



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη της αντιβακτηριακής δράσης κρητικών μελιών έναντι
νοσοκομειακών και τροφιμογενών βακτηρίων**

**Study of the antibacterial activity of Cretan honeys against hospital
and foodborne bacteria**



ΚΑΡΑΠΟΣΤΟΛΗ ΣΟΦΙΑ

Πατρώνυμο: Καραποστόλης Κωνσταντίνος

Λάρισα, 2022

Μελέτη της αντιβακτηριακής δράσης κρητικών μελιών έναντι νοσοκομειακών και τροφιμογενών βακτηρίων

Study of the antibacterial activity of Cretan honeys against hospital and foodborne bacteria

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοπληροφορικής με έμφαση στη Μικροβιολογία

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΤΗΛΕΜΑΧΟΣ

Ε.ΔΙ.Π Μοριακής Μικροβιολογίας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Μόσιαλου Δημητρίου. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για την καθοδήγηση που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πειραματικής μελέτης. Ευχαριστώ επίσης τον κ. Αμούτζια Γρηγόριο Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοπληροφορικής και το μέλος Ε.ΔΙ.Π. Δημητρίου Τηλέμαχο, μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Η συγκεκριμένη εργασία δεν θα ήταν δυνατή χωρίς την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση της Χριστίνας Τσαδήλα, στην οποία οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την οικονομική και ηθική υποστήριξή τους, αλλά και όλους τους ανθρώπους που στάθηκαν δίπλα μου σε αυτό το δύσκολο αλλά και μοναδικό ταξίδι. Τίποτα δεν θα ήταν εφικτό χωρίς αυτούς.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT.....	8
I. Εισαγωγή	9
1.1 Τι είναι μέλι;.....	9
1.2 Σύσταση μελιού.....	10
1.2.1 Σάκχαρα.....	11
1.2.2 Νερό.....	11
1.2.3 Πρωτεΐνες	11
1.2.4 Αμινοξέα.....	12
1.2.5 Οργανικά οξέα.....	12
1.2.6 Βιταμίνες	12
1.2.7 Μεταλλικά στοιχεία.....	13
1.2.8 Φαινολικές ενώσεις - Φλαβονοειδή.....	13
1.3 Είδη μελιού.....	14
1.3.1 Πευκόμελο	14
1.3.2 Θυμαρίσιο.....	15
1.3.3 Πευκοθύμαρο.....	15
1.3.4 Μέλι ερείκης.....	17
1.3.5 Μέλι Manuka.....	17
1.4 Ευεργετικές ιδιότητες μελιού	19
1.4.1 Οφέλη στην υγεία	19
1.4.2 Αντιβακτηριακή δράση	21
1.4.3 Αντιοξειδωτική δράση.....	26
1.4.4 Αντιφλεγμονώδης δράση.....	28
1.4.5 Αντικαρκινική δράση	28
1.4.6 Αντιϊκή δράση	29
1.5 Βακτηριακά είδη	31
1.5.1 Staphylococcus aureus.....	31
1.5.2 Pseudomonas aeruginosa.....	32
1.5.3 Salmonella typhimurium	35
1.5.4 Klebsiella pneumonia	35
1.5.5 Citrobacter freundii.....	36
1.5.6 Acinetobacter baumannii.....	36
1.5.7 Streptococcus mutans	37

II. Σκοπός της εργαστηριακής μελέτης	38
III. Πειραματικό μέρος	39
3. Υλικά και μέθοδοι.....	39
3.1 Υλικά.....	39
3.1.1 Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν.....	39
3.1.2 Εργαστηριακά μηχανήματα και εξοπλισμός	40
3.1.3 Θρεπτικά.....	40
3.1.4 Καλλιέργειες βακτηριακών στελεχών έναντι των οποίων μετρήθηκε η αντιβακτηριακή δραστηριότητα των μελιών :.....	41
3.1.5 Δείγματα μελιών.....	41
3.1.6 Μέλι Mankuka.....	42
3.2 Μέθοδοι.....	43
3.2.1 Εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης δειγμάτων μελιού μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (minimum inhibitory concentration) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (microtiter plates).....	44
3.2.2 Εκτίμηση της βακτηριοκτόνου δράσης δειγμάτων μελιού μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (minimum bactericidal concentration) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (microtiter plates).....	47
3.2.3. Εκτίμηση των μηχανισμών της αντιμικροβιακής δράσης των μελιών μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (minimum inhibitory concentration) με την χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (microtiter plates) με την προσθήκη α) καταλάσης και β) πρωτεΐνάσης K.....	48
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	51
4.1 Εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης δειγμάτων μελιού μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) μαζί με της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC) με χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (microtiter plates).....	51
4.2 Εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης δειγμάτων μελιού μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) με χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (microtiter plates) μετά την προσθήκη α) καταλάσης και β) πρωτεΐνάσης K	56
V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ	59
VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	63

