



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΠΕΥΚΟΜΕΛΩΝ
ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF GREEK PINE HONEYS FROM VARIOUS
GEOGRAPHIC REGIONS



Διπλός Σάμπο Ανδριανός Πανούσος

Πατρώνυμο: Διπλός Δημήτριος

Λάρισα 2020-2021

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Abstract.....	6
1. Εισαγωγή.....	7
Γενικές πληροφορίες.....	7
Θρεπτικά και μη θρεπτικά συστατικά του μελιού.....	8
Ανθόμελα και μέλια μελιτώματος.....	9
<i>Marchalina hellenica</i>	11
Μέλι Manuka.....	11
Ιδιότητες-οφέλη μελιού.....	13
Μηχανισμοί δράσης.....	14
Πολυφαινόλες και φλαβονοειδή.....	18
Υπό μελέτη παθογόνα βακτήρια.....	19
<i>Staphylococcus aureus</i>	19
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20
<i>Acinetobacter baumannii</i>	21
<i>Salmonella typhimurium</i>	22
Σκοπός.....	22
2. Πειραματικό μέρος.....	23
Υλικά και μέθοδοι.....	23
Διαδικασία.....	26
3. Αποτελέσματα.....	30
Αποτελέσματα μεθόδου διάχυσης σε πηγαδάκια.....	30
Αποτελέσματα δοκιμής MIC.....	34
Έλεγχος μηχανισμού δράσης.....	39
Γενικές παρατηρήσεις.....	40
4. Συζήτηση.....	41

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 άψογη συνεργασία μας.

Επίσης 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 την καθοδήγηση που μου παρείχε.

Περίληψη

Ήδη από τους αρχαίους χρόνους διάφοροι πολιτισμοί χρησιμοποιούσαν το μέλι για τη θρεπτική του αξία αλλά και τις θεραπευτικές του ικανότητες. Σήμερα, με την εμφάνιση πολυανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτήρια, η εύρεση νέων τρόπων αντιμετώπισής τους είναι αναγκαία. Πολλές είναι οι έρευνες που δείχνουν πως το μέλι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε θεραπείες μολύνσεων καθώς εμφανίζει σημαντικές αντιβακτηριακές ικανότητες. Το πολύ μελετημένο φαρμακευτικό μέλι Manuka της Νέας Ζηλανδίας, το οποίο διαθέτει τον αντιμικροβιακό παράγοντα μεθυλγλυοξάλη, έχει βρεθεί να αντιμετωπίζει μια μεγάλη ποικιλία βακτηρίων.

Στην Ελλάδα παράγονται ετησίως 12.000 με 13.000 τόνοι μελιού από τους οποίους η πλειονότητα είναι πευκόμελα. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία πως τα μέλια μελιτώματος όπως το πευκόμελο εμφανίζουν σημαντικότερη αντιβακτηριακή δράση από τα ανθόμελα. Έτσι, στην παρούσα εργασία 26 πευκόμελα μελετήθηκαν ως προς την αντιβακτηριακή τους ικανότητα έναντι των παθογόνων βακτηρίων *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* και *Salmonella typhimurium*. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της αντιβακτηριακής ικανότητας των μελιών είναι η μέθοδος διάχυσης σε πηγαδάκια (Well diffusion assay) και η μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης συγκέντρωσης που προκαλεί πλήρη αναστολή στο υπό μελέτη βακτήριο (Minimum inhibitory concentration – MIC). Για να εξακριβωθεί εάν η βακτηριοστατική συγκέντρωση ταυτίζεται με τη βακτηριοκτόνο χρησιμοποιήθηκε επίσης η μέθοδος MBC (Minimum bactericidal concentration). Τέλος, για να μελετηθεί εάν η αντιβακτηριακή δράση των δειγμάτων μελιών οφείλεται στην παρουσία υπεροξειδίου, λόγω του οποίου παρουσιάζουν αντιβακτηριακή ικανότητα κάποια είδη μελιών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος MIC παρουσία καταλάσης.

Όλα τα δείγματα εμφάνισαν αντιβακτηριακή ικανότητα με τα περισσότερα να έχουν ίδια με το μέλι Manuka. Ωστόσο υπήρξαν δείγματα με ισχυρότερη αντιβακτηριακή ικανότητα από το μέλι Manuka, όπως ήταν το δείγμα 100 έναντι του βακτηρίου *Salmonella typhimurium* (MIC 3.125% v/v έναντι 6.25% v/v του Manuka) και τα δείγματα 74, 86, 88, 90 έναντι του βακτηρίου *Staphylococcus aureus* (MIC 0.78% v/v έναντι 1.56% v/v του Manuka). Στα περισσότερα δείγματα η βακτηριοστατική συγκέντρωση ταυτιζόταν με τη βακτηριοκτόνο με εξαίρεση τα δείγματα 26 και 64 στο βακτήριο *Salmonella typhimurium*, το δείγμα 65 στο βακτήριο *Klebsiella pneumoniae* και τα δείγματα 30, 78 και 98 στο βακτήριο *Acinetobacter baumannii*, όπου η βακτηριοκτόνος συγκέντρωση ήταν υψηλότερη της βακτηριοστατικής. Τα αποτελέσματα των δυο μεθόδων, well-diffusion assay και MIC, ταυτίζονταν μόνο κατά 50 έως 60%, πράγμα αναμενόμενο καθώς η μέθοδος MIC χαρακτηρίζεται ως η πιο ακριβής εκ των δυο. Τέλος, φάνηκε και στα επτά καλύτερα δείγματα που επιλέχθηκαν για την ταυτοποίηση του μηχανισμού δράσης τους με την μέθοδο MIC παρουσία καταλάσης πως η τιμή MIC αυξήθηκε, γεγονός που δηλώνει ότι στο μέλι υπάρχει υπεροξείδιο του υδρογόνου, ένα χαρακτηριστικό μόριο που εμφανίζει αντιβακτηριακή δράση. Η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στο δείγμα 100 έναντι όλων των βακτηρίων και η μικρότερη αύξηση στο δείγμα 74, αλλά μόνο έναντι του βακτηρίου *Acinetobacter baumannii*.

Abstract

Since ancient times civilizations used honey for its nutritional value and therapeutic properties. With the recent emergence of multidrug resistant bacteria strains, new ways to face them is required. Many studies show that honey would likely be an alternative treatment for these infectious disease as it has important antibacterial effects. The most studied honey of New Zealand, Manuka, with the unique to this type of honey compound methylglyoxal, can suspend the growth of a variety of bacteria.

In Greece each year 12.000 to 13.000 tons of honey is produced with the majority being pine honey. It is known by former studies that honeydew honeys like pine honey exhibit a stronger antibacterial activity than floral honeys. In this study, 26 pine honeys will be characterized based in their antibacterial activities against the pathogen bacteria *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* and *Salmonella typhimurium*. The methods that were used to specify the antibacterial activity of each honey sample were the well diffusion assay and the minimum inhibitory concentration assay (MIC).

To answer the question if the bactericidal and bacteriostatic concentrations are the same for each honey the method MBC was used. Lastly for the detection of hydrogen peroxide which is a molecule with antibacterial activity in honeys the method MIC with the presence of Catalase was used.

The results of the two methods agree only by 50-60%, thing which is expected because the MIC method is characterized as more accurate between the two. All the samples showed antibacterial activity with the majority being similar to Manuka honey. There were samples with a higher activity of the Manuka honey, sample 100 had a MIC of 3.125% v/v against *Salmonella typhimurium* in contrast to the MIC value of 6.25% v/v that Manuka honey showed. In addition, the samples 74, 86, 88 and 90 had a MIC value of 0.78% v/v against *Staphylococcus aureus* which was again lower than the MIC of Manuka honey (1.56 % v/v) again showing a stronger antibacterial activity.

The majority of the samples had the same value of bactericidal and bacteriostatic concentrations with the exception of the samples 26 and 64 in *Salmonella typhimurium*, the sample 65 in *Klebsiella pneumoniae* and the samples 30, 78, and 98 in *Acinetobacter baumannii*. The seven samples that were chosen for the identification of the mechanism of action with the hydrogen peroxide molecules were tested with the MIC method in presence of Catalase. In all the samples the value of MIC rose (a hint of the presence of hydrogen peroxide) but the biggest increase was observed in the sample 100 and the smallest increase in the sample 74 but only against the bacteria *Acinetobacter baumannii*.

1.Εισαγωγή

Γενικές πληροφορίες

Το μέλι είναι ένα φυσικό προϊόν που παράγεται από τις μέλισσες (*Apis mellifera*, Οικογένεια: Apidae). Οι άνθρωποι χρησιμοποιούσαν το μέλι από τους αρχαίους χρόνους. Οι αρχαιότεροι πολιτισμοί συμπεριλαμβανομένων των αρχαίων Ελλήνων, Κινέζων, Αιγυπτίων, Ρωμαίων, Μάγια και Βαβυλωνίων, καταλάβαιναν το μέλι για την θρεπτική του αξία αλλά και για τις θεραπευτικές του ιδιότητες. Το μέλι είναι ένα φυσικό προϊόν που προέρχεται από έντομο και έχει θρεπτική, θεραπευτική, κοσμητική και βιομηχανική αξία. Το μέλι δεν χρειάζεται να διατηρηθεί σε ψυγείο, δεν χαλάει και μπορεί να αποθηκευτεί κλειστό σε θερμοκρασία δωματίου σε ξηρό μέρος. Το ελεύθερο νερό (water activity) στο μέλι είναι μεταξύ 0.56 και 0.62 και η τιμή του pH του είναι ίση περίπου με 3.9. Το μέλι χρησιμοποιείται ως φυσικό γλυκαντικό από τους αρχαίους χρόνους λόγω της υψηλής συγκέντρωσης του σε φρουκτόζη. (Samarghandian S. et al. , April-June 2017)

Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες είναι πολύ σημαντικοί στην καταπολέμηση των μολυσματικών ασθενειών. Ωστόσο με την εμφάνιση και την διασπορά ανθεκτικών βακτηρίων στελεχών, η αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών μειώνεται δραματικά. Αυτού του είδους βακτήρια, που εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε αντιμικροβιακούς παράγοντες, αποτελούν απειλή για την δημόσια υγεία καθώς η συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών αυξάνεται παγκοσμίως. Για αυτόν τον λόγο απαιτούνται νέες στρατηγικές καταπολέμησης των βακτηρίων. Οι συνθήκες αυτές οδήγησαν σε επαναξιολόγηση αρχαίων θεραπειών με χρήση βοτάνων και φυτικής προέλευσης προϊόντων, όπως το μέλι. Η χρήση της παραδοσιακής ιατρικής για την θεραπεία μολύνσεων χρησιμοποιείται από αρχαιότερων χρόνων και το μέλι είναι ένα από τα παλαιότερα παραδοσιακά φάρμακα που θεωρείται σημαντικό για την ίαση αρκετών ασθενειών. Στις μέρες μας πολλοί ερευνητές έχουν αναφέρει την αντιβακτηριακή ικανότητα του μελιού και βρήκαν πως φυσικό μέλι διαθέτει ευρέος φάσματος αντιβακτηριακή δράση σε παθογόνα βακτήρια, βακτήρια του στόματος και βακτήρια που αλλοιώνουν τρόφιμα.

Η πεποίθηση πως το μέλι έχει θρεπτική αξία, δρα ως φάρμακο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αλοιφή, έμεινε μέχρι τις μέρες μας δημιουργώντας ένα κλάδο της ιατρικής την απιθεραπεία. Ο κλάδος αυτός προσφέρει θεραπείες βασισμένες στο μέλι και άλλα μελισσοκομικά προϊόντα για καταπολέμηση ασθενειών και βακτηριακών λοιμώξεων. Στις μέρες μας πλέον πωλούνται πολλά μέλια με τυποποιημένη αντιβακτηριακή ικανότητα. Το μέλι Manuka που προέρχεται από το φυτό *Leptospermum scoparium*, αναφέρεται πως έχει κατασταλτική δράση σε 60 είδη βακτηρίων, αερόβιων και αναερόβιων, gram θετικών και gram αρνητικών. Το μέλι Tualang έχει ευρεία δράση έναντι βακτηρίων του εντέρου και βακτηρίων που μολύνουν πληγές. Τα φυσικά μέλια μπορούν να διαφέρουν μέχρι και 100 φορές στην αντιβακτηριακή τους δραστηριότητα λόγω του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Επιπρόσθετα, το μέλι είναι υδροσκοπικό, που σημαίνει πως απορροφά υγρασία από το περιβάλλον οδηγώντας στην αφυδάτωση βακτηρίων και λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα και του χαμηλού του pH επίσης μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξή τους. (Mandal M. D. , Mandal S. , 1 April 2011)

Θρεπτικά και μη θρεπτικά συστατικά του μελιού

Σήμερα έχουν αναγνωρισθεί περίπου 300 είδη μελιών. Αυτές οι ποικιλίες συσχετίζονται με τα διαφορετικά είδη νέктαρ που συλλέγουν οι μέλισσες. Το κύριο συστατικό του μελιού είναι οι υδατάνθρακες που αποτελούν το 95-97% του ξηρού του βάρους. Επίσης, το μέλι περιέχει κύριες ενώσεις όπως πρωτεΐνες, βιταμίνες, αμινοξέα, μεταλλικά στοιχεία και οργανικά οξέα. Το μέλι επίσης περιέχει φλαβονοειδή, πολυφαινόλες, αναγωγικές ενώσεις, αλκαλοειδή, γλυκοζίτες, ανθρακινόνες και πτητικές ενώσεις. Οι μονοσακχαρίτες (φρουκτόζη και γλυκόζη) είναι τα πιο σημαντικά σάκχαρα του μελιού καθώς συμβάλλουν στην θρεπτική αξία και τις φυσικές ιδιότητές του. Επιπρόσθετα, μικρότερες ποσότητες δισακχαριτών (σουκρόζη, γαλακτόζη, α,β-τρεχαλόζη, gentiobiose και lamibaribiose), τρισακχαριτών (μελισιτόζη, μαλτοτριόζη, 1-κετόζη, πανόζη, ισομαλτόζη-γλυκόζη, erlose, ισομαλτοριόζη, theanderose, centose, ισοπανόζη και μαλτοπεντανόζη) και ολιγοσακχαριτών είναι παρούσες στο μέλι. Πολλά από αυτά τα σάκχαρα σχηματίζονται κατά την διαδικασία ωρίμανσης του μελιού.

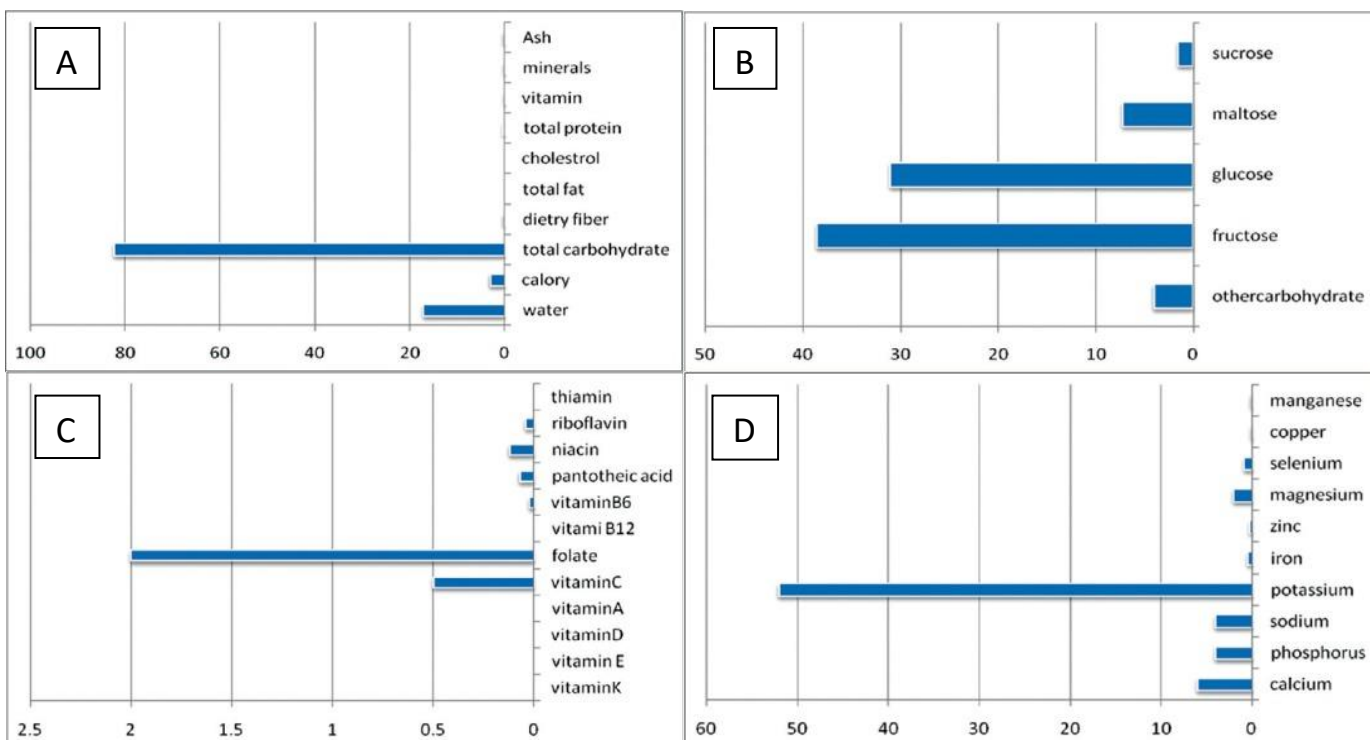
Το γλυκονικό οξύ, ένα προϊόν της οξειδωσης της γλυκόζης, είναι το κύριο οργανικό οξύ στο μέλι. Επίσης έχουν βρεθεί μικρές ποσότητες από οξικό, μυρμηκικό και κιτρικό οξύ. Αυτά τα οργανικά οξέα είναι υπεύθυνα για την όξινη ιδιότητα (pH μεταξύ 3.2 και 4.5) του μελιού. Το μέλι επίσης αποτελείται από μερικά σημαντικά αμινοξέα όπως είναι τα εννέα απαραίτητα αμινοξέα και όλα τα μη απαραίτητα εκτός της ασπαραγίνης και της γλουταμίνης. Η προλίνη χαρακτηρίστηκε ως το κύριο αμινοξύ του μελιού με τα υπόλοιπα να την ακολουθούν. Τέλος τα ένζυμα (διαστάση, ινβερτάση, οξειδάση της γλυκόζης, καταλάση και όξινη φωσφατάση) αποτελούν τα κύρια πρωτεϊνικά συστατικά του μελιού.

Τα επίπεδα βιταμινών του μελιού είναι χαμηλά και δεν είναι κοντά στα προτεινόμενα επίπεδα ημερήσιας πρόσληψης. Όλες οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες υπάρχουν στο μέλι με πιο συχνή την βιταμίνη C. Περίπου 31 μεταβλητά μεταλλικά στοιχεία έχουν βρεθεί στο μέλι συμπεριλαμβανομένων του φωσφόρου, νατρίου, ασβεστίου, καλίου, θείου, μαγνησίου και χλωρίου. Πολλά απαραίτητα ιχνοστοιχεία επίσης ανιχνεύονται στο μέλι όπως πυρίτιο, ρουβίνιο, βανάδιο, ζιρκόνιο, λίθιο και στρόντιο. Ωστόσο βαρέα μέταλλα όπως ο μόλυβδος, το κάδμιο και το αρσενικό περιέχονται ως ρύπιο.

Έχουν ανιχνευθεί περίπου εξακόσια πτητικά συστατικά στο μέλι που συμβάλλουν στις πιθανά βιοιατρικές του ιδιότητες. Οι πτητικές ενώσεις του μελιού είναι λίγες, όμως εμπεριέχονται αλδεΐδες, αλκοόλες, υδρογονάνθρακες, κετόνες, όξινοι εστέρες, βενζόλιο και τα παράγωγά του, πυράνιο, τερπένιο και τα παράγωγά του, norisorenoids και επίσης ενώσεις θείου, φουρανίου και κυκλικές ενώσεις. Τα φλαβονοειδή και οι πολυφαινόλες που δρουν ως αντιοξειδωτικά είναι τα δύο κύρια βιοδραστικά μόρια που εμπεριέχονται στο μέλι. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν την ύπαρξη περίπου τριάντα τύπων πολυφαινόλων στο μέλι. Η ύπαρξη και τα επίπεδα αυτών των πολυφαινόλων ποικίλουν αναλόγως την βοτανική του προέλευση, τις κλιματικές και τις γεωγραφικές συνθήκες. Μερικές βιοδραστικές ενώσεις συμπεριλαμβανομένων της galangin, της κουερσετίνης, kaempferol, της λουτεολίνης και isorhamnetin εμπεριέχονται σε όλους τους τύπους μελιού. Ενώ οι ενώσεις naringenin και hesperetin μπορούν να βρεθούν σε συγκεκριμένες ποικιλίες. Γενικώς, οι περισσότερες ενώσεις φλαβονοειδών και φαινόλων του μελιού αποτελούνται από το γαλλικό οξύ, το συριγγικό οξύ, το ελαγικό οξύ, το βενζοϊκό οξύ, το κινναμωμικό οξύ, το χλωρογενικό, το καφεϊκό οξύ, isorhamnetin, το φουρουλικό οξύ, τη μυρικετίνη, chrysin, το

κουμαρικό οξύ, την απιγενίνη, την κουερσετίνη, kaempferol, hesperetin, galangin, catechin, την λουτεολίνη και naringenin. Έχει αναφερθεί ότι τα συστατικά του μελιού εμφανίζουν αντιοξειδοτικές, αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμυτωτικές, αντικαρκινικές και αντιμεταστατικές δράσεις. (Samarghandian S. , Farkhondeh T. , Samini F. , April-June 2017)

Εικόνα , A) Γράφημα γενικής σύστασης μελιού (μέση ποσότητα σε 100 g). B) Υδατάνθρακες (μέση ποσότητα σε 100 g). C) Βιταμίνες (μέση ποσότητα σε 100 g). D) Σύσταση μεταλλικών στοιχείων μελιού (βασικά ιχνοστοιχεία και μέταλλα). (Samarghandian S. , Farkhondeh T. , Samini F. , April-June 2017)



Ανθόμελα και μέλια μελιτώματος.

Τα μέλια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σύμφωνα με τη βοτανική τους προέλευση: στα ανθόμελα και στα μέλια μελιτώματος. Οι μέλισσες φτιάχνουν το ανθόμελο από το νέκταρ των ανθών των ανθισμένων φυτών. Αντίστοιχα το μέλι μελιτώματος παράγεται από τις εκκρίσεις φυτών (γένη Pinus, Abies, Castanea και Quercus) και εκκρίσεων εντόμων κυρίως της οικογένειας Arhididae. Το μελιτώμα που εκκρίνουν τα έντομα δεν μπορεί να θεωρηθεί περίττωμα καθώς ο χυμός του δέντρου δεν χωνεύεται από το στομάχι του εντόμου. Οι μέλισσες συλλέγουν αυτές τις εκκρίσεις και τις επεξεργάζονται με ειδικά ένζυμα πριν τις αποθηκεύσουν στην κυψέλη όπου και ωριμάζουν.

Το εμπορικό ενδιαφέρον στα μέλια μελιτώματος αυξάνεται καθώς φαίνεται να διαθέτουν σημαντικότερες θεραπευτικές ιδιότητες σε σχέση με τα ανθόμελα. Υψηλότερη αντιβακτηριακή και αντιοξειδωτική δραστηριότητα έχει βρεθεί στα μέλια μελιτώματος αντίθετα από τα ανθόμελα. Τέλος η βιομηχανία τροφίμων προτιμά αυτού του είδους το μέλι λόγω της έντονης γεύσης του. Τα μέλια μελιτώματος και τα ανθόμελα εμφανίζουν διαφορετικό χρώμα, πιο σκούρο χρώμα έχουν τα μέλια μελιτώματος, χημική σύσταση καθώς και φυσικοχημικές και βιοχημικές ιδιότητες. (Pita-Calvo C. , Vazquez M. , 20 Feb 2018)

Έχει εκτιμηθεί πως η Ελλάδα παράγει 12,000-13,000 τόνους μελιού ετησίως από τους οποίους το 60-65% αντιστοιχεί στο πευκόμελο, 10% στο θυμαρίσιο μέλι, 10% αντιστοιχεί σε μέλι από εσπεριδοειδή και 5 με 10% αντιστοιχούν σε μέλι έλατου. Μέλια καστανιάς, ερείκης, βαλανιδιάς και βαμβακιού παράγονται σε μικρότερες ποσότητες. (Karabagias I. K et al. , 2014)

Επίσης, συνήθως χαρακτηρίζονται από υψηλότερες τιμές διαφόρων φυσιοχημικών μεταβλητών που χρησιμοποιούνται σε ποιοτικούς ελέγχους ρουτίνας μελιών, όπως είναι η ηλεκτρική αγωγιμότητα, η οξύτητα pH και η ύπαρξη τέφρας. Η ηλεκτρική αγωγιμότητα χρησιμοποιείται στον ποιοτικό έλεγχο για τον διαχωρισμό των δυο ειδών μελιού. Η Ευρωπαϊκή νομοθεσία αναφέρει πως τα ανθόμελα και μίγματα αυτών των μελιών πρέπει να έχουν τιμή ηλεκτρικής αγωγιμότητας (EC) ≤ 0.8 mS/cm. Αυτός ο κανόνας δεν ισχύει για συγκεκριμένα μέλια όπως το μέλι από *Erica cinerea*, *Arbutus unedo* (κουμαριά), *Leptospermum scorarium*, *Calluna vulgaris* (ερείκη), *Melaleuca*, *Tilia* και ευκάλυπτο. Μέλια μελιτώματος και καστανιάς ή συνδυασμός αυτών με ανθόμελα πρέπει να έχουν EC ≥ 0.8 mS/cm.

