δύο καμπύλες με εξαίρεση την αρχή τους. Κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει για τα

δείγματα 84 και 98, όπου οι καμπύλες δεν συμπίπτουν και όπως φαίνεται παρουσία καταλάσης το βακτήριο αναπτύσσεται καλύτερα στις συγκεντρώσεις που είναι χαμηλότερες του MIC. Τέλος, δεν φαίνεται να υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές στις καμπύλες ανάλογα με το είδος του δείγματος.



Φωτογραφία 3: Έλεγχος της αντιβακτηριακής δράσης μετά από προσθήκη πρωτεΐνης K στα δείγματα 41, 66, 84 και 95 και επώασης για 16 ώρες. Παρατηρείται η αύξηση του MIC του μελιού Μανυκα από 6,25% σε 12,5% v/v. Το MIC των δειγμάτων 41 και 84 αυξήθηκε σε 12,5% v/v ενώ των 66 και 95 αυξήθηκε σε 6,25% v/v. Συνεπώς τα δείγματα αυτά έχουν πρωτεΐνες και πεπτίδια με αντιμικροβιακή δράση.



Φωτογραφία 4: Έλεγχος της αντιβακτηριακής δράσης μελιών μέσω εκτίμησης του MIC μετά από προσθήκη καταλάσης για τα δείγματα 85, 87, 92 και 94. Παρατηρείται αύξηση του MIC των δειγμάτων 85 και 94 από 6,25% v/v σε 25% v/v και των δειγμάτων 87 και 92 από 6,25% v/v σε 12,5% v/v. Επομένως, και στα 4 αυτά δείγματα ένας μηχανισμός αναστολής της ανάπτυξης της *P. aeruginosa* είναι η παραγωγή H_2O_2 .

Η προσθήκη πρωτεΐνάσης K προκάλεσε αύξηση της τιμής MIC σε 12 από τα 27 δείγματα που ελέγχθηκαν με αυτή τη διαδικασία. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση και στα 8 δείγματα που είχαν πολύ καλή δράση έναντι της *P. aeruginosa* με τιμή MIC ίση με 3,125% v/v, καθώς επίσης και σε 4 ακόμη δείγματα τα οποία είχαν αρχικά MIC 6,25% v/v. Επομένως, μπορεί να ισχυριστεί κανείς πως η αντιβακτηριακή δράση έναντι της *P. aeruginosa* αυτών των δειγμάτων οφείλεται εν μέρει στην ύπαρξη αντιμικροβιακών πρωτεϊνών και πεπτιδίων.

Από τα δείγματα με αρχικό MIC ίσο με 3,125% v/v, τα 5 απέκτησαν MIC ίσο με 6,25 και μόλις 3 απέκτησαν MIC ίσο με 12,5. Τα 3 αυτά ήταν ένα δείγμα από μέλι πεύκου, ένα από μέλι ερείκης και ένα από μέλι βαμβακιού. Συνεπώς, σε αυτά τα τρία δείγματα η δράση των πρωτεϊνών έναντι του βακτηρίου ίσως είναι σημαντικότερη.