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μέλι έχει χρησιμοποιηθεί από τους ανθρώπους από την αρχαιότητα σχεδόν πριν από 5500 χρόνια, κυρίως για διατροφικούς αλλά και φαρμακευτικούς λόγους. Ο λόγος που καταναλώνεται όλα αυτά τα χρόνια είναι η υψηλή θρεπτική του αξία και η ευεργετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία, αφού φημίζεται για τις αντιβακτηριακές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές και αντιϊκές του ιδιότητες.

Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η αντιβακτηριακή δράση 12 κρητικών μελιών ποικίλης ανθικής και γεωγραφικής προέλευσης έναντι των νοσοκομειακών παθογόνων *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter baumannii* και *Streptococcus mutans*. Η αντιμικροβιακή δράση των συγκεκριμένων μελιών συγκρίθηκε με αυτή του μελιού Manuka, ένα μέλι που φημίζεται για τις υψηλές αντιβακτηριακές του ιδιότητες.

Ο έλεγχος και η μέτρηση της δράσης των δειγμάτων μελιού κατά των βακτηρίων συντελέστηκε μέσω της διαδικασίας του προσδιορισμού της ελάχιστης συγκέντρωσης MIC (minimum inhibitory concentration) η οποία είναι ικανή να αναστέλλει τη δράση των βακτηρίων αλλά και μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης συγκέντρωσης MBC (Minimum Bactericidal Concentration) κατά την οποία παρατηρήθηκε η ελάχιστη συγκέντρωση μελιού που οδηγεί σε καταστροφή των βακτηριακών κυττάρων.

Από τα αποτελέσματα, αποδείχθηκε ότι όλα τα εξεταζόμενα μέλια, κάποια σε μεγαλύτερη και κάποια σε μικρότερη συγκέντρωση, κατάφεραν να αναστείλουν την ανάπτυξη των υπό μελέτη βακτηρίων.

Κάποια από τα κρητικά μέλια που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία έχουν ισχυρή αντιβακτηριακή δράση έτσι ώστε πιθανόν να βρουν εφαρμογή στην βιομηχανία τροφίμων (φυσικά συντηρητικά) και την κλινική πρακτική.

ABSTRACT

The honey has been used by humans since the ancient times almost 5500 years ago, not only for its nutritional properties but also for its pharmaceutical. The reason why honey is being consumed all this years is its high nutritional values and its beneficial effects in human health, as it is famous for its antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer and anti-viral activities.

This present study examines the antibacterial activity of 12 Cretan honeys from various floral and geographical origins against the hospital bacteria *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter baumannii* and *Streptococcus mutans*. The antibacterial activity of these honeys was compared with that of Manuka honey, a honey that is famous for its high antibacterial activities.

The measurement of this antibacterial activity was done through MIC (minimum inhibitory concentration) finding the minimum possible concentration at which the respective bacterium is inhibited but also through the MBC (minimum bactericidal concentration) finding the minimum possible concentration at which the bacteria are killed.

The results showed that all of the honeys that were tested were able to inhibit the bacteria's growth, both in high and low concentration. It is worth mentioning that the honey's antibacterial action is not based solely on its properties but also on the characteristics of the bacteria that are examined each time.

Some of the Cretan honeys examined in this work have strong antibacterial activity so that they may find application in the food industry (natural preservatives) and clinical practice.