Μια άλλη σημαντική φυσική ιδιότητα που χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση των δυο ειδών μελιού είναι η μέθοδος οπτικής περιστροφής. Το μέλι έχει την ιδιότητα να στρέφει το επίπεδο πόλωσης του φωτός. Η οπτική περιστροφή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο και τη ποσότητα των υδατανθράκων του μελιού. Τα μέλια μελιτώματος και τα νοθευμένα μέλια εμφανίζουν δεξιόστροφη, ενώ τα ανθόμελα αριστερόστροφη, περιστροφή του επιπέδου του πολωμένου φωτός. Τα μέλια μελιτώματος επίσης εμφανίζουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα ολιγοσακχαριτών, κυρίως μελιζιτόζης και ραφινόζης και χαμηλότερη περιεκτικότητα ολιγοσακχαριτών από τα ανθόμελα. Η μελιζιτόζη είναι ένας τρισακχαρίτης και θεωρείται ξεχωριστό χαρακτηριστικό των μελιών μελιτώματος. Οι ολιγοσακχαρίτες του μελιού εμφάνισαν πιθανή προβιοτική δράση καθώς αύξησαν τον αριθμό των λακτοβακίλων και των μπιφίλοβακτηρίων στο ανθρώπινο έντερο. (Pita-Calvo C. , Vazquez M. , 20 Feb 2018)

Σε μια έρευνα ανάλυσης σακχάρων τουρκικών μελιών βρέθηκαν οι εξής περιεκτικότητες σε σάκχαρα στα 50 δείγματα που αναλύθηκαν: Μέσος όρος φρουκτόζης 36.04% με ελάχιστη περιεκτικότητα 26.81% και μέγιστη 42.52%, μέσος όρος γλυκόζης 26.35% με ελάχιστη περιεκτικότητα 17.38% και μέγιστη 35.59%. Ο μέσος όρος της σουκρόζης ήταν 6.95% με ελάχιστη περιεκτικότητα 4.79% και μέγιστη 9.73%. Μέσος όρος φρουκτόζης και γλυκόζης 62% με ελάχιστη περιεκτικότητα 50% και μέγιστη 73.94%. Σύμφωνα με τα στάνταρ του Codex Alimentarius και του Turkish Food Codex η ποσότητα φρουκτόζης και γλυκόζης πρέπει να είναι ανάμεσα στις τιμές 45-60%. Ένα από τα δείγματα είχε χαμηλότερη τιμή από 45%, 18 δείγματα ήταν ανάμεσα στις στάνταρ τιμές και 31 δείγματα είχαν μεγαλύτερη τιμή από την επιθυμητή. Στα πευκόμελα η ποσότητα σουκρόζης σύμφωνα πάλι με τα στάνταρ των Codex Alimentarius και Turkish Food Codex βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές 5-10%. Στην παρούσα μελέτη εκτός από ένα δείγμα, όλα τα υπόλοιπα είχαν μικρότερη τιμή από την στάνταρ. Σε σύγκριση με άλλες μελέτες ανάλυσης σακχάρων σε μέλια μελιτώματος τα αποτελέσματα των τιμών ήταν υψηλότερα. Στην έρευνα του Μπακανδρίτσου (2004) βρέθηκε τιμή φρουκτόζης και γλυκόζης ίση με 48.5% και σουκρόζης 0.16%. Στην έρευνα των Krauze και Zalewski βρέθηκαν οι τιμές ίσες με 34.04% για την φρουκτόζη, 30.92% για την γλυκόζη και 0.98% για την σουκρόζη. (Özkök A. , D'Arcy B. R. , January 2014)

Marchalina hellenica

Το κύριο μέλι δασών εκπροσωπείται από το μελίτωμα, ένα έκκριμα με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα που παρέχεται από έντομα που τρέφονται από χυμούς δέντρων και εκκρίνουν τα περίσσεια σάκχαρα από την τροφή τους. Η *Marchalina hellenica* αναφέρεται ως το πιο σημαντικό έντομο που παράγει μελίτωμα και ευθύνεται για την παραγωγή πευκόμελου στην Ελλάδα. Το είδος αυτό εμφανίζεται σε όλη την ανατολική πλευρά της μεσόγειου θάλασσας.

Η *Marchalina hellenica* είναι μια κοχενίλλη, ένα έντομο που προσβάλλει κυρίως τα φυτά *Pinus halepensis* και *Pinus brutia*. Η προσβολή του φυτού από το εντόμο έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μελιτώματος από αυτό και στην συνέχεια χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα τροφής από τις μέλισσες και μετατρέπεται σε μέλι. Στα μέσα του 1990 η *Marchalina hellenica* εισήχθη τεχνητά στα πευκοδάση της Αττικής για την αύξηση της απόδοσης παραγωγής του μελιού. Ωστόσο, με αυτόν τον τρόπο ταράχθηκε η οικολογική ισορροπία του οικοσυστήματος των πεύκων Αλλεο της περιοχής. Στις μέρες μας έχει παρατηρηθεί υπερπληθυσμός του εντόμου στα πευκοδάση. (Gallis A. July 2011)

Η παραγωγή μελιτώματος αρχίζει τον Ιούνιο και τελειώνει την επόμενη άνοιξη. Οι μέλισσες συλλέγουν μελίτωμα μόνο κατά την περίοδο Αυγούστου-Οκτωβρίου και Μαρτίου-Απριλίου (σπανιότερα). Οι μελισσοκόμοι μετέφεραν το έντομο που βρισκόταν πάνω στα κλαδιά των πεύκων και σε διαφορετικά στάδια λάρβας στην περιοχή τους. Με αυτόν τον τρόπο το έντομο εξαπλώθηκε ταχέως έχοντας υψηλότερο αναπαραγωγικό ρυθμό και πλέον στις μέρες μας υπάρχει σε όλα τα πευκοδάση.

Αν και η *Marchalina hellenica* είναι αμφιλόφυλλη, η αναπαραγωγή επιτυγχάνεται κυρίως με παρθενογένεση καθώς τα αρσενικά είναι πολύ σπάνια. Συνήθως εμφανίζεται μια γενιά κάθε χρόνο. Τα έντομα γεννούν αυγά, τα οποία τυλίγονται σε ένα παχύρρευστο στρώμα που μοιάζει με βαμβάκι. Πριν ανθίσει το χαλέπιο πεύκο (*Pinus halepensis*), οι θεμελιωτές γεννούν πολλά αυγά σε όλα τα μέρη του φυτού. Προτιμώνται μέρη όπως τα κλαδιά, ο κορμός αλλά και πολλές φορές οι ρίζες, αν είναι εκτεθειμένες στον αέρα. (Erlinghagen F. , 2001)

Μέλι Manuka

Οι περισσότερες πρόσφατες έρευνες που μελετούν τον μηχανισμό δράσης του μελιού επικεντρώνονται στο καλά χαρακτηρισμένο μέλι Manuka που παράγεται από συγκεκριμένα ενδημικά είδη θάμνων λεπτόσπερμου της Νέας Ζηλανδίας (*Leptospermum scoparium*) και της Αυστραλίας. (Carter D. A. et al. 20 April 2016)

Το μέλι Manuka αποτελείται από υδατάνθρακες, μέταλλα, πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα και ενώσεις φαινολικών και φλαβονοειδών. Αν και τέτοιου είδους ενώσεις μπορούν να βρεθούν σε άλλου είδους μέλια, το Manuka εμφανίζει άλλα μοναδικά χαρακτηριστικά όπως είναι η υψηλή συγκέντρωση μεθυλγλυοξάλης (MGO), μία οργανική ένωση που σχηματίζεται από την διυδροξυακετόνη (DHA) που συσχετίζεται με την αντιβακτηριακή ικανότητα. Σε αντίθεση με την οξειδάση της γλυκόζης οι αντιβακτηριακές δράσεις του μελιού Manuka είναι ανθεκτικές στην έκθεση σε φως και ζέση. (Johnston M. et al. 27 November 2018)

Μέσω της μεθόδου HPLC έχουν βρεθεί συγκεντρώσεις μεθυλγλυοξάλης ίσες με 828mg/kg στο μέλι Manuka και 24mg/kg σε άλλα είδη μελιών αντίστοιχα. Αρχικά, υπήρχε η πεποίθηση πως η μεθυλγλυοξάλη είναι το κύριο ενεργό συστατικό του μελιού και συχνά αναφέρεται ως μοναδικός παράγοντας του Manuka (unique manuka factor ή UMF), που αποτελεί μέτρο της αντιβακτηριακής ικανότητας του Manuka. Αυτή η αριθμητική αξία που δίνεται στο μέλι Manuka μετριέται έναντι μιας κλίμακας φαινόλης καθώς εμφανίζει γραμμική συσχέτιση με τη δραστικότητα της φαινόλης. Για παράδειγμα, ένα μέλι Manuka με UMF ίσο με 18 έχει ίδια δραστικότητα με ένα διάλυμα 18% φαινόλης. Για κλινική χρήση το μέλι Manuka πρέπει να έχει βαθμό UMF τουλάχιστον ίσο με 10 για να έχει σίγουρη αντιβακτηριακή δράση. Πέρα από την ικανότητα της μεθυλγλυοξάλης να δρα έναντι βακτηρίων, έχει βρεθεί πως υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που συμβάλουν στην αντιβακτηριακή ικανότητα του μελιού Manuka. Μελέτες με την χρήση NMR άρχισαν να ταυτοποιούν επιπλέον ενεργά συστατικά του μελιού Manuka με αντιβακτηριακές ικανότητες. Μέχρι στιγμής έχουν κατηγοριοποιηθεί ως είτε αλειφατικά είτε αρωματικά μόρια, όπου η δεύτερη κατηγορία φαίνεται να εμφανίζει αντιβακτηριακή δράση. Μία μελέτη έδειξε πως πολλά αντιβακτηριακά μόρια που περιέχει το μέλι Manuka είναι πιθανό να δρουν συνεργατικά. Ένα από αυτά τα μόρια μοιάζει με παράγωγο ινοσιτόλης σε επίπεδο δομής, που είναι γνωστό πως κατέχει αντιβακτηριακή ικανότητα. (Maddocks S. E. , Jenkins R. E. , November 2013)

Αν και το υπεροξειδίο του υδρογόνου είναι ένας από τους κύριους αντιβακτηριακούς παράγοντες των μελιών, δεν εντοπίζεται στο μέλι Manuka. Ο Juraj Majtan και οι συνεργάτες του ερεύνησαν την δράση της τεχνητά προστιθέμενης μεθυλγλυοξάλης στην συσσώρευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε φυσικά μέλια διαφορετικά του Manuka. Τα πιο ισχυρά μέλια στην παραγωγή H_2O_2 ήταν δυο μέλια μελιτώματος των οποίων τα 50% διαλύματα συσώρευσαν 306.9 ± 6.8 και 495.8 ± 9.1 μM υπεροξειδίο του υδρογόνου αντιστοίχως. Τα επίπεδα H_2O_2 αυξήθηκαν σημαντικά με την πάροδο του χρόνου και στα δύο μέλια. Σε αντίθεση με αυτά τα μέλια στα οποία προστέθηκε μεθυλγλυοξάλη παράχθηκε σημαντικά λιγότερη ποσότητα H_2O_2 και αυτή η μείωση ήταν δόσοεξαρτώμενη. Επιπρόσθετα, η οξειδάση της γλυκόζης στα μέλια με την παρουσία μεθυλγλυοξάλης σχημάτισε μεγάλο μοριακού βάρους παράγωγα κατά τον χρόνο επώασης καθώς και εμφάνισε παράλληλα απώλεια ενζυμικής δράσης. Τα υψηλά επίπεδα μεθυλγλυοξάλης στο μέλι Manuka αλληλεπιδρώντας με το ένζυμο της οξειδάσης της γλυκόζης πιθανώς ευθύνονται για την αναστολή της παραγωγής H_2O_2 . (Majtan J. et al. , February 2014)

Ιδιότητες-οφέλη μελιού.

Αντιβακτηριακή ικανότητα μελιού

Έχει πλήρως αποδειχθεί πως μέρος της αντιβακτηριακής ικανότητας του μελιού οφείλεται στην υψηλή ώσμωση και στη χαμηλή τιμή pH που αποτελούν δυσμενείς συνθήκες ανάπτυξης για τους περισσότερους μικροοργανισμούς. Ωστόσο, τεχνητά μέλια που κατέχουν μόνο υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων δεν εμφανίζουν την ίδια δραστικότητα με τα φυσικά. Οι πρωτεΐνες εισάγονται μέσα στο μέλι στην κυψέλη και εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία που εξαρτάται από τη μέλισσα και το είδος του φυτού από το οποίο προέρχεται το νέκταρ. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να έχουν άμεση ή έμμεση δραστικότητα, όπως για παράδειγμα έχει η οξειδάση της γλυκόζης και το πεπτιδίο *bee defensin-1*. Κατά την ωρίμανση του μελιού, η οξειδάση της γλυκόζης καταλύει την αντίδραση μετατροπής της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ μέσω της οποίας παράγεται υπεροξειδίο του υδρογόνου. Για πολλά μέλια η περιεκτικότητα σε υπεροξειδίο του υδρογόνου ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για την αντιβακτηριακή δραστικότητα. Η προσθήκη καταλάσης μειώνει την συγκέντρωση του υπεροξειδίου και άρα της αντιβακτηριακής ικανότητας. Μέλια που οφείλουν την δράση τους στο υπεροξειδίο του υδρογόνου καταγράφονται ως μέλια υπεροξειδίου. Εκτός των ενζύμων έχουν καταγραφεί και μικρές ποσότητες κατιονικών πεπτιδίων με αντιβακτηριακές ικανότητες όπως το πεπτιδίο *bee defensin-1*. Η *bee defensin-1* παράγεται στους σιελογόνους αδένες της μέλισσας και ενσωματώνεται στα πρώτα στάδια της κατεργασίας του μελιού. Όπως και άλλα αντιβακτηριακά πεπτιδία είναι μια πρωτεΐνη με πολλές λειτουργίες και πιθανός παίζει ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα της μέλισσας. Στο μέλι *Manuka* φαίνεται πως το πεπτιδίο αυτό είναι τροποποιημένο σε σχέση με τα πεπτιδία που μπορούν να βρεθούν σε άλλα μέλια, και πιθανός αυτό είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του πεπτιδίου με το φυτοχημικό μεθυλγλυοξάλη. Έχει αναγνωρισθεί και ένα δεύτερο πεπτιδίο ντεφενσίνης (*defensin-2*) που πιστεύεται πως δρα ως επαγόμενο αντιβακτηριακό πεπτιδίο στις μέλισσες και μπορεί να συμβάλλει στην αντιβακτηριακή ικανότητα των μελιών. (Maddocks S. E. , Jenkins R. E. , November 2013)

Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα των μελιών προέρχονται από ζωικές και φυτικές πηγές, συμπεριλαμβανομένων και των υγρών και των εκκρίσεων του νέκταρ από τους σιελογόνους αδένες και τον φάρυγγα της μέλισσας. Η ανάλυση του πρωτεόματος σε μέλια καστανιάς, ακακίας, ηλιοτροπίου, ευκάλυπτου και πορτοκαλιού έδειξε πως οι κύριες πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν προέρχονταν από την μέλισσα. Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών που προέρχονται από μέλισσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως σημάδι για την επιλογή μελιών υψηλής ποιότητας αλλά και για την ταυτοποίηση νοθευμένων μελιών. (Valachová I. et al. 2016)

Οι ντεφενσίνες εμπεριέχονται σε μια ευρεία οικογένεια κατιονικών αντιβακτηριακών πεπτιδίων πλούσιων σε κυστεΐνη που δρουν έναντι πολλών μικροοργανισμών και αποτελούν το κύριο αμυντικό μηχανισμό των περισσότερων οργανισμών. Οι ντεφενσίνες είναι μακριά πεπτιδία 36-51 αμινοξέων που εμφανίζουν ομοιότητες στην αλληλουχία λόγω της οποίας έχουν την κοινή δομή που αποτελείται από μια αμινοτελική φουρκέτα, μια α -έλικα και δυο αντιπαράλληλα β φύλλα που σταθεροποιούνται με τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι ντεφενσίνες σκοτώνουν τα βακτήρια καθιστώντας διαπερατή την κυτταρική τους μεμβράνη. (Klaudiny J. et al. January 2005)

Οι ντεφενσίνες των εντόμων είναι ενεργές έναντι κυρίως gram θετικών βακτηρίων και πιο σπάνια έναντι gram αρνητικών βακτηρίων. Είτε εκφράζονται με επαγόμενη έκφραση κατά τη συστηματική ανοσολογική αντίδραση είτε εκφράζονται σε ιστούς που είναι συνεχώς σε επαφή με πιθανές μολυσματικές πηγές στο περιβάλλον. (Valachoná I. et al. 2016)

Οι μέλισσες αποκρίνονται στις μολύνσεις συνθέτοντας διάφορα πεπτίδια που εμφανίζουν εύρος αντιμικροβιακής δραστηριότητας. Στην αιμολέμφο μελισσών μολυσμένων με *Escherichia coli* ταυτοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικοί τύποι κατιονικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων, οι aridaecins, abaecin, hymenoptaecin και defensin. Οι ντεφενσίνες παράγονται τελευταίες, όμως η δράση τους παραμένει μέχρι και 2 εβδομάδες μετά τη μόλυνση.

Μια ακόμα ντεφενσίνη της μέλισσας με το όνομα royalisin απομονώθηκε από βασιλικό πολτό. Και οι δύο ντεφενσίνες (defensin-1 και royalisin) αποτελούνται από 51 αμινοξέα. Διαφέρουν σε ένα αμινοξύ και στη σειρά δυο άλλων αμινοξέων (σύμφωνα με την σύγκριση των αλληλουχιών σε βάσεις δεδομένων). Οι ντεφενσίνες των μελισσών και των βόμβων (bumblebee) εκτείνονται στο καρβοξυτελικό τους άκρο κατά 11 αμινοξέα σε αντίθεση με τις ντεφενσίνες άλλων εντόμων. Καθώς δεν ήταν γνωστό αν οι defensin και royalisin κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια ή από το ίδιο γονίδιο, ερευνητές ταυτοποίησαν τα γονίδια defensin και προσδιόρισαν το μοριακό βάρος του πεπτιδίου royalisin. Αυτό οδήγησε στην εύρεση παραλλαγών-ποικιλιών royalisin/defensin και συνεπώς στο συμπέρασμα πως τα πεπτίδια αυτά προέρχονται από το πολυμορφικό γονίδιο defensin1. Επίσης ταυτοποίησαν ένα νέο γονίδιο (defensin2) που κωδικοποιεί μια ισομορφή της ντεφενσίνης. Η έκφραση των δυο αυτών γονιδίων ντεφενσίνης αναλύθηκε σε ιστούς και επίσης βρέθηκαν ρυθμιστικές αλληλουχίες του υποκινητή που μπορεί να παίρνουν μέρος στην ρύθμιση της έκφρασης των ντεφενσινών. (Klaudiny J. et al. January 2005)

Μηχανισμοί δράσης

Έχει παρατηρηθεί πως παθογόνα ευαίσθητα σε αντιβιοτικά αλλά και τα αντίστοιχα στελέχη βακτηρίων που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά, είναι ομοίως ευπαθή απέναντι στο μέλι. Στον ευαίσθητο σε μεθικιλίνη *S. aureus* και στον MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) έχει βρεθεί πως ο κύριος τρόπος δράσης του μελιού περιστρέφεται γύρω από την διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Έτσι, τα βακτήρια αδυνατούν να διαιρεθούν οδηγώντας στην συσσώρευση κυττάρων με δια κομμένο κυτταρικό κύκλο που έχουν πλήρως διαμορφωμένα νέα μεμβρανικά τοιχώματα. Ο διαχωρισμός των θυγατρικών κυττάρων ελέγχεται με αυτολυσίνες που καταβολίζουν πεπτιδογλυκάνες για να προκύψουν τα δυο νέα κύτταρα. Έχει βρεθεί πως κύτταρα παρουσία του μελιού Manuka χάνουν την δράση των αυτολυσινών. Επίσης έχει δειχθεί πως μετά την προσθήκη Manuka σε κύτταρα MRSA μειώνεται η έκφραση της πρωτεΐνης του στρες UspA οδηγώντας στην μείωση της ικανότητας των βακτηρίων να επιβιώσουν σε συνθήκες κυτταρικού και μεταβολικού στρες.

Η προσθήκη Manuka στο βακτήριο *P. aeruginosa* προκαλεί ευρεία δομική βλάβη που οδηγεί στη λύση του κυττάρου και τελικά στον θάνατο. Γενωμική ανάλυση έδειξε πως η χρήση μελιού Manuka προκάλεσε τη μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης OprF που είναι

σημαντική για τη σταθερότητα της δομής του κυτταρικού φακέλου στους κατά gram αρνητικούς μικροοργανισμούς.

Δυο διαφορετικά μέλια της Νέας Ζηλανδίας (Manuka και Kanuka) και το μέλι τριφυλλίου βρέθηκε πως ασκούν χαρακτηριστικές αλλαγές στο αναπτυξιακό δυναμικό και στην κυτταρική μορφολογία στα βακτήρια *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *S. aureus* και *P. aeruginosa*. Κάθε μικροοργανισμός εμφανίζει ένα μοναδικό προφίλ αντίδρασης μετά από την έκθεσή του σε ανασταλτικές συγκεντρώσεις αυτών των μελιών. Τα βακτήρια *B. subtilis*, *S. aureus* και *E. coli* είχαν μεγαλύτερη φάση προσαρμογής μετά την έκθεσή τους σε μη θανάσιμες δόσεις του κάθε μελιού και η ανάπτυξη αναστέλλονταν πλήρως σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 8-16%. Κατά την μεγαλύτερη σε χρόνο φάση προσαρμογής, τα βακτηριακά κύτταρα ήταν σημαντικά κοντύτερα σε μήκος σε σχέση με τα κανονικά. Αντιθέτως η εκτεταμένη φάση προσαρμογής δεν εμφανίστηκε στο βακτήριο *P.aeruginosa* και χρειάστηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις μελιού για την πλήρη αναστολή της ανάπτυξης. Ωστόσο αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς το βακτήριο αυτό εμφάνισε την υψηλότερη ανθεκτικότητα σε αντιβακτηριακές ουσίες σε σχέση με τα άλλα βακτήρια στα οποία έγιναν οι ίδιες δοκιμές. Το βακτήριο *P.aeruginosa* εμφανίστηκε μακρύτερο μορφολογικά από το συνηθισμένο πιθανά ίσως λόγω της βλάβης που υπέστη στον κυτταρικό φάκελο. Στο βακτήριο *B.subtilis* και *S.aureus* το χρωμόσωμα εμφανίστηκε συμπυκνωμένο μετά την προσθήκη του μελιού και δεν είχε την χαρακτηριστική διαμόρφωση βρόχου που εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής χρωμοσωμικής αντιγραφής. Αυτό δεν ίσχυε για τα βακτήρια *E.coli* και *P.aeruginosa*, πράγμα που δίνει βάρος στην υπόθεση πως κάποιοι κυτταρικοί στόχοι μπορεί να είναι συγκεκριμένοι για κατά gram θετικούς ή gram αρνητικούς μικροοργανισμούς.(Maddocks S. E. , Jenkins R. E. , November 2013)

Επούλωση πληγών

Στα αρχαία χρόνια χρησιμοποιούσαν το μέλι για να επιταχυνθεί η επούλωση πληγών. Στις μέρες μας το μέλι ήδη χρησιμοποιείται ως προϊόν για την θεραπεία έλκους, πληγών κατάκλισης ή άλλων δερματικών μολύνσεων που έχουν προκληθεί από εγκαύματα ή πληγές. Οι θεραπευτικές ιδιότητες του μελιού αποδίδονται στην αντιβακτηριακή του δράση, στην ιδιότητα του να δημιουργεί υγρό περιβάλλον για την πληγή που επιταχύνει την επούλωσή της και τέλος το υψηλό ιξώδες που δημιουργεί μια ασπίδα προστασίας έναντι πιθανών μολύνσεων. Σύμφωνα με έρευνες έχει βρεθεί πως το μέλι Manuka εμφανίζει αντιβακτηριακή δράση έναντι παθογόνων βακτηρίων όπως το βακτήριο *Staphylococcus aureus* και *Helicobacter pylori*, καθιστώντας το ιδανικό για θεραπεία έλκους στομάχου ή τραυμάτων. Το μέλι Manuka έχει την ιδιότητα διέγερσης των μονοκυττάρων, προδρόμων των μακροφάγων, για την έκκριση TNF-a. Επίσης οι γλυκοσυλιωμένες πρωτεΐνες μπορούν να προκαλέσουν την έκκριση TNF-a από μακροφάγα και είναι γνωστό πως αυτή η κυτοκίνη ενεργοποιεί το μηχανισμό επούλωσης πληγών. Η ικανότητα του μελιού να μειώνει την απελευθέρωση δραστικών ριζών μπορεί να περιορίσει την ζημιά που προκαλούν τα μακροφάγα κατά την διαδικασία επούλωσης της πληγής. Έτσι η ανοσορυθμιστική δράση του μελιού σχετίζεται με την επούλωση πληγών. Το μέλι επάγει την διόρθωση του εντερικού βλεννογόνου και διεγείρει την ανάπτυξη νέου ιστού και επίσης δρα ως αντιφλεγμονώδης παράγοντας (Mandal M. D. , Mandal S. , 1 April 2011).