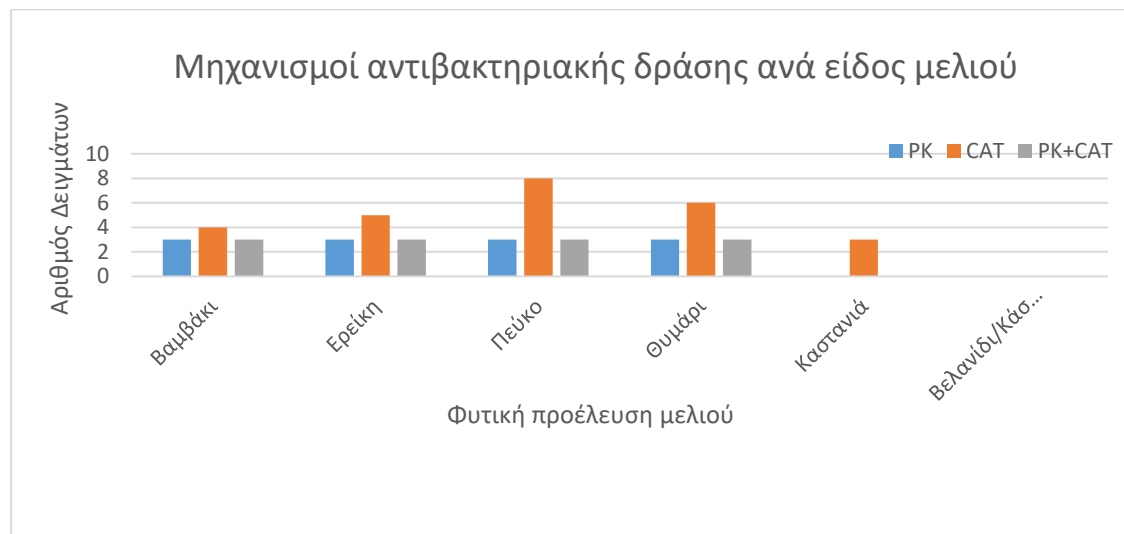
Από τα δείγματα με αρχικό MIC ίσο με 6,25% v/v, μόνο 4 απέκτησαν μεγαλύτερη τιμή MIC ίσης με 12,5. Από αυτά τα 3 ήταν δείγματα από μέλι ερείκης και το 1 ήταν δείγμα από μέλι θυμαριού. Συνολικά, μόνο στο 44,4% των δειγμάτων που ελέγχθηκαν βρέθηκε αύξηση του MIC.

Η προσθήκη καταλάσης προκάλεσε αύξηση του MIC σε όλα τα δείγματα εκτός του 113. Μάλιστα αξίζει να σημειωθεί ότι στα δείγματα 85,94,107,115 και 117 η τιμή MIC αυξήθηκε από 6,25% v/v σε 25% v/v το οποίο υποδηλώνει ισχυρή αντιβακτηριακή δράση μέσω της δράσης H₂O₂ των συγκεκριμένων δειγμάτων. Επιπρόσθετα, 2 από αυτά είναι από καστανιά και 3 από ερείκη το οποίο ίσως υποδεικνύει πιθανώς αυξημένα επίπεδα υπεροξειδίου στα μέλια αυτά, κάτι που απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Ακόμη, στα δείγματα με αρχικό MIC ίσο με 3,125% v/v, η τιμή αυξήθηκε σε 12,5% v/v για όλα εκτός από το δείγμα 49 όπου αυξήθηκε στο 6,25.

Σε 12 από δείγματα που ελέγχθηκαν παρατηρήθηκε αύξηση του MIC τόσο με προσθήκη καταλάσης όσο και πρωτεΐνάσης K. Αυτό οδηγεί στην υπόθεση πως οι δύο αυτοί μηχανισμοί, δηλαδή της παραγωγής αντιμικροβιακών πρωτεϊνών και της παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου συμβάλλουν και οι δύο στην άμυνα έναντι της *P. aeruginosa*. Επίσης, 8 από τα δείγματα αυτά είχαν αρχικό MIC 3,125% v/v. Αυτό ενδεχομένως σημαίνει πως όσο υψηλότερη είναι η αντιβακτηριακή δράση του μελιού, τόσο πιο πιθανό είναι να συμμετέχουν πολλαπλοί μηχανισμοί στην άμυνα έναντι ενός παθογόνου.