I. Εισαγωγή

1.1 Μέλι-Ορισμός

Κατά την Ευρωπαϊκή Κοινοτική Νομοθεσία 2001/110/EK του Συμβουλίου της Ευρώπης ο όρος «μέλι» αντιστοιχεί στη φυσική γλυκιά ουσία που παράγεται από τις μέλισσες του είδους *Apis mellifera* από το νέκταρ φυτών ή από εκκρίσεις ζώντων μερών φυτών, τα οποία αφού οι μέλισσες συλλέξουν, τα μετατρέπουν αναμειγνύοντάς τα με ειδικές ουσίες του σώματός τους. Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της απόθεσης, αφυδάτωσης και τέλος φύλαξης αυτών στις κηρήθρες της κυψέλης, με σκοπό την ωρίμανσή τους. Το μέλι ενώ δεν συγκαταλέγεται στα τρόφιμα, χαρακτηρίζεται ως φυσική γλυκιά ουσία και η ποιότητά του καθορίζεται κατά κύριο λόγο από τα αισθητηριακά, χημικά, φυσικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά του.

Το μέλι είναι το μοναδικό φυσικό προϊόν το οποίο προέρχεται από τα έντομα και περιέχει θρεπτικά συστατικά που αξιοποιούνται σε καλλυντικά, θεραπευτικά και βιομηχανικά προϊόντα (Θρασυβούλου et al. 2002).

Η παραγωγή του μελιού είναι μια εντυπωσιακά περίπλοκη διαδικασία που ολοκληρώνεται σε δύο στάδια. Αρχικά η διαδικασία αυτή ξεκινά όταν στον πρόλοβο της μέλισσας το νέκταρ μετατρέπεται σε μέλι μέσω της προσθήκης ενζύμων από τους σιελογόνους και τους υποφαρυγγικούς αδένες. Οι υποφαρυγγικοί αδένες είναι δυο λεπτοί και μακροί αγωγοί με πλήθος διακλαδώσεων και εντοπίζονται στο επάνω μέρος του κεφαλιού των μελισσών. Στη νεαρή εργάτρια που παράγει τον βασιλικό πολτό είναι περισσότερο ανεπτυγμένοι εν αντιθέσει με την εργάτρια μεγαλύτερης ηλικίας όπου εμφανίζονται συρρικνωμένοι παράγοντας το ένζυμο ιμπερτάση, που είναι απαραίτητο για τη μετατροπή του νέκταρος σε μέλι, αλλά και το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης, το οποίο μετατρέπει τη γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ.

Σε δεύτερη φάση λαμβάνει χώρα ο μεταβολισμός του φυτικού χυμού όταν αυτός γίνεται μέλι, κατά την οποία αποδομείται ο δισακχαρίτης σουκρόζη στα μονοσάκχαρα γλυκόζη και φρουκτόζη. Μεταβολισμός αρωματικών (τερπένια) και χρωστικών ουσιών του φυτικού χυμού δεν υφίσταται, ενώ το άρωμα των οργανικών οξέων που παράγονται μέσω της διάσπασης της γλυκόζης εμπλουτίζει το μέλι. Τέλος,

τα διάφορα μεταλλικά στοιχεία του πρωτογενούς φυτικού χυμού παραμένουν ίδια και στο τελικό προϊόν, το μέλι (Zander & Maurizio 1984, White 1993).

Τα σάκχαρα του νέκταρος αλλά και του μελιτώματος μεταβολίζονται εντός των κελιών των κρηθρών, από τη στιγμή αποθήκευσής τους. Το νέκταρ αυτό φθάνει σε φάση ωρίμανσης με ταυτόχρονη αποβολή της υγρασίας του, αφήνοντας μια περιεκτικότητα σε υγρασία περίπου 13-18% στο μέλι και δίνοντας τελικά το ώριμο προϊόν (Maddocks et al. ,2013).



Εικόνα 1.1.1 Συλλογή του νέκταρος και της γύρης από τη μέλισσα *Apis mellifera* (by Ivar Leidus)

1.2 Σύσταση μελιού

Το μέλι είναι ένα φυσικό προϊόν, το οποίο δεν μπορεί να δεχτεί κανενός είδους επεξεργασία (Zander & Maurizio 1984, White 1993). Αποτελεί ένα υπέρκορο διάλυμα σακχάρων και περιέχει τουλάχιστον 181 ουσίες, όπως σάκχαρα, νερό, πρωτεΐνες, αμινοξέα, οργανικά οξέα, βιταμίνες, μέταλλα καθώς και αρωματικές ουσίες (Alvarez-Suarez et al. 2010) ενώ παρουσιάζει υψηλή συγκέντρωση σε φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα που δρουν ως φυσικά αντιοξειδωτικά (Escuredo et al. 2014).