Αντι-βιομεμβρανική δράση μελιού

Έχουν αρχίσει να συγκεντρώνονται πολλά αποτελέσματα που περιγράφουν την αντισυγκολλητική ή αντι-βιομεμβρανική ικανότητα διαφόρων μελιών. Οι βιομεμβράνες αποτελούν έναν τρόπο ανάπτυξης των βακτηρίων που υπάρχει παντού στην φύση αλλά αποτελούν πρόβλημα στο ιατρικό τομέα και στις ανθρώπινες ασθένειες. Μερικές από τις καλύτερα χαρακτηρισμένες βιομεμβράνες είναι αυτές της στοματικής κοιλότητας, που περιλαμβάνουν την οδοντική πλάκα. Σε αυτές τις βιομεμβράνες το κύριο βακτηριακό στέλεχος είναι το *Streptococcus mutans*. Μελέτες έδειξαν πως το Manuka είναι βακτηριοκτόνο για το συγκεκριμένο βακτήριο και μπορεί να αναστέλλει την ανάπτυξή του στην επιφάνεια γυαλιού και δίσκους υδροξυαπατίτη καλυμμένους με σάλιο. Βιομεμβράνες που περιέχουν πολλά διαφορετικά είδη όπως *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Actinomyces viscosus*, *Porphyromonas gingivalis* και *Fusobacterium nucleatum* επίσης εμφάνισαν αναστολή παρουσία του μελιού. Αυτό καθιστά το μέλι ως μια εναλλακτική πιθανή θεραπεία έναντι της τερηδόνας στη θέση φαρμάκων όπως η χλωρhexιδίνη που εμφανίζει παρενέργειες. Ωστόσο η χρήση του μελιού για την αντιμετώπιση τερηδόνας απαιτεί περαιτέρω μελέτες κυρίως για την αναγνώριση των υπεύθυνων μορίων που εμφανίζουν αυτή τη δράση γιατί λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα, η θεραπεία με μέλι έναντι της τερηδόνας δεν θα φέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα.

Οι βιομεμβράνες αντιμετωπίζονται πολύ δύσκολα σε μολυσμένες πληγές καθώς είναι εγγενώς ανθεκτικές σε αντιμικροβιακές θεραπείες και συχνά τα συστημικά αντιβιοτικά δεν μπορούν να φτάσουν το μέρος που διαμένουν οι μικροοργανισμοί στην πληγή ως αποτέλεσμα της αγγειακής βλάβης. Συνήθως η τοπική χρήση αντιβιοτικών για τη θεραπεία μολυσμένων πληγών δεν συνιστάται, ωστόσο σε χρόνιες πληγές μπορεί να χρησιμοποιηθεί το τοπικό αντιβιοτικό mupirocin για την αντιμετώπιση του βακτηρίου MRSA. Αυτού του είδους οι θεραπείες κρατούν συνήθως 5 με 7 ημέρες. Βακτηριακά όμως κύτταρα που έχουν παραμείνει ακόμα και μετά από τη θεραπεία μπορούν να πολλαπλασιαστούν με αποτέλεσμα την επανεμφάνιση της μόλυνσης. Το παραπάνω φαινόμενο είναι πιο πιθανό όπου είναι παρούσες οι βιομεμβράνες, καθώς αυτές οι μικροβιακές κοινότητες είναι εκ φύσεως πιο ανθεκτικές σε θεραπείες. Τα τοπικά αντισηπτικά και αντιμικροβιακά αλλά και το μέλι, αν και δεν αντικαθιστούν την χρήση συστημικών αντιβιοτικών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν παράλληλα για να επιταχύνουν την επούλωση χρόνιων πληγών και συνεπώς να οδηγήσουν στην ελάττωση κατανάλωσης συστημικών αντιβιοτικών.

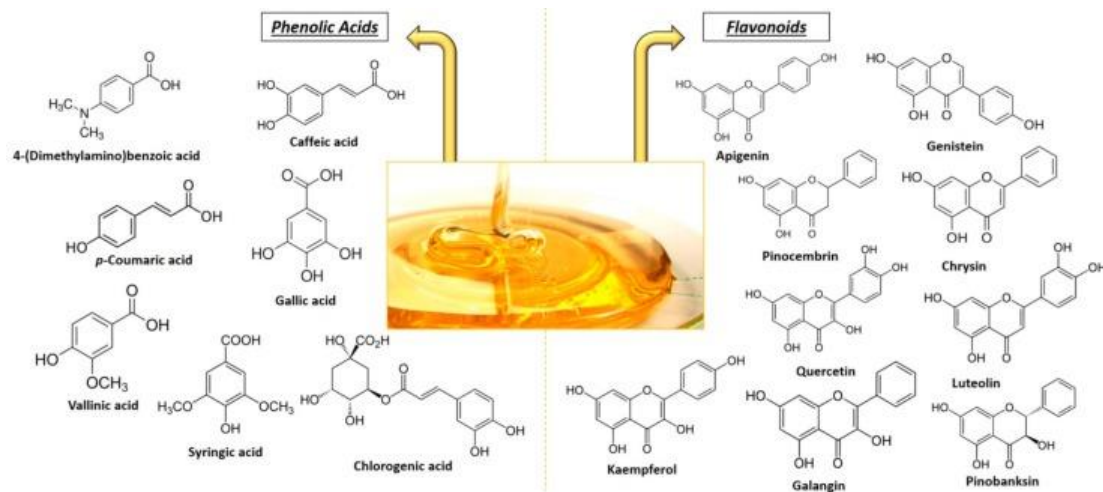
Οι χρόνιες πληγές συσχετίζονται με την ύπαρξη βακτηριακών βιομεμβρανών. Διάφορα είδη μελιών είναι αποτελεσματικά στην αναστολή της ανάπτυξης βιομεμβρανών που εμπεριέχουν παθογόνα πληγών όπως το βακτήριο *P. aeruginosa*, *S. aureus* και *Streptococcus pyogenes*. Σε κάθε περίπτωση, για την πλήρη αναστολή της ανάπτυξης βιομεμβρανών χρειάστηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις από της τιμής MIC για πλαγκτονικά βακτήρια. Ο μηχανισμός με τον οποίον είναι δυνατή η αναστολή αυτή έχει αρχίσει να γίνεται κατανοητός και φαίνεται να εξαρτάται εν μέρει από τα συστατικά της σουκρόζης και της φρουκτόζης του μελιού. Στο βακτήριο *P. aeruginosa* η αναστολή συμβαίνει με έναν τρόπο όμοιο της λεκτίνης, συνεπώς τα σάκχαρα είναι αυτά που παρέχουν το μέσο για την αναστολή του πολλαπλασιασμού των βακτηρίων. Αντιθέτως, στο βακτήριο *S. pyogenes* η διαδικασία αυτή φαίνεται να βασίζεται εν μέρει στη διαφορική έκφραση δυο κύριων επιφανειακών συγκολλητίνων που είναι γνωστό πως παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη των βιομεμβρανών. Οι δύο αυτές συγκολλητίνες (Sof και SfbI) είναι γνωστό πως διευκολύνουν

την στρεπτοκοκκική σύνδεση με την φμπρονεκτίνη, καθώς και η μείωση έκφρασής τους στην πληγή εμποδίζει την δέσμευση βακτηρίων στις πρωτεΐνες της πληγής του ξενιστή και συνεπώς αποτρέπεται η αρχική αποικιοποίηση. Το μέλι Manuka μπόρεσε αποτελεσματικά να διασπάσει και να αφαιρέσει πλήρως καθιερωμένες βιομεμβράνες *S. pyogenes* in vitro. Μια πρόσφατη μελέτη του Majtan και των συνεργατών του έδειξε πως η μεθυλγλυοξάλη (MGO) είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση βιομεμβρανών καθώς διεισδύει στη βακτηριακή βιομεμβράνη και καταστρέφει τα βακτηριακά κύτταρα που βρίσκονται σε αυτήν. Η MGO παρατηρήθηκε να διασπά και να διεισδύει σε βιομεμβράνες βακτηρίων *Proteus mirabilis* και *Enterobacter cloacae*. Στην παρούσα μελέτη δεν ερευνήθηκε εάν η μεθυλγλυοξάλη είναι αντισυγκολλητικό αλλά χαρακτηρίστηκε μόνο η αποτελεσματικότητα της ένωσης ενάντια σε καθιερωμένες βιομεμβράνες. Είναι γνωστό πως τα σάκχαρα των μελιών από μόνα τους είναι αντισυγκολλητικά σε φύση αποτρέπουν την συγκόλληση βακτηρίων σε επιφάνειες.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, για την πλήρη αναστολή των βιομεμβρανών είναι αναγκαία η χρήση υψηλής συγκέντρωσης μελιού. Ωστόσο μια νέα μελέτη με *E. coli* O157:H7 έδειξε πως αυτό δεν είναι πάντα κανόνας, καθώς χαμηλές συγκεντρώσεις με τιμή 0.5% (w/v) έδειξαν σημαντική μείωση της βιομάζας των βιομεμβρανών πάνω από 95%. Αυτή η συγκέντρωση ήταν πάνω από 10 φορές μικρότερη από την τιμή MIC του μικροοργανισμού αυτού και εκατό φορές χαμηλότερη από τις καταγεγραμμένες τιμές για άλλα βακτήρια. Είναι ωστόσο ενδιαφέρον πως η χαμηλή αυτή συγκέντρωση που σταμάτησε την ανάπτυξη της βιομεμβράνης *E. coli* O157:H7 δεν ανέστειλε την πλαγκτονική ανάπτυξη ούτε ήταν βακτηριοκτόνος, πράγμα που σημαίνει πως η αντιβιομεμβρανική ικανότητα του μελιού είναι ξεχωριστή από την βακτηριοκτόνο τρόπο δράσης του. Στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε πως η επικοινωνία μεταξύ των βακτηρίων (quorum sensing) επίσης μειώθηκε στις χαμηλές συγκεντρώσεις του μελιού. Είναι πιθανό πως η δράση που παρατηρήθηκε είναι αποτέλεσμα της διαφορικής έκφρασης κολλητίνης που ρυθμίζεται από μόρια του ρυθμιστικού συστήματος επικοινωνίας των βακτηρίων (quorum sensing). Η τρανσκριπτομική ανάλυση έδειξε πως τα γονίδια *curli* ήταν ανεσταλμένα. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν δομές της επιφάνειας που μεσολαβούν στη δέσμευση με τις πρωτεΐνες του ξενιστή και στην ενδοκύτωση από ευκαρυωτικά κύτταρα. Στο κοινό στέλεχος *E. coli* K12 ο σχηματισμός βιομεμβράνης δεν αναστάλθηκε από τόσο χαμηλή συγκέντρωση μελιού, όμως αυτός ο οργανισμός δεν παρουσιάζει τα γονίδια *curli* αλλά ούτε τον γονιδιακό τόπο της εξάλειψης εντεροκυττάρων. Λόγω των παραπάνω φαινομένων προτάθηκε πως η παρατήρηση αναστολής της ανάπτυξης της βιομεμβράνης του στελέχους O157:H7 συσχετίζεται με την έκφραση αυτής της ομάδας γονιδίων. Παρόμοια αναστολή βιομεμβρανών (αποτροπή συγκόλλησης, μη διάσπαση καθιερωμένων βιομεμβρανών) και διαφορική έκφραση γονιδίων παρατηρήθηκε μόνο για τα συστατικά σακχάρων του μελιού και όχι για την μεθυλγλυοξάλη ή το υπεροξειδίο του υδρογόνου, συμπεραίνοντας πως τον κύριο αντισυγκολλητικό ρόλο τον έχουν τα σάκχαρα του μελιού. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται η υπόθεση πως οι αντισυγκολλητικές ιδιότητες του μελιού βασίζονται στη συνδυαστική δράση μηχανικής παρεμπόδισης αλλά και διαφορικής γονιδιακής έκφρασης ως απόκριση στα διαφορετικά συστατικά του μελιού. (Maddocks S. E. , Jenkins R. E. , November 2013)

Πολυφαινόλες και φλαβονοειδή

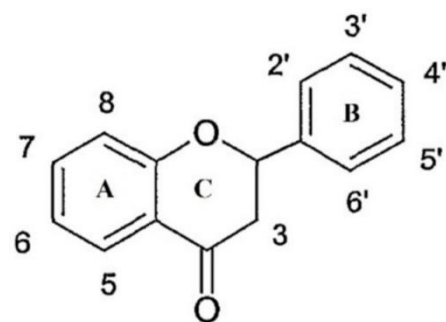
Οι πολυφαινόλες είναι μια ετερογενής ομάδα χημικών ενώσεων που μπορεί να διαχωριστεί στα φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή (φαινολικά οξέα). Όλες αυτές οι ενώσεις συχνά είναι προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών και χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλαπλών φαινολικών ομάδων με πολύπλοκες δομές. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες διαφέρουν από τους πρωτογενείς (χλωροφύλλη, αμινοξέα και απλοί υδατάνθρακες) καθώς, αν και έχουν σημαντικές οικολογικές λειτουργίες, δεν μεσολαβούν στις διαδικασίες όπως της αφομοίωσης, της αναπνοής, της μεταφοράς και της διαφοροποίησης των φυτών. Η φαινολική σύσταση του μελιού εξαρτάται κυρίως από το φυτό προέλευσης, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την ταξινόμηση και τον έλεγχο αυθεντικότητας του ιδιαίτερα στην περίπτωση πολυανθικών ποικιλιών. Οι πιο κοινές φαινολικές ενώσεις φαίνονται στην εικόνα 1.



Εικόνα 1.1 Φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή μελιού. (Maddocks S. E., Jenkins R. E., November 2013)

Αυτές οι ενώσεις έχουν αναγνωριστεί ως υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική δραστηριότητα του μελιού που συσχετίζεται κυρίως με την ικανότητα εξουδετέρωσης ελεύθερων ριζών και με τη δημιουργία πιο σταθερών και λιγότερο τοξικών ενώσεων. Οι φαινολικές ενώσεις εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες δίνοντας ένα υδρογόνο από μια υδροξυλομάδα τους. Το επίπεδο της δραστηριότητας τους συσχετίζεται με τον αριθμό των υδροξυλομάδων τους.

Τα φλαβονοειδή είναι φυσικές χημικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους και είναι κυρίως ευδιάλυτες στο νερό. Σχηματίζονται από δυο βενζοϊκούς δακτυλίους που εναλλάσσονται από μια γραμμική αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα (C6-C3-C6). Αυτή η δομή συχνά επαναδιατάσσεται σε μια μορφή τριών δακτυλίων με δεκαπέντε άτομα άνθρακα που ονομάζονται A, B και C (Εικόνα 1.2). Συνήθως αυτές οι ενώσεις έχουν δυο φαινολικές ομάδες και συχνά συσχετίζονται με σάκχαρα (γλυκοζίτες), κυρίως γλυκόζη μαζί με ξυλόζη, γαλακτόζη, ραμνόζη, αραβινόζη, ρουτινοσίδη και γλυκοραμνόζη. Όταν τα φλαβονοειδή δεν συσχετίζονται με σάκχαρα ονομάζονται αγλυκόνες. Στη συνέχεια, τα φλαβονοειδή κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με τον βαθμό οξείδωσης του ανθρακικού δακτυλίου σε φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβανονόλες, φλαβονόλες, φλαβανανόνες, ισοφλαβόνες, ανθοκυανίνες και ανθοκυανιδίνες. Τα πιο άφθονα στο μέλι είναι οι φλαβόνες, οι φλαβανόλες και οι φλαβονόλες.



Εικόνα 1.2 Φλαβονοειδή με τρεις δακτυλίους, A, B και C. (Maddocks S. E., Jenkins R. E., November 2013)

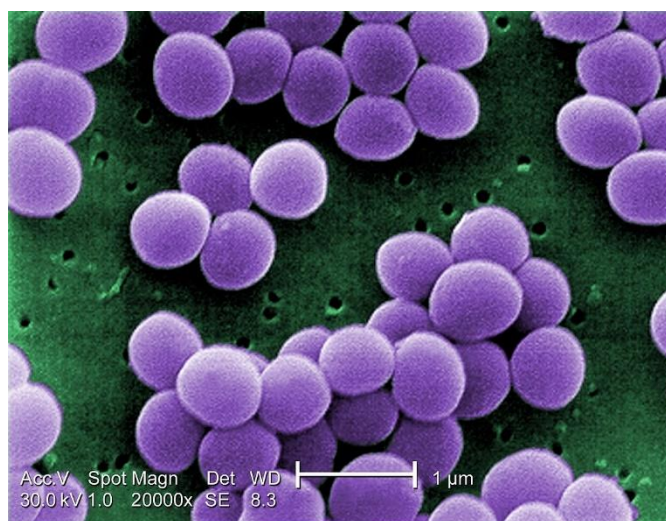
Τα φαινολικά οξέα (φαινολ-καρβοξυλικό οξύ) περιέχουν έναν φαινολικό δακτύλιο και τουλάχιστον μία λειτουργία καρβοξυλικού οξέος. Μπορούν να χωριστούν ανάλογα με τη δομή τους, για παράδειγμα σε C6-C3 (p-κουμαρικό, φερουλικό και καφεϊκό οξύ), C6-C2 (ακετοφαινόνες και φαινυλακετικά οξέα) και C6-C1 (συριγγικό, βανιλικό και γαλλικό οξύ). Συνήθως οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις προσδένονται στα δομικά συστατικά του φυτού (κυτταρίνη, λιγνίνη) αλλά και σε άλλους τύπους οργανικών ενώσεων όπως η γλυκόζη, άλλα σάκχαρα ή φλαβονοειδή.(Cianciosi D. , Battino M. et al, September 2018)

Είναι γνωστό πως τα μέλια περιέχουν πολλές και ποικίλες πολυφαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή. Η συγκέντρωση αυτών συσχετίζεται με το χρώμα του μελιού. Συγκεκριμένα, τα σκουρόχρωμα μέλια έχουν συνήθως υψηλότερη συγκέντρωση πολυφαινολών και φλαβονοειδών. Η φυτική προέλευση παίζει σημαντικό ρόλο στον τύπο και στη συγκέντρωση των πολυφαινολών και φλαβονοειδών στο μέλι και πέραν του χρώματος, η συγκέντρωση αυτών των ενώσεων συμβάλει στην αντιβακτηριακή δράση. Για παράδειγμα το μέλι Portobello και το μέλι από λεβάντα εμφανίζουν αντιβακτηριακές ιδιότητες, που είναι όμως ασθενέστερες από αυτές του μελιού Manuka. Η ασθενέστερη δράση τους ευθύνεται στην μικρότερη συγκέντρωση πολυφαινολών και φλαβονοειδών σε σχέση με το Manuka. Ομοίως μέλια από την Κούβα εμφάνισαν μεγάλο εύρος στην σύσταση φλαβονοειδών και πολυφαινολών, ωστόσο σε κάθε περίπτωση παρατηρήθηκε ισχυρότερη αντιβακτηριακή δράση στα μέλια με την υψηλότερη συγκέντρωση σε πολυφαινόλες και φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή δρουν αντιβακτηριακά μέσω ποικίλων μηχανισμών συμπεριλαμβανομένων την αναστολή της DNA γυράσης, την λειτουργία της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και του ενεργειακού μεταβολισμού.(Maddocks S. E. , Jenkins R. E. , November 2013)

Υπό μελέτη παθογόνα βακτήρια

Staphylococcus aureus

Ο *Staphylococcus aureus* είναι ένα θετικό κατά gram κοκκοειδές βακτήριο, θετικό για την δοκιμή της κοαγουλάσης (ένζυμο μετατροπής ινωδογόνου σε ινώδες), που ανήκει στο φύλο Firmicutes. Αν και στο γένος *Staphylococcus* ανήκουν 52 είδη και 28 υποείδη, ο *S. aureus* είναι από κλινικού ενδιαφέροντος το σημαντικότερο βακτήριο. Το βακτήριο αυτό βρίσκεται στην συμβιωτική μικροβιακή χλωρίδα του ρινικού βλεννογόνου στο 20-40% του γενικού πληθυσμού. Όταν η δερματική και βλεννογόνος στοιβάδα διαταράσσεται εξαιτίας χρόνιων δερματικών παθήσεων, τραυμάτων ή χειρουργικών παρεμβολών ο *S. aureus* αποκτά πρόσβαση στους υποκείμενους ιστούς ή στην κυκλοφορία του αίματος προκαλώντας μολύνσεις. Άτομα με επεμβατικά ιατρικά μηχανήματα (όπως περιφερικοί ή κεντρικοί καθετήρες) ή με κατεσταλμένο ανοσοποιητικό σύστημα είναι ιδιαίτερα ευπαθείς σε μολύνσεις από *S. aureus*. Ο ανθεκτικός σε μεθικυλίνη *S. aureus* (MRSA) πρωτοεμφανίστηκε στην Αγγλία

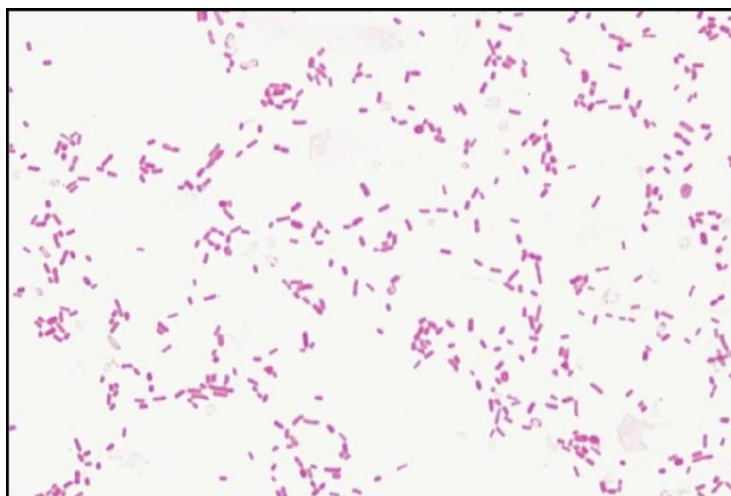


Εικόνα 1.3 Βακτήρια *S.aureus* κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.