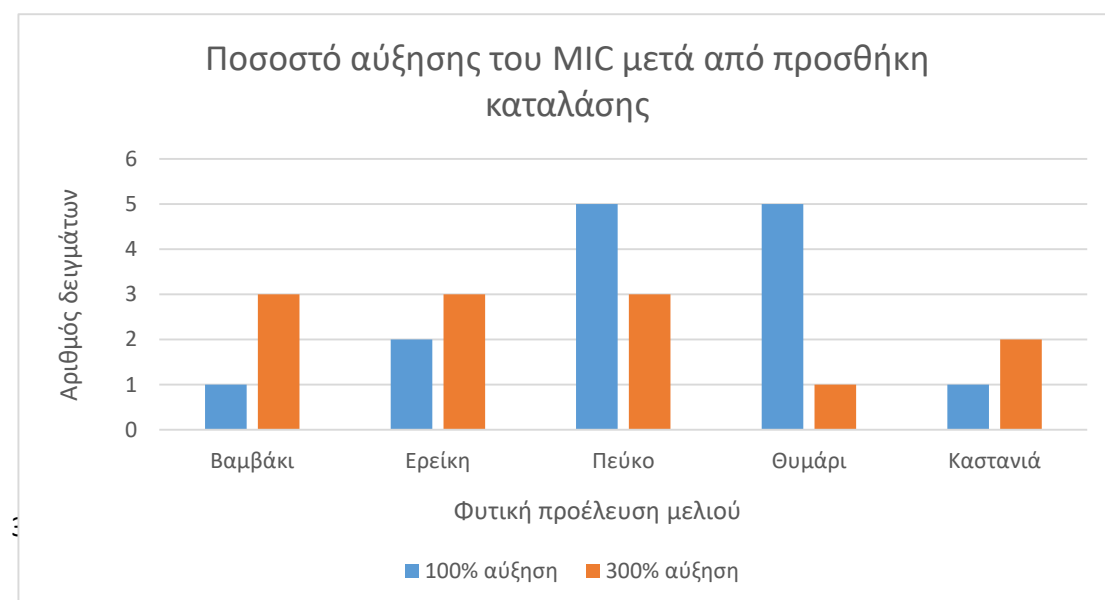
Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως για το δείγμα 113 που είναι μέλι από καστανιά και βελανιδιά φάνηκε πως δεν υπήρχε αύξηση του MIC με προσθήκη καταλάσης ή πρωτεΐνάσης K. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη ενός άλλου μηχανισμού μέσω του οποίου να ασκείται η αντιβακτηριακή δράση ή λόγω πειραματικών σφαλμάτων. Απαιτείται λοιπόν περαιτέρω διερεύνηση και μελέτη του συγκεκριμένου δείγματος.

Στο διάγραμμα που ακολουθεί φαίνεται ποσοτικά σε πόσα δείγματα υπήρχε ο κάθε ένας από τους 2 μηχανισμούς, ή ο συνδυασμός τους. Σχεδόν σε όλα τα είδη υπήρξαν κάποια δείγματα που εμφάνισαν συνδυασμό των δύο μηχανισμών.



Διάγραμμα 10: Απεικόνιση του αριθμού δειγμάτων που εμφανίζουν τον κάθε αντιβακτηριακό μηχανισμό

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, 26 από τα 27 δείγματα των οποίων ελέγχθηκε ο μηχανισμός δράσης της αντιβακτηριακής τους ικανότητας εμφάνισαν δράση μέσω υπεροξειδίου του υδρογόνου. Όμως, δεν παρατηρήθηκε ίδια αύξηση του MIC για όλα τα δείγματα ίδιας φυτικής προέλευσης. Στο διάγραμμα που ακολουθεί απεικονίζεται ο αριθμός των δειγμάτων από κάθε είδος φυτού που είχαν μια συγκεκριμένη αύξηση του MIC. Παρατηρείται πως υπήρχαν δύο πιθανές αυξήσεις, είτε 100% είτε 300%. Η πρώτη αντιστοιχεί σε αύξηση του MIC από 3,125% v/v σε 6,25% v/v ή από 6,25% v/v σε 12,5% v/v ενώ η άλλη αντιστοιχεί σε αύξηση από 3,125% v/v σε 12,5% v/v ή από 6,25% v/v σε 25% v/v. Για τα πευκόμελα και τα θυμαρίσια μέλια η πλειοψηφία των δειγμάτων εμφάνισε αύξηση 100% ενώ για τα υπόλοιπα είδη η αύξηση 300% ήταν η συχνότερη (διάγραμμα 11). Οι διαφορές αυτές ενδεχομένως οφείλονται στις διαφορετικές γεωγραφικές προελεύσεις των μελιών του ίδιου είδους, το οποίο επιβεβαιώνεται για μερικά δείγματα. Για παράδειγμα, σε όλα τα πευκόμελα Χαλκιδικής το MIC τετραπλασιάστηκε, ενώ στα υπόλοιπα πευκόμελα διπλασιάστηκε. Στα μέλια από ερείκη χαλκιδικής το MIC επίσης τετραπλασιάστηκε ενώ στα άλλα δείγματα ερείκης διπλασιάστηκε.