1.2.1 Σάκχαρα

Το μέλι αποτελείται κατά κύριο λόγο από υδατάνθρακες με ποσοστό 95-97% του ξηρού του βάρους. Οι μονοσακχαρίτες γλυκόζη και φρουκτόζη αποτελούν τα κύρια σάκχαρα του μελιού και γι' αυτό το λόγο αποδίδεται σε αυτά το μεγαλύτερο μέρος της θρεπτικής του αξίας (Samarghandian et al., 2017). Η σύνθεση του σακχάρου εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, οι βασικότεροι των οποίων είναι η βοτανική προέλευση του μελιού, η γεωγραφική προέλευση καθώς και το κλίμα αυτής, αλλά και η επεξεργασία και η αποθήκευση του μελιού (Tomnuk et al., 2013). Κριτήρια για την ταξινόμηση των μελιών αποτελούν η συγκέντρωση της γλυκόζης, της φρουκτόζης αλλά και η αναλογία μεταξύ τους. Όπως έχει παρατηρηθεί στην πλειονότητα των μελιών, η φρουκτόζη αποτελεί τον μεγαλύτερο κατά βάρος υδατάνθρακα, με εξαίρεση τα μέλια *Brassica napus* και *Taraxacum officinale*, όπου η γλυκόζη μπορεί να βρίσκεται σε υψηλότερα επίπεδα (Escuredo et al., 2014).

1.2.2 Νερό

Η περιεκτικότητα του νερού στο μέλι κυμαίνεται μεταξύ 13-25%, ωστόσο το βέλτιστο είναι περίπου 17% και συνδέεται με ποικίλα χαρακτηριστικά του, όπως είναι η βοτανική και γεωγραφική προέλευση του νέκταρός του, οι συνθήκες εδάφους και κλίματος, η εποχή συγκομιδής, ο βαθμός ωρίμανσης και η διαχείριση του προϊόντος από τους μελισσοκόμους σε όλα τα στάδιά του, από τη συγκομιδή έως και την αποθήκευσή του. Το νερό επηρεάζει τις διάφορες ιδιότητες των μελιών, όπως για παράδειγμα το χρώμα, την κρυστάλλωση τους, το ιξώδες, τη γεύση αλλά και την πυκνότητά τους (De-Melo et al., 2017).

1.2.3 Πρωτεΐνες

Τα επίπεδα συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που εντοπίζονται στο μέλι δεν είναι σταθερά, αλλά ποικίλει με βάση τα είδη των μελισσών. Πιο συγκεκριμένα, το μέλι που παράγεται από μέλισσες του είδους *Apis Cerana* παρουσιάζει περιεκτικότητα από 0,1% έως 3,3% σε πρωτεΐνη, ενώ το μέλι που παράγεται από το είδος των μελισσών *Apis Mellifera* εμφανίζει περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη που κυμαίνεται από 0,2% έως 1,6% (Won, Li, Kim & Rhee, 2009). Η παρουσία πρωτεϊνών στο μέλι αποδίδεται σε ουσίες που εκκρίνουν οι σιελογόνοι αδένες και ο φάρυγγας των μελισσών και σε

φυτικές πηγές (νέκταρ και γύρη) (Sak-Bosnar & Sakac, 2012). Η συνολική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη είναι δυνατόν επίσης να ληφθεί ως δείκτης για την διάκριση του μελιού από διαφορετικά είδη (Won, Li, Kim, & Rhee, 2009).

1.2.4 Αμινοξέα

Το 1% των συστατικών του μελιού αποτελείται από αμινοξέα των οποίων οι αναλογίες σχετίζονται τόσο με τη βοτανική όσο και με τη γεωγραφική του εκάστοτε μελιού. Στο μέλι όπως επίσης και στη γύρη, η προλίνη είναι το αμινοξύ που συναντάται πιο συχνά (Iglesias et al., 2006). Πέραν της προλίνης, υπάρχουν και κάποια άλλα αμινοξέα τα οποία εντοπίζονται στο μέλι όπως για παράδειγμα το γλουταμικό και το ασπαρτικό οξύ, η γλουταμίνη αλλά και η ιστιδίνη (Girolamo, D'amato & Righetti, 2012).