το 1961 σύντομα μετά από την εισαγωγή της μεθικιλίνης για κλινική χρήση. Ο MRSA ευθύνεται για νοσοκομειακά ξεσπάσματα σε πολλές χώρες του κόσμου. Αρκετοί κλώνοι *S. aureus* απέκτησαν ανθεκτικότητα στην μεθικιλίνη μετά από την πρόσληψη της χρωμοσωμικής κασέτας σταφυλόκοκκου *mec* (*SCCmec*) μέσω οριζόντιας μεταφοράς. Αυτό το ευκίνητο γενετικό στοιχείο κωδικοποιεί τα γονίδια *mecA* και *mecC* που προσφέρουν ανθεκτικότητα στην μεθικιλίνη και επομένως στα περισσότερα αντιβιοτικά β λακταμίνης. Ο MRSA συχνά έχει ανθεκτικότητα σε πολλά είδη αντιβιοτικών. Ο *S. aureus* έχει την ικανότητα να αποκτά ανθεκτικότητα σε οποιοδήποτε αντιβιοτικό, γεγονός που προκαλεί εμπόδιο στην θεραπεία αυτού του παθογόνου. (Lee A. S. et al. , May 2018)

Klebsiella pneumoniae

Η *Klebsiella pneumoniae* είναι ένα κατά gram αρνητικό παθογόνο βακτήριο. Σε στερεό θρεπτικό μέσο εμφανίζει μυκοειδή φαινότυπο. Η *Klebsiella pneumoniae* είναι μέρος της οικογένειας των εντεροβακτηριοειδών που περιέχει και άλλα γνωστά παθογόνα όπως η *Escherichia coli*, το είδος *Yersinia*, το είδος *Salmonella* και το είδος *Shigella*. Η *Klebsiella pneumoniae* χαρακτηρίστηκε από τον Carl Friedlander το 1882 ως ένα βακτήριο που απομονώθηκε από τους πνεύμονες ασθενών που πέθαναν από πνευμονία. Είδη της *Klebsiella* μπορούν να βρεθούν παντού στην φύση και



Εικόνα 1.4 Χρώση κατά gram σε δείγμα ούρων με *Klebsiella pneumoniae*.

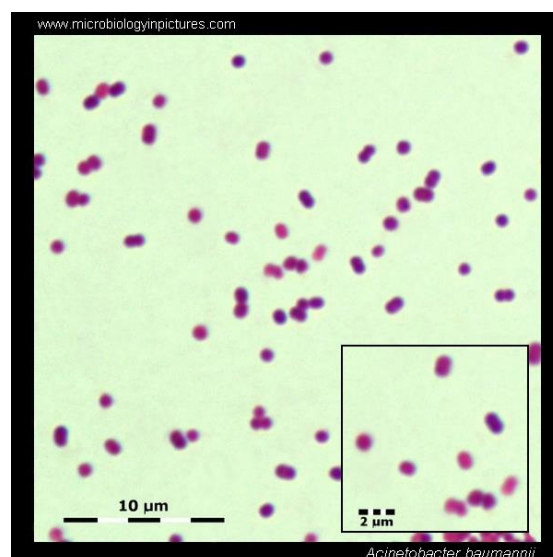
συγκεκριμένα σε φυτά, ζώα και στον άνθρωπο. Το βακτήριο αυτό αποτελεί παράγοντα διαφόρων τύπων μολύνσεων στους ανθρώπους όπως είναι η μόλυνση της αναπνευστικής οδού, η μόλυνση της ουροποιητικής οδού και η μόλυνση του κυκλοφορικού συστήματος. Συνήθως αυτές οι μολύνσεις συμβαίνουν σε ασθενείς νοσοκομείων με ανοσοκατεσταλμένο σύστημα και αντιμετωπίζονται με β λακτάμες ή άλλα αντιβιοτικά που είναι αποτελεσματικά έναντι εντεροβακτηριοειδών. (Martin R. M. , Bachman M. A. , 22 January 2018)

Acinetobacter baumannii

Το είδος *Acinetobacter* περιλαμβάνει αερόβια κατά gram αρνητικά βακτήρια με σχήμα κοκκοβακίλων που δεν κινούνται και είναι θετικά στην δοκιμή καταλάσης. Λόγο των πολλών στενά συγγενικών ειδών είναι δύσκολο να ξεχωριστεί η ταξινόμια του *Acinetobacter* μόνο με την χρήση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών και χημειοταξικών μεθόδων. Επειδή η ευαισθησία στα αντιβιοτικά και η κλινική σημασία είναι σημαντικά διαφορετική μεταξύ διαφορετικών γενωμικών ειδών, είναι σημαντική η ακριβής ταυτοποίηση για το είδος *Acinetobacter*. Ανάμεσα στο είδος *Acinetobacter*, το *Acinetobacter baumannii* είναι το κύριο που συσχετίζεται με ενδονοσοκομειακές μολύνσεις. Αυτό το βακτήριο έχει χαρακτηριστεί ως χαμηλού επιπέδου

παθογόνο, ωστόσο μπορεί να προκαλέσει δυνητικές μολύνσεις στο δέρμα, στην κυκλοφορία του αίματος, στην ουρηθική οδό και στους μαλακούς ιστούς. Πολλές έρευνες έδειξαν πως το *A. baumannii* αναπτύσσει

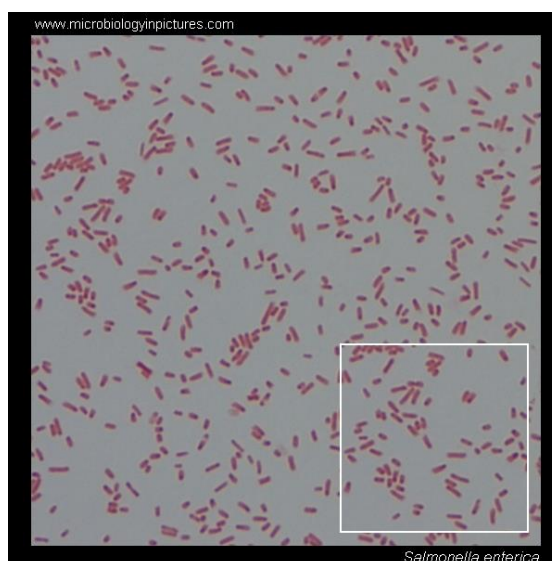
ταχύτατα ανθεκτικότητα σε αντιμικροβιακά φάρμακα και έχουν απομονωθεί στελέχη με πολλαπλή ανθεκτικότητα. Ο οργανισμός WHO δήλωσε πως το βακτήριο *A. baumannii* είναι ένα από τα πιο σοβαρά των οργανισμών ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, και είδη εντεροβακτηρίων) που επιτυχώς αντιστέκεται στις δράσεις των αντιβακτηριακών φαρμάκων. Πολλοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας του βακτηρίου είναι πλέον γνωστοί, όπως η ενζυμική καταστολή φαρμάκων, η τροποποίηση στόχων, η ύπαρξη καναλιών εκροής φαρμάκων και η μείωση διαπερατότητας. (Lee C. et al. , 13 March 2017)



Εικόνα 1.5 Φωτογραφία βακτηρίων *Acinetobacter baumannii* μετά από χρώση κατά gram, με την χαρακτηριστική μορφολογία κοκκοβάκιλου.

Salmonella typhimurium

Η *Salmonella* είναι μια από τις πιο συχνές αιτίες μολυσματικών ασθενειών εξαιτίας από τροφίμων με κυριότερη την γαστρεντερίτιδα. Σχεδόν 2500 ορότυποι έχουν καταγραφεί, η *Salmonella Typhimurium* αντιστοιχεί στον πρώτο ορότυπο που σχετίζεται με την σαλμονέλλωση παγκοσμίως. Η *S. typhimurium* είναι ένα κατά gram αρνητικό παθογόνο βακτήριο που μεταδίδεται κυρίως μέσω της κατανάλωσης ομού ή αμαγείρευτου φαγητού όπως αυγά, λαχανικά, φρούτα και πουλερικά. Η ύπαρξη του οργανισμού αυτού στο φαγητό αποτελεί σοβαρή απειλή για την δημόσια υγεία. Επίσης λιποπολυσακχαρίτες όπως οι ενδοτοξίνες αποτελούν μέρος της εξωτερικής μεμβράνης όλων των gram αρνητικών βακτηρίων όπως η *S. typhimurium*. Οι λιποπολυσακχαρίτες οδηγούν σε σηπτικό σοκ, πυρογενή αντίδραση, υπόταση, διάρροια και ανάπτυξη θρόμβων στα αιμοφόρα αγγεία. Έτσι η ανίχνευση των λιποπολυσακκάρων είναι πολύ σημαντική για την ιατρική και τροφική ασφάλεια. Για αυτόν τον λόγο ευαίσθητες και ποσοτικές μέθοδοι για την ανίχνευση *S. typhimurium* είναι αναγκαίες για την εξασφάλιση της ποιότητας του φαγητού και της ασφάλειάς του. Η ανίχνευση ρουτίνας γίνεται μέσω μεθόδων βασισμένων σε καλλιέργεια, αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και ανοσοδοκιμασιών όπως η δοκιμασία ανοσοφθορισμού. (Ansari N. et al. , 15 June 2017)



Εικόνα 1.6 Βακτήρια *Salmonella typhimurium* κάτω από μικροσκόπιο. Αρνητικά κατά gram με μορφολογία βακίλου.

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Ο σκοπός της εργασίας αυτής είναι ο προσδιορισμός της αντιβακτηριακής ικανότητας των Ελληνικών πευκόμελων διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών έναντι τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* και *Salmonella Typhimurium*. Για την εύρεση της αντιβακτηριακής ικανότητας στα 26 δείγματα πευκόμελου χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικές μέθοδοι: η μέθοδος διάχυσης σε πηγαδάκια (well diffusion assay) και η πιο ακριβέστερη μέθοδος της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης ή MIC (minimum inhibitory concentration). Στις δύο αυτές μεθόδους τα δείγματα συγκρίθηκαν με το μέλι Manuka. Στην συνέχεια για την εύρεση του μηχανισμού που ευθύνεται για την δράση αυτή του μελιού, επαναλήφθηκε για τα ισχυρότερα μέλια η δοκιμασία MIC παρουσία καταλάσης. Η δοκιμασία αυτή ανιχνεύει την ύπαρξη αντιβακτηριακής δράσης λόγω υπεροξειδίου του υδρογόνου.

2. Πειραματικό μέρος

Υλικά και μέθοδοι

Παρακάτω καταγράφονται τα υλικά και τα εργαστηριακά μηχανήματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία, καθώς και τα στελέχη των βακτηρίων και τα θρεπτικά υποστρώματα.

Υλικά

- Πιπέτες των 2-20μl, 20-200μl και 100-1000μl
- Τα αντίστοιχα Tips τους
- Eppendorf των 1,5ml
- Γυάλινα Vials
- Falcons
- Τρυβλία Petri
- Τετράγωνα τρυβλία Petri για την δοκιμή MBC
- Microplate Replicator
- Γυάλινο Beaker
- Γυάλινη πιπέτα Pasteur
- Τρίγωνο επίστρωσης καλλιέργειας
- Μικροβιολογικός κρίκος
- Πλάκες καλλιέργειας 96 θέσεων(96 Well Plate)
- Λύχνος Bunsen
- Ισοπροπανόλη
- Κυψελίδες

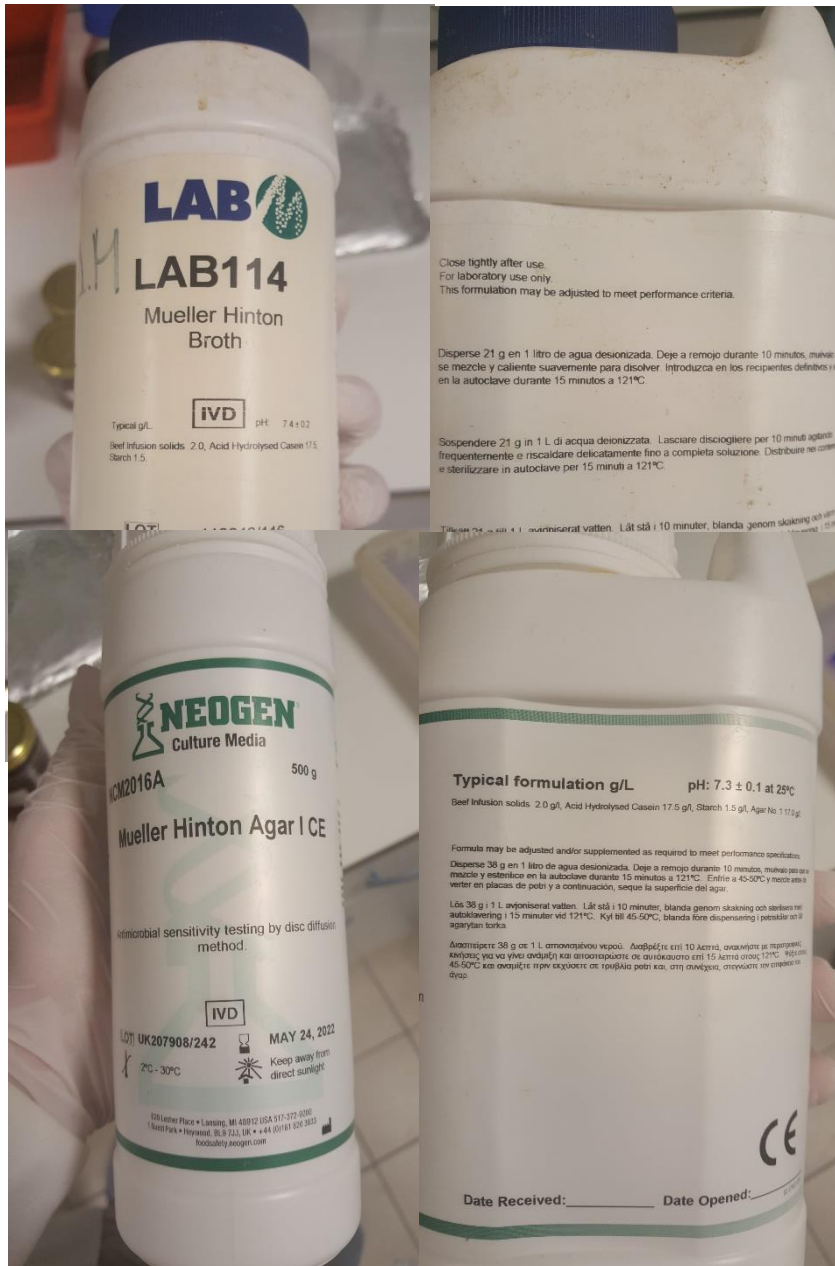
Εργαστηριακά μηχανήματα και εξοπλισμός

- Φωτόμετρο
- 96 well plate reader
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας
- Υδατόλουτρο
- Κλίβανος επώασης με ανάδευση
- Απλός κλίβανος επώασης
- Vortex

Καλλιέργειες βακτηρίων σε stock 20% γλυκόζης αποθηκευμένες στους -80°C

1. *Staphylococcus aureus*
2. *Salmonella typhimurium*
3. *Klebsiella pneumoniae*
4. *Acinetobacter baumannii*

Τα θρεπτικά που χρησιμοποιήθηκαν για την υγρή και στερεή καλλιέργεια των βακτηρίων ήταν το Muller Hinton Broth και Muller Hinton Agar αντίστοιχα της εταιρίας Lab M και Neogen. (Εικόνα 2.1, Εικόνα 2.2)



Εικόνα 2.1 Mueller Hinton Broth της εταιρίας Lab M. Beef Infusion Solids 2.0 g/L, Acid Hydrolysed Casein 17.5 g/L, Starch 1.5 g/L.

Εικόνα 2.2 Mueller Hinton Agar της εταιρίας Neogen. Beef Infusion Solids 2.0 g/L, Acid Hydrolysed Casein 17.5 g/L, Starch 1.5 g/L, Agar No 1 17.0 g/L.

Το θρεπτικό μέσο σε μορφή σκόνης αρχικά ζυγίστηκε στον ηλεκτρονικό ζυγό ακρίβειας και ύστερα διαλύθηκε σε απιονισμένο νερό στην σωστή αναλογία που αναγράφεται πάνω στην συσκευασία. Για την προετοιμασία Vial που θα χρησιμοποιούνταν για ανακαλλιέργεια της αρχικής καλλιέργειας, από το αρχικό δοχείο του θρεπτικού μετρήθηκαν και μεταφέρθηκαν 5ml θρεπτικού σε αυτά με πιπέτα. Μετά την κάλυψη του καπακιού του κάθε σκεύους (Αρχικό δοχείο, Vial) με αλουμινόχαρτο και του ελαφρού ανοίγματος τους πραγματοποιήθηκε αποστείρωση με υγρή θερμότητα με την βοήθεια χύτρας για 20' λεπτά.

Η διαδικασία προετοιμασίας στερεού θρεπτικού ακολουθεί ομοίως τα ίδια παραπάνω βήματα για την προετοιμασία του υγρού θρεπτικού μέσου. Μετά το ζύγισμα, την διάλυση σε συγκεκριμένη ποσότητα απιονισμένου νερού και τελικά την αποστείρωση, ακολούθησε ένα διάστημα αναμονής και τακτικής ανάδευσης του δοχείου. Με αυτόν τον τρόπο το άγαρ που σταδιακά κρύωνε δεν στερεοποιόταν ανομοιογενώς μέσα στο δοχείο. Όσο ήταν ακόμα ζεστό, γύρω από έναν λύχνο Bunsen τοποθετήθηκαν τα τρυβλία Petri και γεμίστηκαν με Muller Hinton άγαρ. Μετά την απουσία υδρατμών στους τοίχους του τρυβλίου και τη στερεοποίηση του άγαρ ακολούθησε το κλείσιμο των τρυβλίων με τα καπάκια τους και η αποθήκευσή τους ανάποδα στο ψυγείο.

Τα δείγματα πευκόμελου που προμηθεύτηκε το εργαστήριο, αναγράφονται στον πίνακα 1 βάσει του κωδικού αρίθμησης, της περιοχής προέλευσης και της περιόδου συλλογής.

Πίνακας 1

α/α	κωδικός	Περιοχή συλλογής	Περίοδος συλλογής 2019
1	8	Κορινθία	08
2	13	Κορινθία	08
3	20	Εύβοια	08
4	26	Εύβοια	21/08-12/09
5	30	Εύβοια	21/08-15/09
6	50	Ρόδος	25/07-01/09
7	64	Ρόδος	01/08-05/09
8	65	Εύβοια	18/09-09/10
9	74	Θάσος	16/07-12/08
10	78	Εύβοια	01/08-30/08
11	79	Εύβοια	01/09-15/10
12	82	Χανιά	17/08-10/09
13	83	Χανιά	09
14	86	Θάσος	21/07-09
15	88	Θάσος	20/07-18/08
16	90	Θάσος	11/08-15/09
17	91	Θάσος	09
18	93	Θάσος	10/08-25/09
19	95	Χαλκιδική	25/07-25/08
20	96	Θάσος	07
21	98	Χαλκιδική	02/08-10/09
22	99	Θάσος	09
23	100	Χαλκιδική	25/08-19/09
24	101	Θάσος	17/07-05/08
25	128	Ηράκλειο	21/10
26	129	Ηράκλειο	25/10

Όλα τα δείγματα συγκρίθηκαν με το μέλι Manuka (Θετικό control) της εταιρίας steens (UMF 24⁺, MGO 1122 = 1122mg/kg μεθυλγλυοξάλη) του οποίου η αντιβακτηριακή ικανότητα είναι μελετημένη εκτενώς (Εικόνα 2.3), αλλά και με τεχνητό μέλι που είχε τον ρόλο του αρνητικού control. Το μέλι αυτό φτιάχτηκε στο εργαστήριο κάτω από στείρες συνθήκες, συγκεκριμένα ζυγίστηκαν στον ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας 3,0g σουκρόζης, 15g μαλτόζης, 80,1g φρουκτόζης και 67g γλυκόζης που στην συνέχεια τοποθετήθηκαν μαζί με 34ml απιονισμένο νερό μέσα σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 56°C μέχρι να διαλυθούν τα συστατικά. Σκοπός της χρήσης του είναι η επιβεβαίωση πως την αντιβακτηριακή ικανότητα παρουσιάζουν συστατικά του μελιού πέρα των σάκχαρα.



Εικόνα 2.3 Μέλι Manuka της εταιρίας Steens, UMF 24⁺.

Μέθοδοι

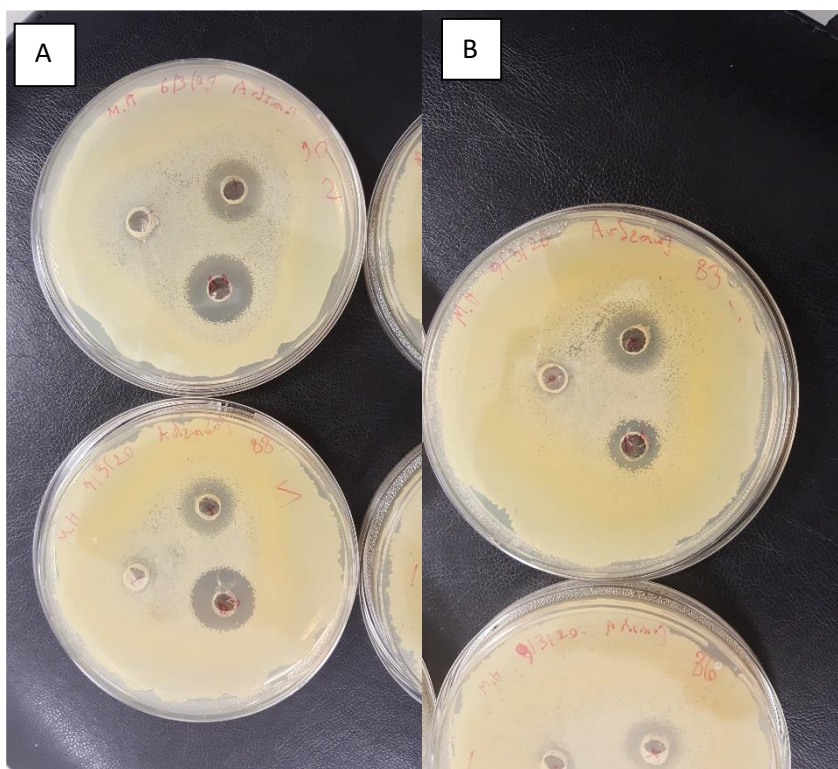
Δυο *in vitro* μέθοδοι εφαρμόστηκαν για να μετρηθεί η αντιβακτηριακή ικανότητα των δειγμάτων πευκόμελου. Η μέθοδος διάχυσης σε πηγαδάκια (Well diffusion assay) και η μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης συγκέντρωσης που προκαλεί την πλήρη αναστολή της ανάπτυξης των βακτηρίων, minimum inhibitory concentration (MIC). Στα μέλια με την ισχυρότερη αντιβακτηριακή ικανότητα επαναλήφθηκε η μέθοδος MIC παρουσία καταλάσης. Με αυτόν τον τρόπο επιβεβαιώνεται η ύπαρξη υπεροξειδίου του υδρογόνου που ευθύνεται για την αντιβακτηριακή δράση.