Διάγραμμα 11: Απεικόνιση του ποσοστού αύξησης του MIC μετά από προσθήκη καταλάσης

4.Συζήτηση

Η μικροβιακή αντίσταση στο μέλι είναι κάτι που δεν έχει ακόμα παρατηρηθεί, γεγονός που το καθιστά ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο έναντι βακτηρίων ανθεκτικών σε πολλά αντιβιοτικά (Mandal et al., 2011). Το μέλι Manuka έχει μελετηθεί ευρέως και η αντιβακτηριακή του ικανότητα είναι γνωστή παγκοσμίως. Όμως, τις τελευταίες δεκαετίες έχουν αυξηθεί σημαντικά οι έρευνες πάνω σε τοπικά, όχι τόσο γνωστά σε ευρεία κλίμακα μέλια και έχει αποδειχθεί πως μπορούν να έχουν ίδια ή και καλύτερη δράση έναντι βακτηρίων (Lusby et al., 2005). Στο πλαίσιο αυτό κινήθηκε και η μελέτη αυτή με στόχο την εκτίμηση της αντιβακτηριακής ικανότητας πολλών μη μελετημένων όσο το Manuka μελιών. Τα ελληνικά μέλια εμφανίζουν σημαντική ποικιλότητα, διότι παράγονται από ένα μεγάλο εύρος φυτών αρκετά εκ των οποίων είναι ενδημικά. Το βακτήριο που μελετήθηκε ήταν η *P. aeruginosa*, ένα πολύ σημαντικό νοσοκομειακό παθογόνο βακτήριο, με χρήση της τεχνικής MIC με χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης των δειγμάτων του μελιού. Ελέγχθηκε επίσης και ο μηχανισμός της αντιβακτηριακής ικανότητας μέσω της προσθήκης καταλάσης και πρωτεΐνης K.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η πλειοψηφία των δειγμάτων που ελέγχθηκαν είχε ίση ή καλύτερη δράση συγκρινόμενη με του μελιού Manuka, γεγονός που επιβεβαιώνει την αρχική υπόθεση ότι πολλά μέλια μπορεί να είναι ισχυρότερα έναντι βακτηρίων. Επίσης φαίνεται πως τα μέλια από πεύκο και βαμβάκι ήταν γενικότερα πιο αποτελεσματικά έναντι της *P. aeruginosa* σε σχέση με τα άλλα. Ειδικότερα το βαμβακόμελο εμφάνισε τα καλύτερα αποτελέσματα και δράση ισχυρότερη από το Manuka στα περισσότερα από τα δείγματα αυτού του είδους που ελέγχθηκαν. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι γενικά ως μέλι περιέχει πολύ υψηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου, μεγαλύτερες από άλλα είδη μελιού. Εκτός από το είδος του φυτού γενικότερα είναι γνωστό πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και η περιοχή προέλευσης. Η υπόθεση αυτή ενδεχομένως μπορεί να υποστηριχθεί από το γεγονός ότι τα πευκόμελα Χαλκιδικής εμφάνισαν εξαιρετικά ισχυρή αντιβακτηριακή δράση με MIC στο 3,125% v/v, το οποίο μπορεί να οφείλεται στις συνθήκες που επικρατούν στην περιοχή αυτή. Απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση και έλεγχος περισσότερων δειγμάτων για να εξακριβωθούν αυτά τα αποτελέσματα. Όσον αφορά τους μηχανισμούς δράσης, όλα τα δείγματα εκτός από ένα ασκούσαν αντιβακτηριακή δράση μέσω του υπεροξειδίου, με ένα μεγάλο μέρος τους να χρησιμοποιεί παράλληλα και αντιβακτηριακά πεπτιδικά. Φαίνεται πράγματι λοιπόν πως η χρήση του H₂O₂ είναι ο κύριος μηχανισμός εκ των δύο.