Διαδικασία

Well diffusion assay

Με την χρήση της πιπέτας των 1000ml και κομμένων tip έγινε η λήψη ποσότητας (750μl) των δειγμάτων του πευκόμελου, του τεχνητού μελιού και του Manuka και τοποθέτηση τους σε ξεχωριστά Eppendorf των 1.5ml. Στην συνέχεια προστέθηκε στα Eppendorf η ίδια ακριβώς ποσότητα υγρού θρεπτικού ώστε να προκύψει αραιώση 50% v/v. Για να ομογενοποιηθούν τα δείγματα αναδεύθηκαν με Vortex και ακολούθησε έντονη ανακίνηση τους. Με την γυάλινη πιπέτα Pasteur ανοίχτηκαν πηγαδάκια στο άγαρ των τρυβλίων διαμέτρου 6 χιλιοστών. Σε κάθε τρυβλίο ανοίχτηκαν τρία πηγαδάκια σε ίση απόσταση μεταξύ τους, ένα για το δείγμα του πευκόμελου, ένα για το μέλι Manuka που αποτελεί το θετικό control και ένα για το τεχνητό μέλι (αρνητικό control). Η ποσότητα του μίγματος που προστέθηκε σε κάθε πηγαδάκι από τα Eppendorf ήταν περίπου 100μl αναλόγως του πάχους του άγαρ στο τρυβλίο. Μετά το γέμισμα των πηγαδιών ακολούθησε αναμονή μισής ώρας για να την επιτυχή διάχυσης των δειγμάτων στο άγαρ. Κατά την διάρκεια αυτή των 30 λεπτών, μεταφέρθηκε μικρή ποσότητα καλλιέργειας του επιθυμητού βακτηρίου, που προηγουμένως επωαζόταν σε κλίβανο ρυθμισμένο στους 37°C για 16 ώρες, σε ένα Vial με 5ml θρεπτικό Muller-Hinton. Μετά από ελαφριά ανακίνηση, τοποθετήθηκε 1ml της αραιής καλλιέργειας και 1ml θρεπτικού σε δυο πλαστικές κυψελίδες. Η κυψελίδα με το θρεπτικό έχει τον ρόλο του τυφλού για τον μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου. Το φωτόμετρο

ρυθμίστηκε στα 600nm και στοχεύθηκε μια απορρόφηση ίση με 0.132A για την αραιή καλλιέργεια. Η επίτευξη της τιμής έγινε με συνεχείς μετρήσεις στο φωτόμετρο μετά από περαιτέρω αραιώσεις ή με προσθήκη καλλιέργειας στην αραιωμένη καλλιέργεια. Η τιμή αυτή της απορρόφησης(0.132A) ισούται με 0.5 McFarland, που είναι αριθμός που περιγράφει τον αναμενόμενο αριθμό βακτηρίων στο διάλυμα που ισούται με 1.5×10^8 CFU. Αυτή η διαδικασία επιτρέπει την επαναληψιμότητα των πειραμάτων καθώς σε κάθε τρυβλίο επιστρώνεται ίσως αριθμός βακτηρίων. Μετά την επίτευξη της επιθυμητής απορρόφησης, αναλόγως το βακτήριο που επιθυμήσαμε να επιστρώσουμε στα τρυβλία, ετοιμάστηκαν Errendorf με διαφορετική αναλογία αραιής καλλιέργειας(0.132A) και θρεπτικού. Συγκεκριμένα η αναλογία για το βακτήριο *S. aureus* ήταν ίση με 30μl θρεπτικό και 5μl αραιής καλλιέργειας. Η ποσότητα αυτή των 35μl είναι αυτή που επιστρώθηκε στο τρυβλίο. Καθώς μετά από δοκιμές η αναλογία αυτή οδηγούσε σε πολύ πυκνό στρώμα βακτηρίων στα τρυβλία, η αναλογία αυτή προσαρμόστηκε στα 33μl και 2μl για τα άλλα βακτήρια(*S. typhimurium*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*). Για την επίστρωση των τρυβλίων με την καλλιέργεια τοποθετήθηκε στην μέση του τρυβλίου η ποσότητα των 35μl από τα Errendorf που ετοιμάστηκαν. Στην συνέχεια αποστειρώθηκε το μεταλλικού τριγώνου επίστρωσης με εμποτισμό σε αλκοόλη που βρισκόταν μέσα σε Beaker και τελικά την τοποθέτησή του πάνω από την λύχνο Bunsen. Σιγουρευτήκαμε πως το τρίγωνο δεν ήταν πλέον ζεστό ακουμπώντας το ελαφρά πάνω στο άγαρ στην άκρη του τρυβλίου. Με κυκλικές κινήσεις του τριγώνου και ταυτόχρονη περιστροφή του τρυβλίου απλώθηκε η ποσότητα καλλιέργειας που είχε τοποθετηθεί στο άγαρ. Μετά την επώαση του τρυβλίου σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την απουσία υγρού πάνω στο άγαρ, τοποθετήθηκαν ανάποδα τα τρυβλία σε απλό κλίβανο επώασης ρυθμισμένο στους 37°C για 14-16 ώρες. Οι ζώνες αναστολής που περιμέναμε να παρατηρηθούν μετρήθηκαν σε χιλιοστά με χάρακα. Για κάθε δείγμα έγιναν τρεις επαναλήψεις.

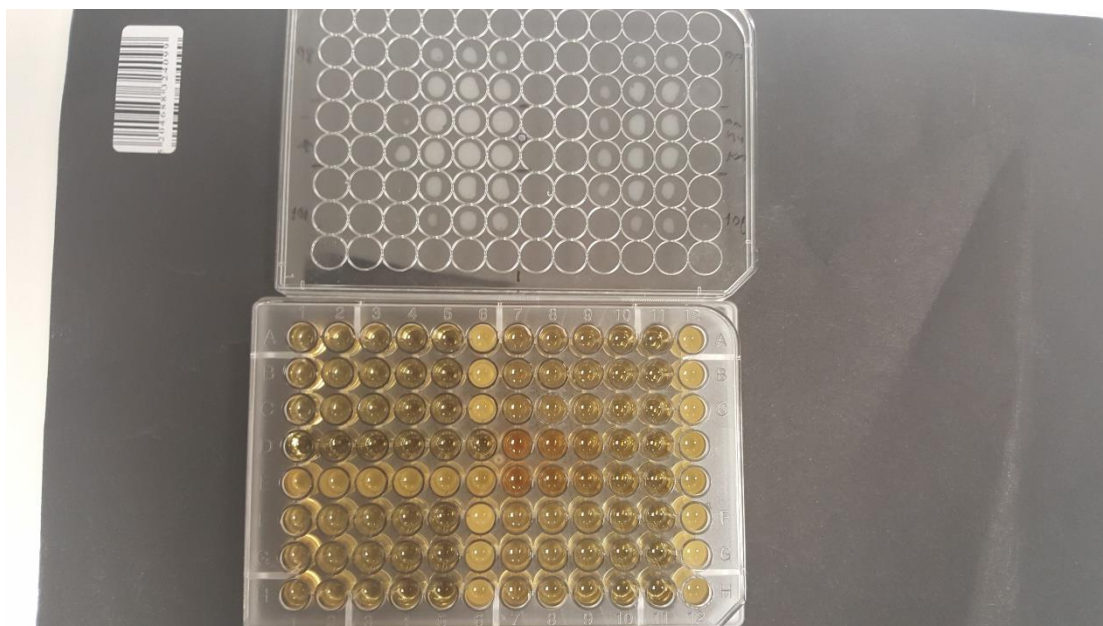


Εικόνα 2.4 Παραδείγματα αποτελεσμάτων δοκιμασίας Well-Diffusion Assay στο βακτήριο *S. aureus*. Α) Μεγαλύτερη ζώνη αναστολής δειγμάτων 90 και 88(Δ) σε σύγκριση με το θετικού control (+) μελιού Manuka. Το αρνητικό control (-) δεν εμφανίζει ζώνη αναστολής. Β) Μεγαλύτερη ζώνη αναστολής του θετικού control (+) σε σύγκριση με το δείγμα 83. Το αρνητικό control (-) δεν εμφανίζει ζώνη αναστολής.

Παρατηρήθηκε πως στα βακτήρια *S.typhimurium* αλλά και *K. pneumoniae* το αραιωμένο κατά 50% μέλι δεν εμφάνισε μετρήσιμες ζώνες. Μικρότερες αραιώσεις του μελιού εμφάνισαν μεγαλύτερες αλλά αδύνατο για μέτρηση ζώνες. Οπότε τα πηγαδάκια γεμίστηκαν με αναραιωτο μέλι. Το βακτήριο *A. baumannii* εμφάνισε ζώνες σε όλες τις διαφορετικές αραιώσεις έτσι επιλέχθηκε η αραιώση 50% για να είναι συγκρίσιμη με τον *S. aureus*.

Διαδικασία MIC

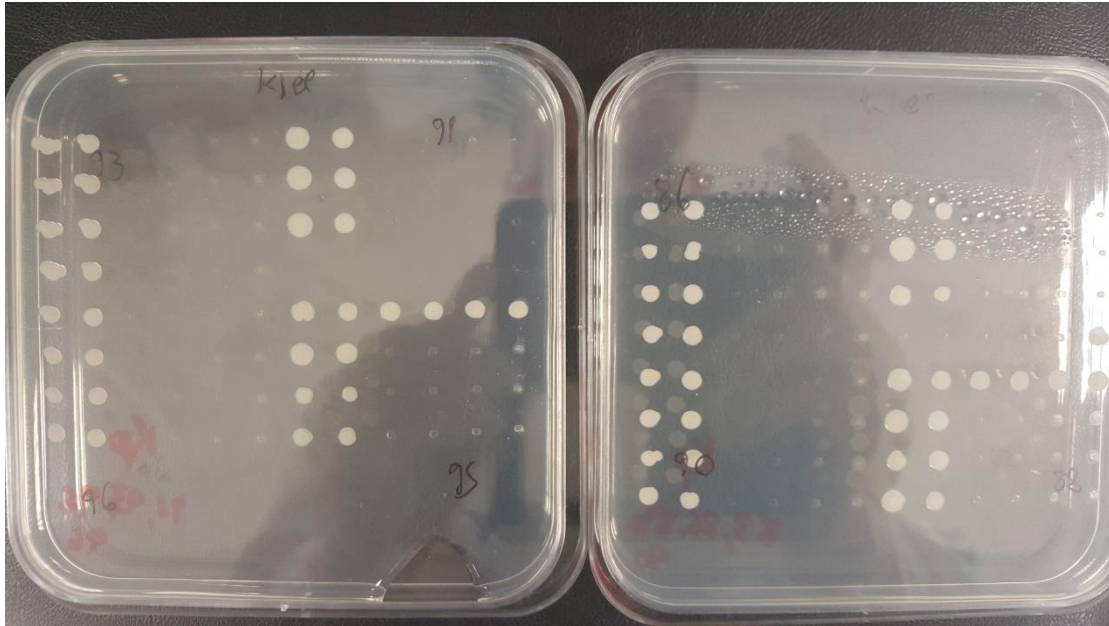
Κάτω από έναν λύχνο Bunsen ετοιμάστηκε μια σειρά από αποστειρωμένα Eppendorf. Για την επίτευξη διαδοχικών αραιώσεων του δείγματος αρχικά με πιπέτα των 1000μl με κομμένο tip μετρήθηκαν 750μl δείγματος μελιού και άλλα 750μl θρεπτικού Muller Hinton πετυχαίνοντας την πρώτη αραιώση 50% του δείγματος. Μετά το δείγμα ομοιογενοποιήθηκε με την βοήθεια Vortex και γεμίστηκαν άλλα 5 Eppendorf με 750μl θρεπτικό. Μετρήθηκαν 750μl από το Eppendorf με το κατά 50% αραιωμένο μέλι και ανακατεύθηκε η ποσότητα που μετρήθηκε με το περιεχόμενο του δεύτερου Eppendorf. Η διαδικασία αυτή συνεχίστηκε μέχρι το τελευταίο Eppendorf. Ως αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας πήραμε 6 Eppendorf με τις εξής αραιώσεις του δείγματος: 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125% και 1.56%. Καθώς το βακτήριο *S. aureus* αποδείχθηκε πολύ ευαίσθητο στα δείγματα πραγματοποιήθηκε μια επιπλέον αραιώση 0.78%. Σε μια πλάκα καλλιέργειας 96 θέσεων γεμίστηκαν τα πηγαδάκια με 190μl των δειγμάτων. Σε μία πλάκα κάθε δείγμα έχει τρεις επαναλήψεις καθώς και δυο επαναλήψεις του μελιού Manuka. Τέλος δυο σειρές από 6 πηγαδάκια λειτούργησαν ως θετικό control(Θρεπτικό Muller Hinton και καλλιέργεια βακτηρίων) και αρνητικό control(Μόνο Θρεπτικό Muller Hinton)(Εικόνα 2.5). Με αυτόν τον τρόπο μπορέσαμε να αναγνωρίσουμε πιθανό λάθος κατά τον χειρισμό του ερευνητή ή κάποια πιθανή επιμόλυνση του θρεπτικού στην περίπτωση ανάπτυξης βακτηρίων στον αρνητικό μάρτυρα. Με όμοιο τρόπο όπως περιγράφηκε στην διαδικασία Well diffusion assay, αραιώθηκε και μετρήθηκε στο φωτόμετρο η απορρόφηση της αραιωμένης καλλιέργειας που φτιάχτηκε από την αρχική στοχεύοντας σε μια απορρόφηση ίση με 0.132A. Από την αραιωμένη καλλιέργεια με την επιθυμητή απορρόφηση πήραμε 100μl που προστέθηκαν σε Eppendorf που περιέχει 900μl θρεπτικό. Μετά από μία μικρή ανακίνηση προστέθηκαν στα πηγαδάκια που είχαν γεμισθεί προηγουμένως, 10μl από το περιεχόμενο του Eppendorf με την καλλιέργεια που φτιάχτηκε. Η πλάκα τοποθετήθηκε στο 96 well plate reader και αποθηκεύτηκαν τα αποτελέσματα ως χρόνος T=0. Η πλάκα στην συνέχεια επώασθη για 24 ώρες σε κλίβανο επώασης ρυθμισμένο στους 37°C. Με το πέρας του χρονικού ορίου η πλάκα ξανά τοποθετήθηκε στο Plate reader και τα αποτελέσματα αποθηκεύτηκαν ως χρόνος T=24. Αφαιρώντας τις τιμές του χρόνου T24 από του T0 μπορεί να βρεθεί η ελάχιστη συγκέντρωση όπου η ανάπτυξη του βακτηρίου αναστέλλεται από τα δείγματα.



Εικόνα 2.5 Παράδειγμα αποτελεσμάτων της δοκιμασίας MIC για τα δείγματα 98, 99, 100 και 101 στο βακτήριο *Acinetobacter baumannii*. Έγιναν τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα, αριστερά κάτω από τις τρεις επαναλήψεις του δείγματος 98 βρίσκεται το αρνητικό control (μια σειρά από 6 πηγαδάκια μόνο με θρεπτικό) και αμέσως από κάτω του το θετικό control (πηγαδάκια με θρεπτικό και βακτήρια. Δεξιά από τα control βρίσκονται οι δυο επαναλήψεις για το μέλι Manuka. Καθώς μόνο στα τελευταία πηγαδάκια υπάρχει ανάπτυξη (1.56% v/v) σε όλα τα δείγματα η τιμή MIC ισούται με 3.125% v/v.

Διαδικασία δοκιμής MBC.

Μετά την μέτρηση και την λήψη των αποτελεσμάτων από τις πλάκες για την δοκιμασία MIC ακολουθεί η μέθοδος MBC. Η διαδικασία είχε ως εξής, το replicator αποστειρώθηκε πάνω από την λύχνο Bunsen. Μόλις οι ακίδες κρύωσαν, το replicator τοποθετήθηκε πάνω από την πλάκα με τέτοιο τρόπο ώστε κάθε μια από τις ακίδες να εμβαπτιστεί σε ένα από τα πηγαδάκια της πλάκας που της αντιστοιχεί. Στην συνέχεια επίσης κάτω από τον λύχνο ανοίχθηκε ένα τετράγωνο τρυβλίο με άγαρ Muller-Hinton και τοποθετήθηκε πάνω του το replicator πάνω στο οποίο ασκήθηκε ελαφριά πίεση χωρίς όμως να τρυπηθεί η στρώση του άγαρ. Το replicator στην συνέχεια τοποθετήθηκε σε αλκοόλη και επαναλήφθηκε η διαδικασία αποστείρωσής του. Τα τρυβλία στην συνέχεια επώαστηκαν για 14-16 ώρες ανάποδα στον κλίβανο επώασης που ήταν ρυθμισμένος στους 37°C. Η διαδικασία αυτή έχει σκοπό να ταυτοποιήσει αν η συγκέντρωση που προκαλεί την πλήρη αναστολή του βακτηρίου στο πηγαδάκι είναι και η ίδια που προκαλεί τον θάνατο του βακτηρίου. Αν δεν υπάρχει ανάπτυξη στο άγαρ στην θέση που ήταν το πηγαδάκι με την τιμή MIC στην πλάκα τότε σημαίνει πως η συγκέντρωση που οδηγεί στην βακτηριοστατική δράση αντιστοιχεί και στην βακτηριοκτόνο. Στην περίπτωση που η βακτηριοκτόνος δράση δεν ταυτίζεται με την βακτηριοστατική, περιμένουμε ανάπτυξη στο τρυβλίο στις τιμές ίσες με το MIC η μεγαλύτερες, καθώς τα αδρανοποιημένα βακτήρια παρουσία πλέον ευνοϊκών συνθηκών μπορούν να αναπτυχθούν και να δημιουργήσουν αποικίες.



Εικόνα 2.6 Παράδειγμα αποτελεσμάτων της μεθόδου MBC για 8 δείγματα (83, 86, 88, 90, 91, 93, 95, 96) στο βακτήριο *Klebsiella pneumoniae*. Αποικίες βακτηρίων αναπτύχθηκαν στις συγκεντρώσεις 1.56% v/v και 3.125% v/v άρα η τιμή MBC ισούται με 6.25% v/v. Οι έξι οριζόντιες αποικίες ανήκουν στο θετικό control (μόνο καλλιέργεια βακτηρίου) και αμέσως από επάνω υπάρχει έλλειψη αποικιών που αντιστοιχεί στο αρνητικό control (μόνο θρεπτικό). Το μέλι Μανuka βρίσκεται ανάμεσα στις τρεις επαναλήψεις τον δυο μελιών, στην αριστερή πλευρά του τρυβλίου (επίσης τιμή MBC ίση με 6.25% v/v).

Δοκιμασία MIC παρουσία καταλάσης

Η καταλάση αποθηκεύεται στην κατάψυξη. Μετά από το σταδιακό της ξεπάγομα, παράλληλα ετοιμάζουμε 50% αραιώσεις των επιθυμητών μελιών που παρουσίασαν σημαντική αντιβακτηριακή ικανότητα (χαμηλές τιμές MIC). Με την πιπέτα 20-200μl μετράμε 30μl από την καταλάση και την προσθέτουμε στο Eppendorf του δείγματος έτσι η τελική συγκέντρωση καταλάσης ισούται με 600 U/ml. Η ανακίνηση πρέπει να είναι προσεκτική για να μην καταστραφεί το ένζυμο. Τα Eppendorf τοποθετούνται στον κλίβανο με τον μηχανισμό ανακίνησης για 14-16 ώρες. Η διαδικασία που ακολουθεί είναι η ίδια που περιγράφηκε παραπάνω για την διαδικασία MIC. Αναμένουμε να δούμε αύξηση του MIC, ένδειξη παρουσίας υπεροξειδίου του υδρογόνου στο δείγμα που λόγω της καταλάσης μέσω αντίδρασης παράγεται νερό.

3.Αποτελέσματα

Αποτελέσματα μεθόδου διάχυσης σε πηγαδάκια (Well diffusion assay)

Μετά την επώαση των τρυβλίων για 14-16 ώρες, προκύπτει μια στρώση βακτηρίων πάνω στο άγαρ. Ωστόσο γύρω από τα πηγαδάκια περιμένουμε καθαρές ζώνες διαφορετικού μεγέθους σε αυτά του δείγματος και του μελιού Μανuka. Όπως αναφέρθηκε στην πειραματική διαδικασία, οι ζώνες μετρήθηκαν με βοήθεια χάρακα σε χιλιοστά. Παρακάτω αναγράφονται τα αποτελέσματα της διαδικασίας στα τέσσερα βακτήρια, μετά από την εύρεση του μέσου όρου και της τυπικής απόκλισης των τριών επαναλήψεων του κάθε δείγματος σε μορφή πινάκων.

Αποτελέσματα Well diffusion για το βακτήριο *Staphylococcus aureus*.

Πίνακας 2

α/α	κωδικός	Μανuka (mm)	Δείγμα (mm)	Τεχνητό Μέλι
1	8	16± 1 mm	16± 1 mm	0 mm
2	13	16± 1 mm	18± 1 mm	0 mm
3	20	15± 1 mm	16± 1 mm	0 mm
4	26	15± 0 mm	15± 1 mm	0 mm
5	30	14± 0 mm	13± 1 mm	0 mm
6	50	15± 1 mm	12± 1 mm	0 mm
7	64	16± 1 mm	16± 1 mm	0 mm
8	65	14± 1 mm	15± 1 mm	0 mm
9	74	14± 0 mm	16± 1 mm	0 mm
10	78	14± 1 mm	15± 1 mm	0 mm
11	79	13± 1 mm	14± 0 mm	0 mm
12	82	14± 1 mm	13± 1 mm	0 mm
13	83	14± 1 mm	12± 0 mm	0 mm
14	86	13± 1 mm	14± 0 mm	0 mm
15	88	14± 0 mm	16± 1 mm	0 mm
16	90	14± 0 mm	17± 0 mm	0 mm
17	91	13± 0 mm	13± 1 mm	0 mm
18	93	14± 1 mm	15± 0 mm	0 mm
19	95	15± 0 mm	17± 1 mm	0 mm
20	96	15± 1 mm	16± 0 mm	0 mm
21	98	13± 3 mm	15± 2 mm	0 mm
22	99	15± 0 mm	15± 1 mm	0 mm
23	100	14± 1 mm	16± 1 mm	0 mm
24	101	14± 2 mm	14± 2 mm	0 mm
25	128	17± 1 mm	16± 1 mm	0 mm
26	129	15± 1 mm	15± 1 mm	0 mm

Από όλα τα δείγματα πευκόμελου επτά εμφάνισαν ισχυρότερη αντιβακτηριακή δράση σε σχέση με το μέλι Μανuka (ζώνες μεγαλύτερες κατά τουλάχιστον 2 χιλιοστά). Από αυτά τα επτά δείγματα (13,74, 88, 90, 95, 98, 100), το δείγμα 90 και 95 εμφάνισαν την ισχυρότερη δράση. Τα δείγματα 50 και 83 εμφάνισαν μικρότερη δραστηριότητα από το θετικό control (ζώνες μικρότερες κατά τουλάχιστον 2 χιλιοστά), όλα τα υπόλοιπα δείγματα ήταν ισάξια με το μέλι Μανuka (ζώνες ίσες ή μεγαλύτερες ή μικρότερες κατά 1 χιλιοστό).

Αποτελέσματα Well diffusion για το βακτήριο *Salmonella typhimurium*.

Πίνακας 3

α/α	κωδικός	Μανuka (mm)	Δείγμα (mm)	Τεχνητό Μέλι
1	8	13± 1 mm	13± 0 mm	0 mm
2	13	14± 0 mm	13± 1 mm	0 mm
3	20	13± 1 mm	14± 1 mm	0 mm
4	26	13± 2 mm	13± 0 mm	0 mm
5	30	13± 2 mm	13± 2 mm	0 mm
6	50	13± 0 mm	12± 1 mm	0 mm
7	64	14± 0 mm	15± 1 mm	0 mm
8	65	14± 1 mm	14± 1 mm	0 mm
9	74	14± 1 mm	15± 0 mm	0 mm
10	78	16± 2 mm	14± 2 mm	0 mm
11	79	14± 2 mm	14± 1 mm	0 mm
12	82	13± 1 mm	12± 2 mm	0 mm
13	83	14± 1 mm	12± 2 mm	0 mm
14	86	14± 0 mm	13± 2 mm	0 mm
15	88	14± 1 mm	14± 1 mm	0 mm
16	90	15± 2 mm	15± 1 mm	0 mm
17	91	13± 1 mm	14± 1 mm	0 mm
18	93	14± 1 mm	16± 0 mm	0 mm
19	95	14± 0 mm	15± 1 mm	0 mm
20	96	14± 1 mm	14± 1 mm	0 mm
21	98	14± 1 mm	14± 1 mm	0 mm
22	99	13± 2 mm	15± 2 mm	0 mm
23	100	14± 1 mm	14± 1 mm	0 mm
24	101	14± 1 mm	13± 1 mm	0 mm
25	128	17± 1 mm	17± 2 mm	0 mm
26	129	18± 1 mm	16± 1 mm	0 mm

Πρέπει να γίνει υπενθύμιση πως στις παρούσες δοκιμές τα δείγματα των μελιών ήταν αναραίωτα όπως αναφέρθηκε προηγουμένως στην διαδικασία Well diffusion assay. Τα δείγματα 93 και 99 εμφάνισαν ισχυρότερη αντιβακτηριακή δράση σε σχέση με το μέλι Μανuka, ενώ το ίδιο ήταν ισχυρότερο απέναντι από τα δείγματα 83 και 129. (διαφορά ζωνών τουλάχιστον 2 χιλιοστών). Όλα τα υπόλοιπα δείγματα θεωρήθηκαν ισάξια του Μανuka. (ζώνες ίσες ή μεγαλύτερες ή μικρότερες κατά 1 χιλιοστό)

Αποτελέσματα Well diffusion για το βακτήριο *Klebsiella pneumoniae*.

Πίνακας 4

α/α	κωδικός	Μανuka(mm)	Δείγμα (mm)	Τεχνητό Μέλι
1	8	15± 1 mm	14± 1 mm	0 mm
2	13	16± 0 mm	13± 1 mm	0 mm
3	20	16± 0 mm	14± 2 mm	0 mm
4	26	16± 3 mm	14± 2 mm	0 mm
5	30	15± 0 mm	15± 0 mm	0 mm
6	50	16± 1 mm	13± 1 mm	0 mm
7	64	15± 0 mm	13± 1 mm	0 mm
8	65	13± 1 mm	14± 1 mm	0 mm
9	74	14± 1 mm	14± 1 mm	0 mm
10	78	12± 1 mm	12± 1 mm	0 mm
11	79	15± 1 mm	16± 1 mm	0 mm
12	82	15± 1 mm	14± 1 mm	0 mm
13	83	15± 1 mm	15± 0 mm	0 mm
14	86	15± 2 mm	15± 2 mm	0 mm
15	88	17± 0 mm	17± 0 mm	0 mm
16	90	15± 1 mm	15± 2 mm	0 mm
17	91	15± 0 mm	15± 0 mm	0 mm
18	93	16± 0 mm	16± 1 mm	0 mm
19	95	16± 1 mm	18± 0 mm	0 mm
20	96	16± 0 mm	17± 0 mm	0 mm
21	98	16± 1 mm	16± 2 mm	0 mm
22	99	16± 1 mm	15± 1 mm	0 mm
23	100	16± 1 mm	18± 1 mm	0 mm
24	101	17± 1 mm	16± 2 mm	0 mm
25	128	17± 0 mm	17± 1 mm	0 mm
26	129	18± 2	17± 1 mm	0 mm

Ομοίως με το βακτήριο *Salmonella typhimurium*, τα δείγματα μελιών χρησιμοποιήθηκαν αναραιγμένα στις δοκιμές. Τα δείγματα 95 και 100 εμφάνισαν ισχυρότερη αντιβακτηριακή δράση από το μέλι Μανuka, το ίδιο υπερίσχυσε στην δραστικότητα απέναντι από τα δείγματα 13, 20, 26, 50, 64. (ζώνες μεγαλύτερες τουλάχιστον κατά 2 χιλιοστά). Όλα τα υπόλοιπα δείγματα ήταν ισάξια με το μέλι Μανuka (ζώνες ίσες ή μεγαλύτερες ή μικρότερες κατά 1 χιλιοστό).

Αποτελέσματα Well diffusion για το βακτήριο *Acinetobacter baumannii*.

Πίνακας 5

α/α	κωδικός	Μανουκα (mm)	Δείγμα (mm)	Τεχνητό Μέλι
1	8	13± 1 mm	10± 1 mm	0 mm
2	13	13± 2 mm	11± 1 mm	0 mm
3	20	16± 4 mm	14± 1 mm	0 mm
4	26	11± 1 mm	10± 1 mm	0 mm
5	30	13± 0 mm	10± 0 mm	0 mm
6	50	13± 0 mm	10± 0 mm	0 mm
7	64	12± 2 mm	12± 2 mm	0 mm
8	65	15± 1 mm	13± 2 mm	0 mm
9	74	13± 1 mm	14± 1 mm	0 mm
10	78	13± 0 mm	13± 0 mm	0 mm
11	79	14± 1 mm	13± 2 mm	0 mm
12	82	15± 1 mm	14± 1 mm	0 mm
13	83	15± 1 mm	14± 2 mm	0 mm
14	86	11± 1 mm	10± 1 mm	0 mm
15	88	10± 0 mm	10± 1 mm	0 mm
16	90	11± 2 mm	11± 1 mm	0 mm
17	91	9± 1 mm	7± 1 mm	0 mm
18	93	10± 1 mm	11± 1 mm	0 mm
19	95	9± 1 mm	9± 2 mm	0 mm
20	96	10± 1 mm	9± 1 mm	0 mm
21	98	12± 1 mm	11± 0 mm	0 mm
22	99	11± 1 mm	10± 1 mm	0 mm
23	100	10± 1 mm	9± 1 mm	0 mm
24	101	11± 1 mm	9± 1 mm	0 mm
25	128	11± 1 mm	9± 2 mm	0 mm
26	129	12± 1 mm	10± 1 mm	0 mm

Τα δείγματα μελιών ήταν αραιωμένα κατά 50% όπως και στις δοκιμές με το βακτήριο *Staphylococcus aureus*. Το μέλι Μανουκα φάνηκε ισχυρότερο απέναντι στα δείγματα 8, 13, 20, 30, 50, 65 και 91(ζώνες μεγαλύτερες τουλάχιστον κατά 2 χιλιοστά). Όλα τα υπόλοιπα δείγματα ήταν ισάξια με το θετικό control, μέλι Μανουκα(ζώνες ίσες ή μεγαλύτερες ή μικρότερες κατά 1 χιλιοστό).

Αποτελέσματα δοκιμής MIC

Μετά την κατεργασία των αποτελεσμάτων που αντλήθηκαν από την χρήση του Plate reader, δηλαδή της αφαίρεσης των αποτελεσμάτων του χρόνου μηδέν(T0) από αυτά των 24 ωρών(T24) προέκυψαν οι τιμές MIC που καταγράφηκαν στους παρακάτω πίνακες. Μαζί τους καταγράφηκαν και τα αποτελέσματα της διαδικασίας MBC.

Αποτελέσματα MIC για το βακτήριο *Staphylococcus aureus*.

Πίνακας 6

α/α	κωδικός	MIC Δείγματος	MIC Manuka	MBC
1	8	1.56% v/v	1.56% v/v	1.56% v/v
2	13	1.56% v/v	1.56% v/v	1.56% v/v
3	20	1.56% v/v	1.56% v/v	1.56% v/v
4	26	3.125% v/v	3.125% v/v	3.125% v/v
5	30	3.125% v/v	1.56% v/v	3.125% v/v
6	50	6.25% v/v	1.56% v/v	6.25% v/v
7	64	3.125% v/v	1.56% v/v	1.56% v/v
8	65	1.56% v/v	1.56% v/v	1.56% v/v
9	74	0.78% v/v	1.56% v/v	N/A
10	78	3.125% v/v	1.56% v/v	N/A
11	79	1.56% v/v	1.56% v/v	N/A
12	82	6.25% v/v	1.56% v/v	N/A
13	83	1.56% v/v	1.56% v/v	N/A
14	86	0.78% v/v	1.56% v/v	N/A
15	88	0.78% v/v	1.56% v/v	N/A
16	90	0.78% v/v	1.56% v/v	N/A
17	91	3.125% v/v	1.56% v/v	N/A
18	93	1.56% v/v	1.56% v/v	N/A
19	95	1.56% v/v	1.56% v/v	N/A
20	96	1.56% v/v	1.56% v/v	N/A
21	98	3.125% v/v	1.56% v/v	N/A
22	99	1.56% v/v	1.56% v/v	1.56% v/v
23	100	1.56% v/v	1.56% v/v	1.56% v/v
24	101	1.56% v/v	1.56% v/v	1.56% v/v
25	128	3.125% v/v	1.56% v/v	3.125% v/v
26	129	1.56% v/v	1.56% v/v	1.56% v/v

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τα δείγματα 74, 86, 88, 90 είχαν χαμηλότερη τιμή MIC, πράγμα που υποδεικνύει ισχυρότερη αντιβακτηριακή ικανότητα από το μέλι Manuka. Τα δείγματα 30, 50, 64, 78, 82, 91, 98, 128 εμφάνισαν μεγαλύτερη τιμή και άρα χαμηλότερη αντιβακτηριακή ικανότητα από το Manuka. Όλα τα υπόλοιπα δείγματα ήταν ισάξια με το Manuka. Οι τιμές των ελάχιστων βακτηριοκτόνων συγκεντρώσεων ήταν ίδιες με τις ελάχιστες βακτηριοστατικές συγκεντρώσεις. Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους υπάρχει συμφωνία στην δραστικότητα των μελιών μόνο στα δείγματα 74, 88, 90(ισχυρότερη δραστικότητα απέναντι στο control) και 50 (χαμηλότερη δραστικότητα). Το δείγμα 98 που έδειξε να είναι ισχυρότερο από το control, στην δοκιμή MIC όχι μόνο δεν ήταν ισάξιο αλλά έδωσε χαμηλότερη δραστικότητα, αντιθέτως με άλλα δείγματα όπως το 13, 90, 95, 100 που αντί για ισχυρότερη δραστικότητα εμφάνισαν απλά ισάξια στην δοκιμή MIC.

Αποτελέσματα MIC για το βακτήριο *Salmonella typhimurium*

Πίνακας 7.

α/α	κωδικός	MIC Δείγματος	MIC Manuka	MBC
1	8	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
2	13	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
3	20	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
4	26	6.25% v/v	6.25% v/v	12.5% v/v
5	30	12.5% v/v	6.25% v/v	12.5% v/v
6	50	12.5% v/v	6.25% v/v	12.5% v/v
7	64	6.25% v/v	6.25% v/v	12.5% v/v
8	65	12.5% v/v	6.25% v/v	12.5% v/v
9	74	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
10	78	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
11	79	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
12	82	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
13	83	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
14	86	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
15	88	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
16	90	12.5% v/v	6.25% v/v	12.5% v/v
17	91	12.5% v/v	6.25% v/v	12.5% v/v
18	93	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
19	95	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
20	96	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
21	98	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
22	99	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
23	100	3.125% v/v	6.25% v/v	3.125% v/v
24	101	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
25	128	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
26	129	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πίνακα τα δείγματα 30, 50, 65, 90, 91 εμφάνισαν ασθενέστερη αντιβακτηριακή ικανότητα από το Manuka, ενώ το δείγμα 100 εμφάνισε ισχυρότερη δραστικότητα. Όλα τα υπόλοιπα δείγματα έχουν ισάξια δραστικότητα με το μέλι Manuka. Οι τιμές των ελάχιστων βακτηριοκτόνων συγκεντρώσεων ήταν ίδιες με τις ελάχιστες βακτηριοστατικές συγκεντρώσεις εκτός από τα δείγματα 26, 64 τα οποία είχαν μεγαλύτερη ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση. Συγκρίνοντας τις δυο μεθόδους well diffusion assay και MIC, δεν υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ τους καθώς στην πρώτη μέθοδο τα δείγματα με ισχυρότερη αντιβακτηριακή δράση(93, 99) και δείγματα με ασθενέστερη δράση σε σχέση με το μέλι Manuka(78, 83, 129), στην μέθοδο MIC εμφάνισαν όλα ισάξια δραστικότητα με το Manuka. Επίσης το δείγμα 100 που στην μέθοδο Well diffusion ήταν ισάξιο με σε δραστικότητα με το Manuka, στην μέθοδο MIC ήταν το μόνο δείγμα που εμφάνισε ισχυρότερη δραστικότητα.

Αποτελέσματα MIC για το βακτήριο *Klebsiella pneumoniae*.

Πίνακας 8.

α/α	κωδικός	MIC Δείγματος	MIC Manuka	MBC
1	8	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
2	13	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
3	20	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
4	26	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
5	30	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
6	50	12.5% v/v	6.25% v/v	12.5% v/v
7	64	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
8	65	6.25% v/v	6.25% v/v	12.5% v/v
9	74	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
10	78	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
11	79	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
12	82	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
13	83	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
14	86	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
15	88	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
16	90	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
17	91	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
18	93	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
19	95	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
20	96	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
21	98	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
22	99	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
23	100	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
24	101	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
25	128	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v
26	129	6.25% v/v	6.25% v/v	6.25% v/v

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα μόνο το δείγμα 50 εμφάνισε ασθενέστερη δραστικότητα σε σχέση με το Manuka. Όλα τα άλλα μέλια είχαν ίδια αντιβακτηριακή δράση με το μέλι Manuka. Οι τιμές των ελάχιστων βακτηριοκτόνων συγκεντρώσεων ήταν ίδιες με τις ελάχιστες βακτηριοστατικές συγκεντρώσεις εκτός από το δείγμα 65 που είχε μεγαλύτερη ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση. Συγκρίνοντας τις δυο μεθόδους δεν παρατηρούμε καμία συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων, καθώς στην μέθοδο well diffusion, ισχυρότερα μέλια(95, 99) αλλά και ασθενέστερα(13,20, 26, 64) σε αντιβακτηριακή ικανότητα σε σχέση με το Manuka εμφανίστηκαν ως ισάξια στην μέθοδο MIC. Το δείγμα 50 ήταν το μόνο που αποδείχθηκε ασθενέστερο του Manuka και στις δυο δοκιμές.

Αποτελέσματα MIC για το βακτήριο *Acinetobacter baumannii*.

Πίνακας 9.

α/α	κωδικός	MIC Δείγματος	MIC Manuka	MBC
1	8	6.25% v/v	3.125% v/v	6.25% v/v
2	13	6.25% v/v	3.125% v/v	6.25% v/v
3	20	6.25% v/v	3.125% v/v	6.25% v/v
4	26	6.25% v/v	3.125% v/v	6.25% v/v
5	30	3.125% v/v	1.56% v/v	3.125-6.25%v/v
6	50	6.25% v/v	1.56% v/v	6.25% v/v
7	64	3.125% v/v	1.56% v/v	3.125% v/v
8	65	3.125% v/v	1.56% v/v	3.125% v/v
9	74	3.125% v/v	3.125% v/v	3.125% v/v
10	78	3.125% v/v	3.125% v/v	3.125-6.25%v/v
11	79	3.125% v/v	3.125% v/v	3.125% v/v
12	82	3.125% v/v	3.125% v/v	3.125% v/v
13	83	6.25% v/v	1.56% v/v	6.25% v/v
14	86	3.125% v/v	1.56% v/v	3.125% v/v
15	88	6.25% v/v	1.56% v/v	6.25% v/v
16	90	6.25% v/v	1.56% v/v	6.25% v/v
17	91	3.125% v/v	3.125% v/v	3.125% v/v
18	93	3.125% v/v	3.125% v/v	3.125% v/v
19	95	3.125% v/v	3.125% v/v	3.125% v/v
20	96	3.125% v/v	3.125% v/v	3.125% v/v
21	98	3.125% v/v	3.125% v/v	3.125-6.25%v/v
22	99	3.125% v/v	3.125% v/v	3.125% v/v
23	100	3.125% v/v	3.125% v/v	3.125% v/v
24	101	3.125% v/v	3.125% v/v	3.125% v/v
25	128	3.125% v/v	3.125% v/v	3.125% v/v
26	129	3.125% v/v	3.125% v/v	3.125% v/v

Καθώς στις πλάκες με το μέλι Manuka εμφάνισε δυο διαφορετικές τιμές σε πολλές περιστάσεις είναι πιθανό η πραγματική του τιμή να βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές 1.56 και 3.125. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πίνακα τα δείγματα 8, 13, 20, 26, 30, 50, 64, 65, 83, 86, 88 και 90 εμφάνισαν ασθενέστερη δραστηριότητα σε σχέση με το μέλι Manuka. Όλα τα υπόλοιπα δείγματα είχαν ισάξια αντιβακτηριακή ικανότητα με αυτό. Οι τιμές των ελάχιστων βακτηριοκτόνων συγκεντρώσεων ήταν ίδιες με τις ελάχιστες βακτηριοστατικές συγκεντρώσεις εκτός από τα δείγματα 30, 78 και 98 που είναι πιθανό να έχουν μεγαλύτερη ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση. Συγκρίνοντας τις δυο μεθόδους βλέπουμε να συμφωνούν μερικώς στα αποτελέσματα καθώς και στις δυο τα δείγματα 8, 13, 20, 30, 50, 65 φάνηκε να είναι ασθενέστερα σε δραστηριότητα από το Manuka. Ωστόσο τα δείγματα 26, 64, 83, 86, 88 και 90 που ήταν ασθενέστερα σε σχέση με το Manuka στην δοκιμή MIC, ήταν ισάξια με αυτό στην δοκιμή well diffusion.

Έλεγχος μηχανισμού δράσης

Για την δοκιμασία MIC με προσθήκη καταλάσης για να ελεγχθεί αν η δράση οφείλεται στο υπεροξειδίου του υδρογόνου, επιλέχθηκαν επτά δείγματα πευκόμελου που εμφάνισαν ισχυρή ή ισάξια αντιβακτηριακή ικανότητα σε σχέση με το μέλι Μαυικά και στα τέσσερα διαφορετικά βακτήρια. Τα δείγματα αυτά ήταν το 74, 79, 93, 96, 99, 100 και 101. Παρακάτω αναγράφονται τα αποτελέσματα σε μορφή πινάκων για το κάθε βακτήριο.

Αποτελέσματα MIC για το βακτήριο *Staphylococcus aureus*.

Πίνακας 10.

Κωδικός	MIC	MIC Παρουσία καταλάσης
74	0.78% v/v	25% v/v
79	1.56% v/v	25% v/v
93	1.56% v/v	25% v/v
96	1.56% v/v	25% v/v
99	1.56% v/v	25% v/v
100	1.56% v/v	50% v/v
101	1.56% v/v	25% v/v

Αποτελέσματα MIC για το βακτήριο *Salmonella typhimurium*.

Πίνακας 11.

Κωδικός	MIC	MIC Παρουσία καταλάσης
74	6.25% v/v	25% v/v
79	6.25% v/v	25% v/v
93	6.25% v/v	25% v/v
96	6.25% v/v	25% v/v
99	6.25% v/v	25% v/v
100	3.125% v/v	50% v/v
101	6.25% v/v	25% v/v

Αποτελέσματα MIC για το βακτήριο *Klebsiella pneumoniae*.

Πίνακας 12.

Κωδικός	MIC	MIC Παρουσία καταλάσης
74	6.25% v/v	25% v/v
79	6.25% v/v	25% v/v
93	6.25% v/v	25% v/v
96	6.25% v/v	25% v/v
99	6.25% v/v	25% v/v
100	6.25% v/v	50% v/v
101	6.25% v/v	25% v/v

Αποτελέσματα MIC για το βακτήριο *Acinetobacter baumannii*.

Πίνακας 13.

Κωδικός	MIC	MIC Παρουσία καταλάσης
74	3.125% v/v	25% v/v
79	3.125% v/v	12% v/v
93	3.125% v/v	25% v/v
96	3.125% v/v	25% v/v
99	3.125% v/v	25% v/v
100	3.125% v/v	50% v/v
101	3.125% v/v	25% v/v

Συγκρίνοντας όλους τους παραπάνω πίνακες παρατηρούμε πως οι τιμές MIC αυξήθηκαν σε όλα τα δείγματα επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη και δράση του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Σε όλα τα βακτήρια το δείγμα 100 εμφάνισε την μεγαλύτερη αύξηση της τιμής MIC σε σχέση με τα άλλα δείγματα και το δείγμα 79 εμφάνισε μικρότερη αύξηση σε σχέση με τα άλλα δείγματα στο βακτήριο *Acinetobacter baumannii*.

Γενικές παρατηρήσεις

Συγκρίνοντας όλα τα αποτελέσματα της δοκιμής well diffusion αλλά και MIC, παρατηρούμε πως παρά την διαφωνία των δυο μεθόδων στα αποτελέσματα είναι φανερή η ευαισθησία των βακτηρίων στα δείγματα. Τα βακτήρια *Acinetobacter baumannii* και *Staphylococcus aureus* αποδείχθηκαν πιο ευαίσθητα από τα βακτήρια *Salmonella typhimurium* και *Klebsiella Pneumoniae* λαμβάνοντας υπόψιν τις μεγαλύτερες ζώνες που εμφανίστηκαν στο βακτήριο *S.aureus* σε 50% v/v αραιώση των μελιών αλλά και στις τιμές MIC των δειγμάτων και κυρίως του Manuka που ήταν περίπου 1.56% και 3.125% στα βακτήρια *S.aureus* και *A. baumannii* σε αντίθεση με την υψηλότερη τιμή MIC 6.25% των βακτηρίων *Salmonella typhimurium* και *Klebsiella pneumoniae*.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της πιο αξιόπιστης μεθόδου MIC, παρατηρούμε πως κάθε δείγμα εμφανίζει διαφορετικό εύρος δράσης στα διαφορετικά βακτήρια με πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα τα δείγματα 86, 88, 90 που εμφάνισαν χαμηλή τιμή MIC και άρα υψηλή αντιβακτηριακή ικανότητα απέναντι στο βακτήριο *S. aureus* ωστόσο είχαν υψηλότερα MIC από του Manuka άρα μικρότερη αντιβακτηριακή ικανότητα απέναντι στο *A. baumannii*. Στα άλλα δύο βακτήρια οι δραστηριότητες τους ήταν ισάξιες με το Manuka με εξαίρεση το δείγμα 90 στην περίπτωση της *Salmonella typhimurium* που ήταν ασθενέστερη η δράση του. Το δείγμα 50 εμφάνισε ασθενέστερη δράση σε σχέση με το θετικό control σε όλα τα βακτήρια. Το δείγμα 100 που είχε ισχυρή αντιβακτηριακή ικανότητα στο βακτήριο *Salmonella typhimurium*, στα άλλα βακτήρια εμφάνισε ισάξια με το Manuka δράση. Ομοίως το δείγμα 74 που ήταν ισχυρό έναντι του βακτηρίου *S. aureus*, ήταν ίσο σε δράση με το Manuka έναντι των υπόλοιπων βακτηρίων. Υπήρξαν και δείγματα που έδειξαν το αντίθετο μοτίβο, δηλαδή δείγματα που είχαν μικρότερη αντιβακτηριακή ικανότητα από το θετικό control σε ένα βακτήριο εμφάνισαν ίση ικανότητα με αυτό στα υπόλοιπα βακτήρια. Αυτό έδειξαν τα δείγματα 8, 13, 20, 26 στο βακτήριο *A. baumannii* σε σχέση με τα άλλα βακτήρια.

4.Συζήτηση

Το μέλι χρησιμοποιόταν από τους αρχαίους πολιτισμούς για την θρεπτική του αξία και τις θεραπευτικές του ιδιότητες. Το κύριο συστατικό του είναι οι υδατάνθρακες αλλά περιέχει ακόμα πρωτεΐνες, βιταμίνες, αμινοξέα, μεταλλικά στοιχεία και οργανικά οξέα, λόγω των οποίων οξέων εμφανίζει το χαρακτηριστικό του χαμηλό pH. Οι συγκεντρώσεις των βιταμινών στο μέλι είναι χαμηλές αλλά αυτή που εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ποσότητα είναι η βιταμίνη C. Επίσης το μέλι περιέχει απαραίτητα και όλα τα μη απαραίτητα αμινοξέα εκτός της ασπαραγίνης και γλουταμίνης. Η ύπαρξη μεταλλικών στοιχείων και απαραίτητων ιχνοστοιχείων είναι επίσης γνωστή. Αναλόγως της φυτικής του προέλευσης το μέλι έχει διαφορετικά είδη και επίπεδα πολυφαινόλων. Είναι γνωστό πως τα φλαβονοειδή και οι πολυφαινόλες έχουν σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα.

Στις μέρες μας λόγω της εμφάνισης βακτηριακών στελεχών ανθεκτικών σε αντιβιοτικά και του άμεσου κινδύνου που διατρέχουν για την δημόσια υγεία, είναι αναγκαία η ανακάλυψη εναλλακτικών μεθόδων για την καταπολέμηση τους. Είναι γνωστό πως από την αρχαιότητα το μέλι χρησιμοποιούταν για την ίαση ασθενειών, την επούλωση πληγών και την θεραπεία του έλκους του στομάχου. Η χρήση του μελιού αλλά και των προϊόντων της κυψέλης συνεχίζεται και σήμερα στον ιατρικό κλάδο της απιθεραπείας. Όλο και περισσότερες έρευνες γίνονται πάνω στην θεραπευτική δράση του μελιού και συγκεκριμένα στοχεύουν στην ταυτοποίηση μορίων υπεύθυνων για την δράση αυτή αλλά και των μηχανισμών δράσης τους. Το πιο ευρέως μελετημένο μέλι είναι το μέλι από *Leptospermum scoparium* της Νέας Ζηλανδίας (Manuka) το οποίο οφείλει την αντιβακτηριακή του ικανότητα στο μόριο μεθυλγλοξάλη. Τα μέλια Manuka βαθμονομούνται ανάλογα με την περιεκτικότητά τους σε αυτό το μόριο. Τυποποιημένα μέλια Manuka με βαθμό UMF πάνω από 10 θεωρούνται ικανά για χρήση σε θεραπείες. Εκτός του μορίου της μεθυλγλοξάλης που είναι μοναδικό για το Manuka υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που συμβάλουν στην αντιβακτηριακή ικανότητα των άλλων ειδών μελιού. Αρχικά η ίδια η σύσταση του μελιού, δηλαδή η υψηλή του περιεκτικότητα σε σάκχαρα συμβάλλει στην αναστολή ανάπτυξης βακτηρίων. Επίσης το χαμηλό του pH αποτελεί δυσμενή συνθήκη ανάπτυξης για τα περισσότερα βακτήρια και το υψηλό του ιξώδες αποτρέπει πιθανές μολύνσεις πληγών. Το μέλι επίσης περιέχει φλαβονοειδή και πολυφαινόλες που εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση. Άλλα μόρια με γνωστή αντιβακτηριακή δράση είναι τα πρωτεϊνικά πεπτίδια bee defensin 1 και 2 αλλά και η οξειδάση της γλυκόζης που μέσω της παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου αναστέλλει την ανάπτυξη βακτηρίων.