Συμπερασματικά, αφού όλα τα μέλια που εξετάστηκαν εμφάνισαν αντιβακτηριακή δράση θα ήταν σημαντικό για μελλοντικές έρευνες σε τομείς όπως η παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων να εξεταστούν τα ελληνικά μέλια ως χρήσιμο εργαλείο, ειδικά σε μια εποχή που τα βακτήρια καθίστανται ολοένα και πιο ανθεκτικά σε αντιβιοτικά. Τα δείγματα που ελέγχθηκαν προέρχονται από περιοχές όλης της Ελλάδας και, κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης παρέχουν μια καλή εικόνα για την υψηλού επιπέδου αντιβακτηριακή δράση των ελληνικών μελιών. Ως μελλοντική κατεύθυνση θα ήταν μεγάλης σημασίας ο έλεγχος περισσότερων δειγμάτων μελιών κάθε κατηγορίας και ενδεχομένως και φυτικών προελεύσεων που δεν ελέγχθηκαν στην μελέτη αυτή, καθώς η Ελλάδα προσφέρει σημαντική φυτική βιοποικιλότητα. Τέλος, θα ήταν σημαντική η πλήρης αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών δράσης των αντιβακτηριακών παραγόντων του μελιού και η εκτενής ανάλυση των διαφορετικών ουσιών του ώστε να χαρακτηριστεί η πιθανή συμμετοχή άλλων ουσιών στην αντιβακτηριακή δράση του.

5. Βιβλιογραφία

- Adams, C. J., Manley-Harris, M., & Molan, P.C. (2009). The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey, *Carbohydrate Research* 344, 1050-1053
- Ahmed, S., Sulaiman, S. A., Baig, A. A., Ibrahim, M., Liaqat, S., Fatima, S., . . . Othman, N. H. (2018). Honey as a Potential Natural Antioxidant Medicine: An Insight into Its Molecular Mechanisms of Action. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-19
- Albaridi, N. A. (2019). Antibacterial Potency of Honey. *International Journal of Microbiology*, 1-10
- Anthimidou, E. and Mossialos, D. , (2012). Antibacterial activity of Greek and Cypriot honeys against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in comparison to Manuka honey, *Journal of medicinal food*, 16 (1):42-47
- Blair, S., Cokcetin, N., Harry, E., & Carter, D. (2009). The unusual antibacterial activity of medical-grade *Leptospermum* honey: antibacterial spectrum, resistance and transcriptome analysis. *European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 28(10), 1199-1208
- Brudzynski, K., Abubaker, K., Laurent, M., & Castle, A. (2011). Re-Examining the Role of Hydrogen Peroxide in Bacteriostatic and Bactericidal Activities of Honey. *Frontiers In Microbiology*, 2
- Chua, L. S., Rahaman, N. L., Adnan, N. A., & Tan, T. T. (2013). Antioxidant Activity of Three Honey Samples in relation with Their Biochemical Components. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 1-8
- Cooper, R., Jenkins, L., Henriques, A., Duggan, R., & Burton, N. (2010). Absence of bacterial resistance to medical-grade manuka honey. *European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 29(10), 1237-1241
- Curran, C. S., Bolig T., & Torabi-Parizi, P. (2018). Mechanisms and Targeted Therapies for *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* Volume 197 Number 6
- Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. (2003). *Clinical Microbiology and Infection*, 9(8)