Τα μέλια κατηγοριοποιούνται βάση του φυτού προέλευσης σε ανθόμελα και μέλια μελιτώματος. Μεταξύ τους παρουσιάζουν διαφορές στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες όπως φαίνεται στους ποιοτικούς ελέγχους ρουτίνας μελιών, όπως είναι η ηλεκτρική αγωγιμότητα, η μέτρηση του pH και η ταυτοποίηση ύπαρξης τέφρας. Το εμπορικό ενδιαφέρον στα μέλια μελιτώματος αυξάνεται λόγω των σημαντικότερων θεραπευτικών ιδιοτήτων που εμφανίζουν σε σχέση με τα ανθόμελα. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν υψηλότερη αντιβακτηριακή και αντιοξειδωτική δραστηριότητα στα μέλια μελιτώματος σε αντίθεση με τα ανθόμελα. Τέλος η βιομηχανία τροφίμων προτιμά αυτού του είδους το μέλι λόγω της έντονης γεύσης του.

Στην Ελλάδα το μέλι το οποίο παράγεται στις μεγαλύτερες ποσότητες είναι το πευκόμελο. Είναι μέλι μελιτώματος και παράγεται με την βοήθεια του εντόμου *Marchalina hellenica*. Το έντομο αυτό χρησιμοποιεί τους χυμούς του δέντρου ως τροφή λόγω της υψηλής τους περιεκτικότητας σε σάκχαρα αλλά και για πηγή πρωτεΐνης. Τα έντομα εκκρίνουν το μελίτωμα το οποίο τελικά χρησιμοποιούν στην συνέχεια οι μέλισσες. Τα έντομα αυτά υπάρχουν μόνο στην ανατολική πλευρά της μεσογείου πράγμα που καθιστά το πευκόμελο μοναδικό. Οι μελισσοκόμοι εισήγαγαν τεχνητά το έντομο *Marchalina hellenica* σε πευκοδάση για την αύξηση της παραγωγής του πευκόμελου. Σήμερα το έντομο αυτό υπάρχει σε όλα τα πευκοδάση της χώρας. Οι απόψεις για την επικινδυνότητα του εντόμου έναντι των φυτών ξενιστών δίστανται.

Το πιο μελετημένο και τυποποιημένο μέλι είναι το μέλι από *Leptospermum scoparium* της Νέας Ζηλανδίας Manuka. Το μέλι Manuka αποτελείται από υδατάνθρακες, μέταλλα, πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα και ενώσεις φαινολικών και φλαβονοειδών. Αν και τέτοιου είδους ενώσεις μπορούν να βρεθούν σε άλλου είδους μέλια, το Manuka εμφανίζει άλλα μοναδικά χαρακτηριστικά όπως είναι η υψηλή συγκέντρωση μεθυλγλυοξάλης που εμφανίζει σημαντική αντιβακτηριακή ικανότητα. Αν και το υπεροξειδίο του υδρογόνου είναι ένας από τους κύριους αντιβακτηριακούς παράγοντες των μελιών, δεν συσσωρεύεται στο θεραπευτικό μέλι Manuka. Ο Juraj Majtan και οι συνεργάτες του σε μία έρευνά τους συμπέραναν πως τα υψηλά επίπεδα μεθυλγλυοξάλης στο μέλι Manuka αλληλεπιδρώντας με το ένζυμο της οξειδάσης της γλυκόζης πιθανός ευθύνονται για την αναστολή της παραγωγής H₂O₂.

Η αντιβακτηριακή ικανότητα του μελιού ευθύνεται κυρίως στην ύπαρξη υπεροξειδίου του υδρογόνου ή πρωτεϊνικών πεπτιδίων. Αναλόγως χωρίζονται έτσι οι τρόποι δράσης σε δράση υπεροξειδίου αν το κύριο μόριο δράσης είναι το H₂O₂ ή μη-υπεροξειδική δράση αν τον κύριο ρόλο αντιβακτηριακής ικανότητας έχει κάποιο πρωτεϊνικό πεπτίδιο όπως είναι η Bee defensin-1 και 2. Κατά την ωρίμανση του μελιού η οξειδάση της γλυκόζης καταλύει την αντίδραση μετατροπής της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ μέσω της οποίας παράγεται υπεροξειδίο του υδρογόνου. Η προσθήκη καταλάσης μειώνει την συγκέντρωση του υπεροξειδίου και άρα της αντιβακτηριακής ικανότητας. Οι πρωτεΐνες εισάγονται μέσα στο μέλι στην κυψέλη και εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία που εξαρτάται από την μέλισσα και το είδος του φυτού από το οποίο προέρχεται το νέκταρ. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να έχουν άμεση ή έμμεση δραστηριότητα όπως για παράδειγμα έχει η οξειδάση της γλυκόζης και το πεπτίδιο bee defensin-1.

Οι ντεφενσίνες εμπεριέχονται σε μια ευρεία οικογένεια κατιονικών αντιβακτηριακών πεπτιδίων και αποτελούν το κύριο αμυντικό μηχανισμό των περισσότερων οργανισμών. Οι ντεφενσίνες των εντόμων είναι ενεργές έναντι κυρίως κατά gram θετικών βακτηρίων και πιο σπάνια έναντι κατά gram αρνητικών βακτηρίων. Έρευνες έδειξαν πως δυο πεπτίδια η defensin-1 και η royalisin (απομονώθηκε από βασιλικό πολτό) προέρχονται από το ίδιο γονίδιο (defensin-1). Περαιτέρω έρευνες πρέπει να γίνουν για την αποσαφήνιση της ακριβής λειτουργίας του γονιδίου defensin-2 που κωδικοποιεί μια ισομορφή της διφενσίνης.

Το μέλι εμφανίζει σημαντική δραστηριότητα έναντι ανθεκτικών και μη-ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών. Σε δοκιμές προσθήκης μελιού Manuka έναντι MRSA έγινε γνωστός ο μηχανισμός δράσης του μελιού όπου διαταράσσει τον κυτταρικό κύκλο του βακτηρίου. Επίσης η προσθήκη Manuka στο βακτήριο *P. aeruginosa* προκαλεί ευρεία δομική ζημιά που οδηγεί στην λύση του κυττάρου και τελικά στον θάνατό του. Κάθε μικροοργανισμός

εμφανίζει ένα μοναδικό προφίλ αντίδρασης μετά από την έκθεσή του σε ανασταλτικά επίπεδα συγκεντρώσεων μελιών. Μερικά βακτήρια όπως για παράδειγμα το βακτήριο *P.aeruginosa* είναι γνωστό από την βιβλιογραφία πως για την αναστολή της ανάπτυξής του απαιτείται υψηλότερη συγκέντρωση μελιού καθώς είναι ανθεκτικό σε αντιβακτηριακές ουσίες.

Έρευνες παρουσίασαν πολλά αποτελέσματα δράσεων του μελιού που αποδεικνύουν την αντιβιομεμβρανική του ικανότητα. Το μέλι διαταράσσει επιτυχώς βιομεμβράνες που σχηματίζονται στη στοματική κοιλότητα (οδοντική πλάκα) αλλά και στις πληγές. Αναστέλλει βακτήρια των βιομεμβρανών όπως *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Actinomyces viscosus*, *Porphyromonas gingivalis* και *Fusobacterium nucleatum*. Αν και η συγκέντρωση του μελιού που απαιτείται για την καταστροφή των βιομεμβρανών είναι υψηλότερη από αυτήν της τιμής MIC για βακτήρια όπως η *P. aeruginosa*, *S. aureus* και *Streptococcus pyogenes* σε χρόνιες πληγές, φαίνεται πως αυτό δεν ισχύει στην περίπτωση του βακτηρίου *E. coli* O157:H7. Συγκεντρώσεις δέκα φορές μικρότερες από αυτή του MIC καταστρέφουν την βιομεμβράνη, ωστόσο δεν σκοτώνουν τα βακτήρια. Αυτό απέδειξε πως η αντιβιομεμβρανική ικανότητα του μελιού είναι ξεχωριστή από τον βακτηριοκτόνο τρόπο δράσης του. Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε πως η μεθυλγλουοξάλη (MGO) είναι υπεύθυνη για την διάσπαση βιομεμβρανών, διεισδύει στην βακτηριακή βιομεμβράνη και καταστρέφει τα βακτηριακά κύτταρα που βρίσκονται σε αυτήν. Ωστόσο δεν ερευνήθηκε εάν η μεθυλγλουοξάλη είναι αντισυγκολλητικό αλλά μόνο χαρακτηρίστηκε η αποτελεσματικότητα της ένωσης ενάντια σε καθιερωμένες βιομεμβράνες. Η αναστολή βιομεμβρανών (αποτροπή συγκόλλησης, μη διάσπαση καθιερωμένων βιομεμβρανών) και διαφορική έκφραση γονιδίων (στην περίπτωση του βακτηρίου *S.pyogenes*) παρατηρήθηκε για τα σάκχαρα του μελιού και μόνο και όχι για την μεθυλγλουοξάλη ή το υπεροξείδιο του υδρογόνου, αποδειχώντας πως τον κύριο αντισυγκολλητικό ρόλο τον έχουν τα σάκχαρα του μελιού.

Οι πολυφαινόλες είναι μια ετερογενής ομάδα χημικών ενώσεων που αποτελούν κυρίως προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών. Στην δομή τους εμφανίζουν πολλές φαινολικές ομάδες και η σύστασή τους στο μέλι εξαρτάται από τη βοτανική προέλευση του μελιού. Το μέλι εμφανίζει αντιοξειδωτική δράση λόγω των ενώσεων αυτών και συνήθως σκουρόχρωμα μέλια έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα στα φλαβονοειδή και στις πολυφαινόλες. Τα πιο άφθονα φλαβονοειδή στο μέλι είναι οι φλαβόνες, οι φλαβανόλες και οι φλαβονόλες.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο προσδιορισμός της αντιβακτηριακής ικανότητας 26 δειγμάτων ελληνικού πευκόμελου διαφορετικών περιοχών, έναντι των gram αρνητικών βακτηρίων *S. typhimurium*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* και του gram θετικού *S. aureus* σε σύγκριση με το μέλι Manuka. Χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικές μέθοδοι προσδιορισμού, η μέθοδος MIC και η μέθοδος διάχυσης σε πηγαδάκια. Είναι γνωστό πως ακριβέστερη μέθοδος είναι η πρώτη και φάνηκε από την σύγκριση των αποτελεσμάτων των δυο μεθόδων πως δεν υπάρχει μεγάλη συσχέτιση μεταξύ τους. Συγκεκριμένα για το βακτήριο *S. aureus* οι μέθοδοι συμφωνούν μόνο κατά 50% για τα αποτελέσματα ενώ για τα βακτήρια *S. typhimurium*, *K. pneumoniae* και *A. baumannii* συμφωνούν κατά 57,69%, 73,1% και 65,21% αντιστοίχως. Ομοίως το ίδιο συμβαίνει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ βακτηρίων. Πιθανόν μέλια με μεγάλη αντιβακτηριακή ικανότητα απέναντι σε ένα βακτήριο μπορεί να έχουν μικρότερη ικανότητα έναντι κάποιου άλλου. Στο συγκεκριμένο πείραμα παρατηρήσαμε πως μόνο το δείγμα 95 ήταν καλύτερο του Manuka σε δύο διαφορετικά βακτήρια (*S. aureus* και *K. pneumoniae*). Μεγαλύτερη "συμφωνία" αποτελεσμάτων

βλέπουμε στα δείγματα με χαμηλότερη αντιβακτηριακή ικανότητα από το μέλι Manuka, όπου το δείγμα 50 είχε χαμηλότερη αντιβακτηριακή ικανότητα από το Manuka έναντι των βακτηρίων *S. aureus*, *K. pneumoniae* και *A. baumannii*, το δείγμα 83 εμφάνισε χαμηλότερη δραστικότητα από το control στα βακτήρια *S. aureus* και *S. typhimurium*. Τέλος τα δείγματα 13 και 20 συμφωνούν στην χαμηλότερή τους δραστικότητα στα βακτήρια *K. pneumoniae* και *A. baumannii*. Τα περισσότερα δείγματα ήταν αυτά με δραστικότητα ίση με αυτή του μελιού Manuka. Τα δείγματα συμφωνούσαν στην δραστικότητα έναντι των βακτηρίων, όμως με διαφορετικούς συνδυασμούς αυτών. Για παράδειγμα τα δείγματα 20 και 83 είχαν ίση δραστικότητα με το Manuka απέναντι στα δυο από τα τέσσερα βακτήρια και συγκεκριμένα έναντι του *S. aureus* και της *S. typhimurium* το πρώτο (δείγμα 20) και *K. pneumoniae* και *A. baumannii* το δεύτερο (δείγμα 83). Τα δείγματα 8, 26, 50, 64, 65, 74, 78, 88, 90, 91, 93, 98, 99, 100 και 129 είχαν ίση δραστικότητα με το μέλι Manuka απέναντι στα τρία από τα τέσσερα βακτήρια. Συγκεκριμένα τα δείγματα 8, 30, 65 και 91 είχαν ίση δραστικότητα με το control απέναντι στον *S. aureus*, *S. typhimurium* και *K. pneumoniae*. Τα δείγματα 26 και 64 είχαν στα βακτήρια *S. aureus*, *S. typhimurium* και *A. baumannii*. Τα δείγματα 74, 88, 90, 98 και 100 είχαν στην *S. typhimurium*, *K. pneumoniae* και *A. baumannii*. Τα δείγματα 78, 93, 99 και 129 είχαν στον *S. aureus*, *K. pneumoniae* και *A. baumannii*. Τέλος τα δείγματα 79, 82, 86, 96 και 101 είχαν ίση δραστικότητα με το Manuka και στα τέσσερα βακτήρια.

Βλέπουμε λοιπόν πως μερικά μέλια μπορούν να στοχεύσουν ένα είδος βακτηρίου ή δύο και να εμφανίσουν αντιβακτηριακή δράση, ενώ άλλα μέλια θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως μη ειδικά στο είδος του βακτηρίου που στοχεύουν. Καθώς όλα τα μέλια ήταν πευκόμελα αλλά τα ίδια εμφανίζουν ποικιλία δραστικότητας έναντι εύρους βακτηρίων, περαιτέρω μελέτες πρέπει να γίνουν ξεχωριστά για το κάθε ένα για να διασαφηνιστεί ο μηχανισμός δράσης έναντι συγκεκριμένων βακτηρίων ή η μη ειδική τους δράση έναντι πολλών βακτηρίων.

Ομοίως για στην μέθοδο MIC βλέπουμε πως το δείγμα 50 είχε μικρότερη δραστικότητα απέναντι και στα τέσσερα βακτήρια. Κανένα μέλι δεν ήταν καλύτερο του Manuka σε πάνω από ένα βακτήριο. Τα περισσότερα μέλια ήταν ισάξια με το Manuka. Υπήρχαν δείγματα που ήταν αποτελεσματικά έναντι δυο βακτηρίων από τα τέσσερα όπως ήταν τα δείγματα 64, 65, 86, 88, 91, αλλά υπήρχαν και δείγματα που ήταν αποτελεσματικά έναντι τριών από τα τέσσερα βακτήρια όπως τα δείγματα 8, 13, 20, 26, 74, 78, 82, 83, 98, 100, 128 και 129. Όπως και στην προηγούμενη μέθοδο οι συνδυασμοί των βακτηρίων στους οποίους τα δείγματα εμφάνισαν δραστικότητα είναι πολλοί. Τα δείγματα 64, 86 και 83 ήταν αποτελεσματικά έναντι των βακτηρίων *S. typhimurium* και *K. pneumoniae*. Το δείγμα 65 ήταν αποτελεσματικό έναντι του *S. aureus* και *K. pneumoniae*, και το δείγμα 91 ήταν αποτελεσματικό έναντι της *K. pneumoniae* και *A. baumannii*. Στα δείγματα που ήταν αποτελεσματικά έναντι τριών από τα τέσσερα βακτήρια έχουμε τους εξής συνδυασμούς: Τα δείγματα 8, 13, 20, 26, 83 ήταν αποτελεσματικά έναντι των *S. aureus*, *S. typhimurium* και *K. pneumoniae*. Τα δείγματα 74, 78, 82, 98, 128 και 129 ήταν αποτελεσματικά έναντι των βακτηρίων *S. typhimurium*, *K. pneumoniae* και *A. baumannii* και τέλος το δείγμα 100 ήταν αποτελεσματικό έναντι του *S. aureus*, της *K. pneumoniae* και *A. baumannii*. Τα δείγματα 79, 93, 95, 96, 99 και 101 ήταν αποτελεσματικά έναντι και των τεσσάρων βακτηρίων.

Στην μέθοδο MBC (minimum bactericidal concentration) φάνηκε πως για τα περισσότερα δείγματα η ελάχιστη συγκέντρωση που προκαλεί την πλήρη αναστολή των βακτηρίων είναι η ίδια με την βακτηριοκτόνο συγκέντρωση. Εξαιρέσεις αποτελούν τα δείγματα 26 και 64 για

το βακτήριο *S. typhimurium*, το δείγμα 65 για το βακτήριο *K. pneumoniae*, τα δείγματα 30, 78 και 98 για το βακτήριο *A. baumannii*.

Στην δοκιμασία MIC παρουσία καταλάσης, και στα επτά δείγματα που επιλέχθηκαν η τιμή MIC αυξήθηκε δείχνοντας πως σε όλα αυτά τα μέλια η αντιβακτηριακή δραστηριότητα είναι αποτέλεσμα της ύπαρξης υπεροξειδίου του υδρογόνου. Το δείγμα 100 εμφάνισε την μεγαλύτερη αύξηση σε όλα τα βακτήρια και το δείγμα 79 μόνο στο βακτήριο *Acinetobacter baumannii* εμφάνισε την μικρότερη αύξηση της τιμής MIC.

Πολύ λίγες έρευνες έχουν γίνει πάνω στην αντιβακτηριακή ικανότητα των μελιών μελιτώματος, πόσο μάλλον των πευκόμελων. Στις παρακάτω έρευνες πρέπει να σημειωθεί πως συγκριτικά με την παρούσα διπλωματική εργασία, τόσο οι μέθοδοι, η απεικόνιση των αποτελεσμάτων όσο και τα μέρη τεχνικών διαφέρουν μεταξύ τους. Στη έρευνα (Evaluation of the Antioxidant Capacity, Antimicrobial and Antiproliferative Potential of Fir (*Abies alba* Mill.) Honeydew Honey Collected from Gorski kotar (Croatia) στην μέθοδο well diffusion assay ως θετικό control χρησιμοποιήθηκαν αντιβιοτικά και όχι Manuka, επίσης η ποσότητα των δειγμάτων ήταν ίση με 50μl και όχι κοντά στα 100, τέλος κάθε δείγμα στην έρευνα επαληθεύτηκε μόνο άλλη μια φορά και όχι συνολικά τρεις όπως στην παρούσα εργασία. Ο τρόπος απεικόνισης επίσης διέφερε, αντί ποσοστών, στην μέθοδο MIC τα αποτελέσματα στην έρευνα ήταν σε g/ml. Μια μικρή μετατροπή ήταν απαραίτητη για την σύγκριση.

Στη έρευνα του Dalibor Broznić και των συνεργατών του (Evaluation of the Antioxidant Capacity, Antimicrobial and Antiproliferative Potential of Fir (*Abies alba* Mill.) Honeydew Honey Collected from Gorski kotar (Croatia)), χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά στελέχη βακτηρίων και μέλια μελιτώματος από έλατο. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μεθόδων MIC και well diffusion.

Table 4. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of fir (*Abies alba* Mill.) honeydew honey against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains

Honey sample	Staphylococcus spp.												
	S. aureus ATCC 25923		S. aureus		MRSA1		MRSA2		S. epidermidis		MRSE		
	γ/(g/mL)												
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	
1	0.025	0.05	0.025	0.05	0.025	0.05	0.0125	0.025	0.025	0.05	0.025	0.05	
2	0.025	0.05	0.025	0.05	0.025	0.05	0.0125	0.025	0.0125	0.025	0.0125	0.025	
3	0.0125	0.025	0.0125	0.025	0.025	0.05	0.0125	0.025	0.0125	0.025	0.0125	0.025	
4	0.025	0.05	0.025	0.05	0.025	0.05	0.0125	0.025	0.0125	0.025	0.0125	0.025	
Vancomycin	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	5·10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	7.5·10 ⁻⁷	7.5·10 ⁻⁷	2·10 ⁻⁶	2·10 ⁻⁶

MIC/MBC=99 % of bacteriostatic and 99 % of bacterial killing effect

Table 5. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of fir (*Abies alba* Mill.) honeydew honey against different *Acinetobacter baumannii* strains

Honey sample	Acinetobacter baumannii											
	ATCC BAA-1605		ATCC 19606		56781		54531		53154		771	
	γ/(g/mL)											
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
1	0.05	0.1	0.05	0.1	0.05	0.1	0.05	0.1	0.025	0.05	0.05	0.1
2	0.025	0.05	0.05	0.1	0.025	0.05	0.05	0.1	0.025	0.05	0.05	0.1
3	0.025	0.05	0.05	0.1	0.025	0.05	0.025	0.05	0.025	0.05	0.05	0.1
4	0.05	0.1	0.05	0.1	0.025	0.05	0.025	0.05	0.05	0.1	0.05	0.1
Vancomycin	>3.2·10 ⁻⁵	>3.2·10 ⁻⁵	2.5·10 ⁻⁷	2.5·10 ⁻⁷	>3.2·10 ⁻⁵	>3.2·10 ⁻⁵	>3.2·10 ⁻⁵	>3.2·10 ⁻⁵	>3.2·10 ⁻⁵	>3.2·10 ⁻⁵	2.5·10 ⁻⁷	2.5·10 ⁻⁷

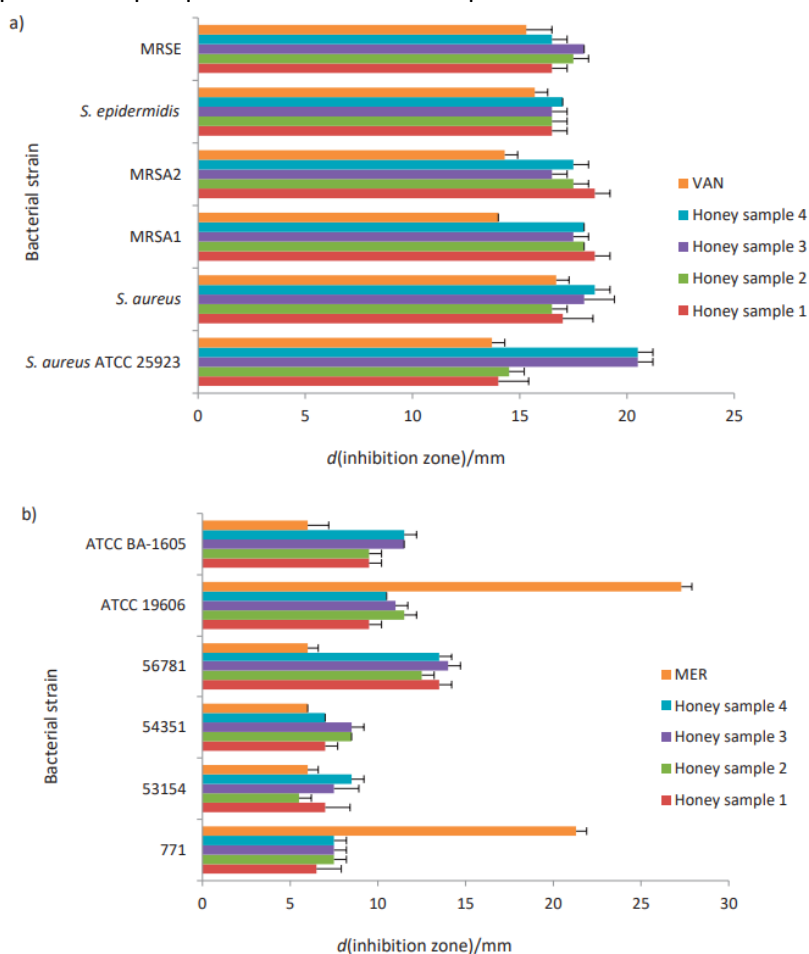
MIC/MBC=99 % of bacteriostatic and 99 % of bacterial killing effect

Εικόνα 3.1 Πίνακες αποτελεσμάτων MIC και MBC για τα δείγματα μελιών 1-4 στα στελέχη βακτηρίων *Acinetobacter baumannii* και είδη *Staphylococcus*. (Broznić D. et al., October-December 2018)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε στην μέθοδο MIC είναι όμοια, ωστόσο αντί για μέλι Manuka χρησιμοποιήθηκαν τα αντιβιοτικά vancomycin και meropenem ως θετικά control. Λόγω του ότι τα αποτελέσματα αναγράφονται σε g/ml, είναι απαραίτητη η μετατροπή τους σε ποσοστά για να γίνει σύγκριση. Συγκεκριμένα 0.025 g/ml αντιστοιχούν σε 2.5 %. Ομοίως 0.05 g/ml αντιστοιχούν σε 5% συγκέντρωση. Για τα στελέχη *S.aureus* βλέπουμε ένα εύρος τιμών MIC από 1.25% μέχρι 2.5 %. Και στα τέσσερα δείγματα η βακτηριοστατική συγκέντρωση δεν είναι όμοια με την βακτηριοκτόνο. Στα στελέχη *A.baumannii* το εύρος των τιμών ισούται με 2.5% μέχρι 5% και πάλι η βακτηριοστατική συγκέντρωση δεν είναι όμοια με την βακτηριοκτόνο. Στα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, το μέλι Manuka είχε τιμή MIC ίση με 1.56% για το βακτήριο *S.aureus* και 1.56-3.125% για το βακτήριο *A. baumannii*. Στα δείγματα βρίσκουμε ομοιότητες στο εύρος των τιμών, ωστόσο τα δείγματα εμφάνισαν μεγαλύτερο εύρος τιμών από 0.78-6.25% με τα περισσότερα να είναι ίσα με 1.56%. Λίγα ήταν τα δείγματα με την τιμή 0.78% που καθώς είναι μικρότερη της τιμής 1.25% δηλώνει μεγαλύτερη αντιβακτηριακή ικανότητα (δείγματα 74, 86, 88, 90). Για το βακτήριο *A. baumannii* τα περισσότερα δείγματα ήταν μέσα στο εύρος τιμών της έρευνας του Dalibor Broznić (2.5-5%), ωστόσο εκτός του ότι στην παρούσα έρευνα δεν υπήρχε δείγμα μελιού με τιμή ίση με 2.5% υπήρχαν αρκετά μέλια με τιμή 6.25% (χαμηλότερη δραστηριότητα). Μόνο σε τρία δείγματα από τα 26 δεν ήταν όμοια η βακτηριοστατική συγκέντρωση με την βακτηριοκτόνο. Τέλος τα αντιβιοτικά έχουν μεγαλύτερη δραστηριότητα σε σχέση με το μέλι Manuka.