- Džugan, M., Tomczyk, M., Sowa, P., & Grabek-Lejko, D. (2018). Antioxidant Activity as Biomarker of Honey Variety. *Molecules*, 23(8), 2069
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., & Wahab, M. S. (2012). Honey: A Novel Antioxidant. *Molecules*, 17(4), 4400-4423
- Ilyasov, R., Gaifullina, L., Saltykova, E., Poskryakov, A., & Nikolenko, A. (2012). Review of the Expression of Antimicrobial Peptide Defensin in Honey Bees *Apis Mellifera L.* *Journal of Apicultural Science*, 56(1)
- Israili, Z. H. (2014). Antimicrobial Properties of Honey. *American Journal of Therapeutics*, 21(4), 304-323.
- Johnston, M., McBride, M., Dahiya, D., Owusu-Apenten, R., & Nigam, P. S. (2018). Antibacterial activity of Manuka honey and its components: An overview. *AIMS Microbiology*, 4(4), 655-664.
- Kronka, J., Cooper, R., & Maddocks, S. (2013). Manuka honey inhibits siderophore production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*, 115(1), 86-90.
- Kwakman, P., Velde, A., Boer, L., Speijer, D., Christina Vandenbroucke-Grauls, M., & Zaat, S. (2010). How honey kills bacteria. *The FASEB Journal*, 24(7), 2576-2582
- Lerrer, B., Zinger-Yosovich, K., Avrahami, B., & Gilboa-Garber, N. (2007). Honey and royal jelly, like human milk, abrogate lectin-dependent infection-preceding *Pseudomonas aeruginosa* adhesion. *The ISME Journal*, 1(2), 149-155
- Lusby, P. E., Coombes, A. L., & Wilkinson, J. M. (2005). Bactericidal Activity of Different Honeys against Pathogenic Bacteria. *Archives of Medical Research*, 36(5), 464-467.
- Maddocks, S. E., & Jenkins, R. E. (2013). Honey: A sweet solution to the growing problem of antimicrobial resistance? *Future Microbiology*, 8(11), 1419-1429.
- Maddocks, S., Lopez, M., Rowlands, R., & Cooper, R. (2012). Manuka honey inhibits the development of *Streptococcus pyogenes* biofilms and causes reduced expression of two fibronectin binding proteins. *Microbiology*, 158(3), 781-790
- Majtan, J., Bohova, J., Horniackova, M., Klaudiny, J., & Majtan, V. (2013). Anti-biofilm Effects of Honey Against Wound Pathogens *Proteus mirabilis* and *Enterobacter cloacae*. *Phytotherapy Research*, 28(1), 69-75

- Mandal, M. D., & Mandal, S. (2011). Honey: Its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2), 154-160.
- Mundo, M., Padilla-Zakour, O., & Worobo, R. (2004). Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *International Journal Of Food Microbiology*, 97(1), 1-8
- Patton, T., Barrett, J., Brennan, J., & Moran, N. (2006). Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey. *Journal of Microbiological Methods*, 64(1), 84-95.
- S. K. Jaganathan and M. Mandal (2009) Honey constituents and their apoptotic effect in colon cancer cells, *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, vol. 1, no. 2, pp. 29–36, 2009.
- Samarghandian, S., Farkhondeh T., & Samini, F. (2017) Honey and Health: A Review of Recent Clinical Research, *Pharmacognosy Research*
- Shekilango, S.G, R.J Mongi and N.B Shayo (2016) Colour and Antioxidant Activities of Honey From Different Floral Sources and Geographical Origins in Tanzania, *Tanzania Journal of Agricultural Sciences* Vol.15 No.2, 101-113
- Stagos, D., Soulitsiotis, N., Tsadila, C., Papaeconomou, S., Arvanitis, C., Ntontos, A., . . Mossialos, D. (2018). Antibacterial and antioxidant activity of different types of honey derived from Mount Olympus in Greece. *International Journal of Molecular Medicine*
- Stratton, C. W. (1983). *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection Control*, 4(1), 36-40.
- Takzaree, N., Hassanzadeh, G., Reza Rouini, M., Manayi, A., Hadjiakhondi, A., & Majidi Zolbin, M. (2017). Evaluation of the Effects of Local Application of Thyme Honey in Open Cutaneous Wound Healing. *Iran J Public Health* Vol. 46, No. 4, Apr 2017, pp. 545-551
- Θρασυβούλου Α., Μανίκης Ι., Τανανάκη Χ., Τσέλλιος, Καραμπουρνιώτη Σ., 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