Στην μέθοδο well diffusion assay, τα στελέχη *S. aureus* φάνηκε να είναι πιο ευαίσθητα απέναντι στα δείγματα μελιών σε σχέση με τα στελέχη του *A. baumannii*. Επίσης μεταξύ στελεχών, αυτά με ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά ήταν εξίσου ευαίσθητα στο μέλι με αυτά χωρίς ανθεκτικότητα. Οι ζώνες αναστολής κυμαίνονταν από 13 μέχρι 21 χιλιοστά και από 7 μέχρι 14 χιλιοστά για τα βακτήρια *S. aureus* και *A. baumannii* αντίστοιχα. Στην παρούσα πτυχιακή είδαμε παρόμοιες τιμές ζωνών με αυτές των πειραμάτων του Dalibor Broznić, με τιμές 12 μέχρι 18 χιλιοστά στο βακτήριο *S.aureus* και 7 μέχρι 14 στο *A. baumannii*.

Βλέποντας συνολικά όλα τα αποτελέσματα των δυο εργασιών και για τις δυο μεθόδους, βλέπουμε πως τα πευκόμελα και τα μέλια ελάτου έχουν πολύ πιθανόν παρόμοια αντιβακτηριακή ικανότητα έναντι των βακτηρίων *S. aureus* και *A. baumannii*. Με περισσότερα δείγματα μελιών από έλατο η υπόθεση θα μπορούσε να αποσαφηνιστεί καθώς ίσως έλατα διαφορετικών χωρών λόγω διαφορετικών



Εικόνα 3.2 Γραφήματα με αποτελέσματα ζωνών αναστολής σε χιλιοστά που εμφάνισαν τα μέλια 1-4 έναντι στελεχών βακτηρίων. (Broznić D. et al., October-December 2018)

συνθηκών μπορεί να έχουν πολύ διαφορετικές δραστηριότητες.

Στην παρούσα εργασία τα δείγματα που εμφάνισαν τις μεγαλύτερες ζώνες αναστολής στο βακτήριο *S. aureus* ήταν τα 13, 90 και 95. Στο βακτήριο *A. baumannii* δεν υπήρχε δείγμα καλύτερο του control, όμως σε σύγκριση με αυτό τις μεγαλύτερες ζώνες είχαν τα δείγματα 74, 82 και 83. Στην έρευνα του Dalibor Broznić, τα τέσσερα δείγματα μελιού από έλατο είχαν μεγαλύτερες ζώνες αναστολής σε σχέση με το αντιβιοτικό vancomycin στα βακτηριακά στελέχη του *S. aureus* ενώ εμφανίστηκε μεγαλύτερη ποικιλία σε δραστηριότητες στα βακτηριακά στελέχη του *A. baumannii*, όπου μόνο στα δυο στελέχη ATCC 19606 και 771 το αντιβιοτικό meropenem είχε μεγαλύτερη ζώνη αναστολής από τα δείγματα και στα άλλα στελέχη τα τέσσερα μέλια από έλατο είχαν πολύ διαφορετικές ζώνες μεταξύ των διαφορετικών στελεχών. (Broznić D. et al. , October-December 2018)

Στην έρευνα του Nazime Mercan και των συνεργατών του αναλύθηκε η αντιβακτηριακή ικανότητα πευκόμελων σε διάφορες συγκεντρώσεις έναντι πολλών βακτηρίων μόνο με την μέθοδο well diffusion assay. Η μέθοδος ήταν όμοια σε όλα τα στάδια με της παρούσας εργασίας, εκτός της ποσότητας αραιωμένης βακτηριακής καλλιέργειας που προστέθηκε στο agar plate (100μl σε σχέση με τα 35μl αυτής της εργασίας) και του θετικού control που ήταν αντιβιοτικά. Για να είναι δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων θα πρέπει να υπενθυμίσουμε πως στο *S.aureus* τα δείγματα ήταν αραιωμένα κατά 50% ενώ στη *K.pneumoniae* έμειναν αναραίωτα. Τα δείγματα ένα και δυο εμφάνισαν μεγαλύτερες ζώνες αναστολής από όλα τα δείγματα της παρούσας εργασίας έναντι του βακτηρίου *S. aureus* (26.0 ± 0.2 , 22.0 ± 0.2 mm σε αντίθεση με 18.0 ± 1.0 mm του δείγματος 13) , ωστόσο το δείγμα τρία δεν εμφάνισε ζώνη σε καμία του συγκέντρωση. Αν και δεν χρησιμοποιήθηκε αναραίωτο μέλι στα πειράματα του Nazime Mercan, κανένα από τα τρία δείγματα, σε καμία συγκέντρωση δεν εμφάνισε ζώνη αναστολής έναντι του βακτηρίου *K.pneumoniae*. Στην παρούσα εργασία η μεγαλύτερη ζώνη αναστολής που εμφανίστηκε ήταν ίση με 18mm στα δείγματα 95 και 100. Καθώς η μέθοδος well diffusion assay δεν θεωρείται από τις πιο ακριβείς μεθόδους και σε αυτήν την έρευνα δεν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος MIC, πέρα από την απλή σύγκριση των αποτελεσμάτων δεν μπορούμε να συγκρίνουμε ολικά τα πευκόμελα αυτά με της παρούσας εργασίας. (Mercan N. et al. , March 2007)

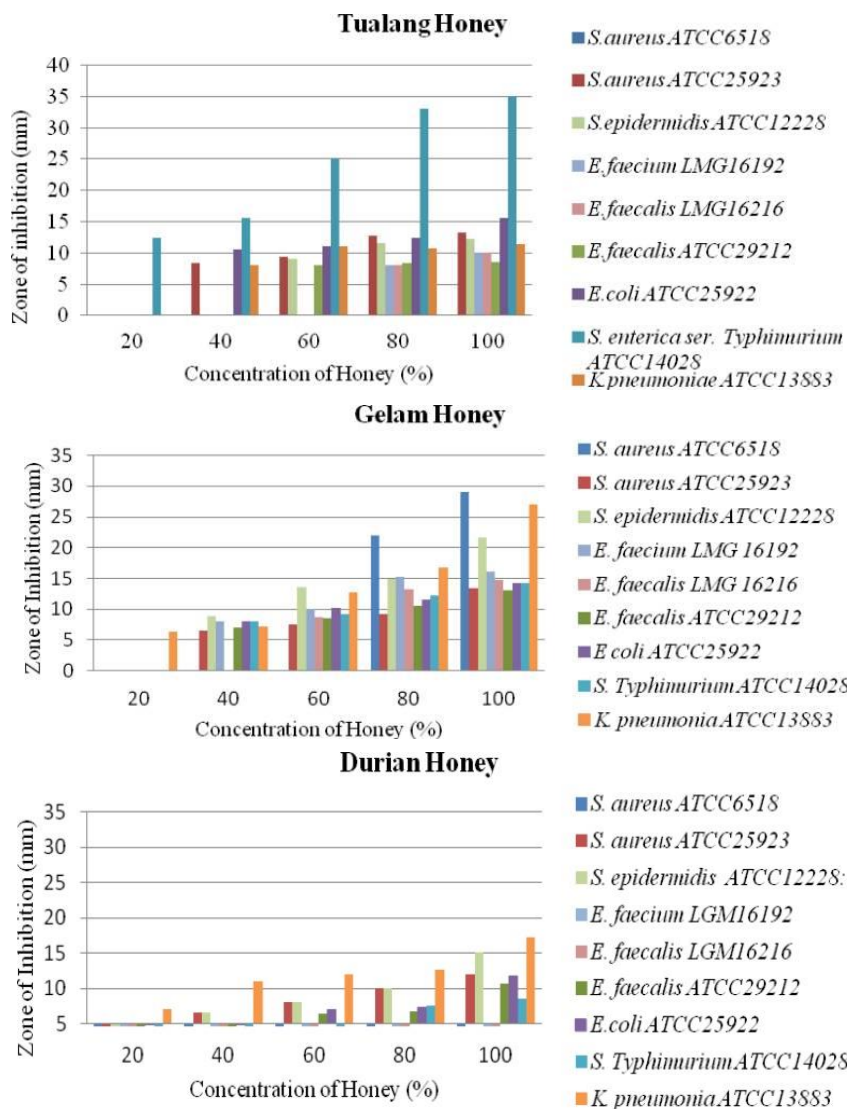
Στην έρευνα του Wen-Jie Ng και των συνεργατών του προσδιορίστηκε η αντιβακτηριακή ικανότητα τριών μελιών της Μαλαισίας έναντι πολλών διαφορετικών μικροοργανισμών. Χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι well-diffusion και MIC, MBC, ωστόσο στη πρώτη μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων (20%, 40%, 60%, 80% και 100%). Η διαδικασία MIC ήταν διαφορετική καθώς δεν έγινε η χρήση 96-well plate, αλλά χρησιμοποιήθηκαν tubes με διαφορετικές συγκεντρώσεις του μελιού που προέκυψαν από διαδοχικές αραιώσεις (2000 mg/ml, 1000 mg/ml, 500 mg/ml, 250 mg/ml, 125 mg/ml, 62.5 mg/ml, 31.25 mg/ml, 15.63 mg/ml και 7.81 mg/ml). Για τη μετατροπή των συγκεντρώσεων αυτών σε ποσοστά ισχύει πως 500 mg/ml ισούνται με 50%.

Καθώς στην μέθοδο well-diffusion τα δείγματα δοκιμάστηκαν έναντι των βακτηρίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, για την σύγκριση των αποτελεσμάτων με την παρούσα εργασία επιλέγονται οι συγκεντρώσεις 40 και 60% για τα στελέχη του *S. aureus* και 100% για τα βακτήρια *S. typhimurium* και *K. pneumoniae*. Πρέπει να σημειωθεί πως στην έρευνα αυτή έγινε η ίδια παρατήρηση με την παρούσα πως λιγότερα αραιωμένα μέλια (μεγαλύτερες συγκεντρώσεις) παρουσίασαν μεγαλύτερες ζώνες αναστολής.

Το μέλι Tualang φαίνεται πως εμφάνισε τις μεγαλύτερες ζώνες έναντι του βακτηρίου *S. typhimurium* ήδη από την συγκέντρωση 20%. Στο αναραιωτό δείγμα (100%) η ζώνη αναστολής ήταν ίση με 35 χιλιοστά. Συγκριτικά με αυτές τις τιμές η μεγαλύτερη ζώνη αναστολής που εμφάνισε το δείγμα 93 πευκόμελου ισούταν με 16 χιλιοστά. Τα μέλια Gelam και Durian φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματικά έναντι του βακτηρίου *K. pneumoniae* σε σχέση με τα άλλα βακτήρια (ζώνες αναστολής ίσες με 27 και 17mm αντίστοιχα στα αναραιωτά μέλια) με εξαίρεση το βακτήριο *S. aureus* ATCC651S έναντι του οποίου εμφανίστηκαν οι μεγαλύτερες ζώνες αναστολής με το μέλι Gelam ξαφνικά στις συγκεντρώσεις 80 και 100% (21 και 29mm αντίστοιχα). Τα πευκόμελα είχαν ζώνες αναστολής έναντι του βακτηρίου *K. pneumoniae* ίσες με 18mm (δείγματα 95 και 100) και έναντι του *S. aureus* ίση με 18mm ωστόσο σε 50% αραιώση. Είναι πολύ πιθανόν πως αναραιωτό το δείγμα πευκόμελου θα εμφάνιζε επίσης τόσο μεγάλες ζώνες αναστολής γιατί φαίνεται στο διάγραμμα πως σε 50% συγκέντρωση το μέλι Gelam δεν εμφάνισε ζώνη αναστολής. Τα αποτελέσματα των μεθόδων MIC και MBC φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Με εξαίρεση τα στελέχη *Enterococcus faecium* LMG16192 και *Enterococcus faecalis* LMG16216 σε όλα τα υπόλοιπα βακτήρια η τιμή MIC δεν ήταν ίση με την τιμή MBC. Άρα η βακτηριοκτόνος συγκέντρωση δεν ταυτίζεται με την βακτηριοστατική. Στην παρούσα εργασία πολύ λίγα ήταν τα δείγματα στα οποία οι τιμές MIC και MBC δεν ήταν οι ίδιες (στο βακτήριο *K. pneumoniae* το δείγμα 65 και στο βακτήριο *S. typhimurium* τα δείγματα 26 και 64).

Οι χαμηλότερες τιμές MIC στα βακτήρια που μας ενδιαφέρουν για την σύγκριση είναι ίσες με 12.5%. Συγκεκριμένα τα μέλια Gelam και Durian στο βακτήριο *K. pneumoniae*, το μέλι Tualang στο βακτήριο *S. typhimurium* και το μέλι Gelam στο βακτήριο *S. aureus*, ήταν αυτά που εμφάνισαν αυτήν την χαμηλότερη τιμή. Πρέπει να σημειωθεί πως τα περισσότερα πευκόμελα έναντι των βακτηρίων *S. typhimurium* και *K. pneumoniae* είχαν τιμές ίσες με 6.25% που ήταν όμοιες με αυτές του θετικού control μελιού Manuka. Λίγα ήταν τα πευκόμελα που είχαν τιμή ίση με 12.5% στα βακτήρια αυτά. Σημαντικότερη διαφορά στις τιμές MIC εμφανίζονται στο βακτήριο *S. aureus*, όπου οι χαμηλότερες τιμές ήταν ίσες με 0.78% και η υψηλότερη ίση με 6.25%. Τα πευκόμελα φαίνεται πως έχουν ισχυρότερη



Εικόνα 3.4 Γραφήματα αποτελεσμάτων Well-Diffusion Assay για διαφορετικές συγκεντρώσεις τριών μελιών (20, 40, 60, 80 και 100%) έναντι διαφορετικών βακτηρίων. Οι ζώνες αναστολής μετρήθηκαν σε χιλιοστά. (Ng W. et al., January 2014)

αντιβακτηριακή ικανότητα από τα μέλια Tualang, Gelam και Durian αλλά επίσης είναι πολύ ενδιαφέρον πως ενώ οι τιμές των ζωνών αναστολής ήταν μεγαλύτερες από της παρούσας εργασίας, οι τιμές MIC ήταν ασθενέστερες από αυτές των πευκόμελων.

Αυτό είναι ένα ακόμη παράδειγμα που δείχνει πως η μέθοδος well-diffusion δεν είναι ακριβείς και χρησιμοποιείται μόνο για την απλή αποσαφήνιση αν το μέλι-δείγμα έχει πιθανός αντιβακτηριακή ικανότητα. (Ng W. et al. , January 2014)

MIC and MBC (mg/ml) of three Malaysian honey.

Bacterial strains	Tualang honey		Gelam honey		Durian honey	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. aureus</i> ATCC6518	500	2000	125	125	500	1000
<i>S. aureus</i> ATCC25923	250	500	1000	1000	250	500
<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	250	1000	250	250	250	1000
<i>E. faecium</i> LMG16192	250	2000	500	2000	500	2000
<i>E. faecalis</i> LMG16216	250	2000	500	2000	500	2000
<i>E. faecalis</i> ATCC12228	250	2000	1000	1000	500	2000
<i>E. coli</i> ATCC25922	250	500	500	500	500	NA
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC14028	125	500	250	500	1000	NA
<i>K. pneumoniae</i> ATCC13883	500	1000	125	250	125	250

NA: No activity seen against the tested bacteria

Εικόνα 3.5 Πίνακας αποτελεσμάτων MIC και MBC(mg/ml) τριών μελιών έναντι πολλών βακτηρίων. (Ng W. et al. , January 2014)

Όλο και περισσότερες έρευνες γίνονται για την εύρεση μελιών με αντιβακτηριακή ικανότητα που θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν ή να χρησιμοποιηθούν μαζί με αντιβιοτικά. Τα πευκόμελα ως μέλια μελιτώματος, έχουν και αυτά σημαντική αντιβακτηριακή ικανότητα που σε πολλές περιπτώσεις είναι ισάξια με τη δράση του μελιού Manuka. Είναι σημαντικό λοιπόν να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός δράσης των πευκόμελων και τελικά να γίνουν πειράματα in vivo για την σταδιακή ανακάλυψη σκευασμάτων που θα μπορέσουν να απαλλάξουν τον οργανισμό ανθρώπων μολυσμένων από υπερανθεκτικά παθογόνα μικρόβια.

Βιβλιογραφία

1. **Ansari N. , Yazdian-Robati R. , Shahdordizadeh M. , Wang Z. , Ghazvini K. ,** 15 June 2017, *Aptasensors for quantitative detection of Salmonella Typhimurium*, Analytical Biochemistry, Volume 533: 18-25.
2. **Broznić D. , Ratkaj I. , Staver M. M. , Pavelić S. K. , Žurga P. , Bubalo D. , Gobin I. ,** October-December 2018, *Evaluation of the Antioxidant Capacity, Antimicrobial and Antiproliferative Potential of Fir (Abies alba Mill.) Honeydew Honey Collected from Gorski kotar (Croatia)*, Food technology and biotechnology, Volume 56, Issue 4.
3. **Carter D. A. , Blair S. E. , Cokcetin N. N. , Bouzo D. , Brooks P. , Schothauer R. , Harry E. J. ,** 20 April 2016, *Therapeutic Manuka Honey: No Longer So Alternative*, frontiers in Microbiology, Volume 7
4. **Cianciosi D. , Battino M. et al,** September 2018, *Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review*, Molecules, Volume 23, Issue 9.
5. **Mercan N. , Guvensen A. , Celik A. , Katircioglu H. ,** March 2007, *Antimicrobial activity and pollen composition of honey samples collected from different provinces in Turkey*, Natural Product Research, Volume 21, Issue 3: 187-195.
6. **Erlinghagen F. ,** 2001, *Portrait of an Insect: Marchalina hellenica Genn. (Sternorrhyncha: Coccina: Margarodidae), an important Honeydew Producer in Greece*, Apiacta, Volume 36: 131-137.
7. **Gallis A. , Arrabal C. , Papageorgiou A. C. , Garcia-Vallejo M. C. ,** July 2011, *Needle Terpenoid Composition of Pinus Halepnsis (Mill.) Trees Infested by Scale Insect Marchalina hellenica (Genn.) in Greece*.
8. **Johnston M. , McBride M. , Dahiya D. , Owusu-Apenten R. , Nigam P. S. ,** 27 November 2018, *Antibacterial activity of Manuka honey and its components: An overview*, AIMS Microbiology, Volume 4: 655-664.
9. **Karabagias I. K. , Babeka A. , Kontakos S. , Karabournioti S. , Kontominas M. G. ,** 2014, *Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics*, Food Chemistry, Volume 146: 548-557.
10. **Klaudiny J. , Albert Š. , Bachanová K. , Kopernický J. , Šimúth J. ,** January 2005, *Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee Apis mellifera*, Insect Biochemistry and Molecular Biology, Volume 35, Issue 1: 11-22.
11. **Lee A. S. , Lencastre H. , Garau J. , Kluytmans J. , Malhotra-Kumar S. , Peschel A. , Harbarth S. ,** May 2018, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, Nature Reviews Disease Primers, Volume 4.
12. **Lee C. , Lee J. H. , Park M. , Park K. S. , Bae I. S. , Kim Y. B. , Cha C. , Jeong B. C. , Lee S. H. ,** 13 March 2017, *Biology of Acinetobacter baumannii: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Option*, frontiers in Cellular and Infection Microbiology, Volume 7, Article 55.
13. **Maddocks S. E. , Jenkins R. E. ,** November 2013, *Honey: a sweet solution to the growing problem of antimicrobial resistance?*, Future Microbiology, Volume 8, Issue 11: 1419-1429
14. **Mandal M. D. , Mandal S. ,** 1 April 2011, *Honey: its medicinal property and antibacterial activity*, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 154-160.

15. **Majtan J. , Bohova J. , Prochazka E. , Klaudiny J. ,** February 2014, *Methylglyoxal May Affect Hydrogen Peroxide Accumulation in Manuka Honey Through the Inhibition of Glucose Oxidase*, Journal of Medicinal Food, Volume 17, Issue 2: 290-293
16. **Martin R. M. , Bachman M. A. ,** 22 January 2018, *Colonization, Infection, and the Accessory Genome of Klebsiella pneumoniae*, frontiers in Cellular and Infection Microbiology, Volume 8, Article 4.
17. **Mercan N. , Guvensen A. , Celik A. , Katircioglu H. ,** March 2007, *Antimicrobial activity and pollen composition of honey samples collected from different provinces in Turkey*, Natural Product Research, Volume 21, Issue 3: 187-195.
18. **Ng W. , Ken K. , Kumar R. , Gunasagaran H. , Chandramogan V. , Lee Y. ,** January 2014, *In-Vitro Screening of Malaysian Honey from Different Floral Sources for Antibacterial Activity on Human Pathogenic Bacteria*, African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicine, Volume 11, Issue 2: 315-318.
19. **Özkök A. , D'Arcy B. R. ,** January 2014, *Sugar Analysis of Pine Honey from Muğla Region using HPLC*, MELLIFERA, Volume 14: 27-32
20. **Pita-Calvo C. , Vazquez M. ,** 20 Feb 2018, *Honeydew honeys: a review on characterization and authentication of the botanical and geographical origin*, Journal of Agricultural and Food Chemistry
21. **Samarghandian S. , Farkhondeh T. , Samini F. ,** April-June 2017, *Honey and Health: A Review of Recent Clinical Research*, Pharmacognosy Research, Vol 9: 121-127.
22. **Valachová I. , Bučeková M. , Majtan J. ,** 2016, *Quantification of Bee-Derived Peptide Defensin-1 in Honey by Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, a New Approach in Honey Quality Control*, Czech Journal of Food Sciences, Volume 34: 233-243.