1.2.5 Οργανικά οξέα

Είναι γενικό χαρακτηριστικό των μελιών να παρουσιάζουν μία χαμηλού βαθμού οξύτητα (Karabagias et al., 2014). Η όξινη ιδιότητα του μελιού οφείλεται στην παρουσία οργανικών οξέων προερχόμενων από σάκχαρα ή από ένζυμα που εκκρίνουν οι μέλισσες όταν μετατρέπουν το νέκταρ σε μέλι και συναντώνται σε περιεκτικότητα 0,57% (Mato et al., 2006). Τα οργανικά οξέα συμβάλλουν στην χαρακτηριστική γεύση και χρώμα του μελιού. Το κύριο οργανικό οξύ που παρατηρείται στο μέλι είναι το γλυκονικό οξύ και είναι προϊόν οξειδωσης της γλυκόζης, ενώ παράλληλα έχουν βρεθεί μικρές ποσότητες ασπαρτικού οξέος, βουτυρικού, κιτρικού, οξικού, μυρμηκικού, φουμαρικού (Samarghandian S., Farkhondeh T., Samini F., April-June 2017), (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013). Επιπρόσθετα, τα οργανικά οξέα αποτελούν κριτήριο διάκρισης των μελιών σύμφωνα πάντα με τη γεωγραφική και βοτανική τους προέλευση (Mato et al., 2006).

1.2.6 Βιταμίνες

Το ποσοστό των βιταμινών στο μέλι δεν είναι υψηλό και επομένως δεν πλησιάζει τη συνιστάμενη ημερήσια πρόσληψη. Στο μέλι εντοπίζονται βιταμίνες όπως για παράδειγμα η θειαμίνη (B1), η ριβοφλαβίνη (B2), η νιασίνη (B3), το παντοθενικό οξύ (B5), η πυριδοξίνη (B6), η βιοτίνη (B8), το φυλλικό οξύ (B9) καθώς και η βιταμίνη C, με την τελευταία να είναι η πιο συχνή (Samarghandian S., Farkhondeh T., Samini F.,

April-June 2017). Η βιταμίνη C εντοπίζεται στους περισσότερους τύπους μελιού και χαρακτηρίζεται ως επί το πλείστον για την έντονη αντιοξειδωτική δράση της (León-Ruiz et al. 2012).

1.2.7 Μεταλλικά στοιχεία

Τα μεταλλικά στοιχεία στο μέλι συναντώνται σε συγκέντρωση που κυμαίνεται μεταξύ 0,04% και 0,2% στο ανοιχτόχρωμο και στο σκουρόχρωμο μέλι αντίστοιχα. Περίπου 31 μέταλλα έχουν παρατηρηθεί στο μέλι, συμπεριλαμβανομένων του φωσφόρου, του νατρίου, του ασβεστίου του θείου, του μαγνησίου, του χλωρίου και του καλίου, το οποίο είναι και το πιο άφθονο (Samarghandian S., Farkhondeh T., Samini F., April-June 2017) (Alqarni et al., 2012). Τα μεταλλικά στοιχεία, σε αντίθεση με τις βιταμίνες και τα αμινοξέα, δεν αποικοδομούνται κατά την έκθεση τους σε θερμότητα, φως, οξειδωτικούς παράγοντες και ακραίο pH και αυτό γιατί τα μέταλλα αποτελούν συμπαράγοντες των ενζύμων σε πολλές μεταβολικές διεργασίες. Επομένως, είναι απαραίτητη για τον άνθρωπο η πρόσληψή τους μέσω της διατροφής (Pohl & Jamroz, 2012).

1.2.8 Φαινολικές ενώσεις - Φλαβονοειδή

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι η δομή τους αποτελείται από δακτυλίους βενζολίου με μία ή και περισσότερες από μία υδροξυλομάδες. Στις φαινολικές ενώσεις κατατάσσονται τα απλά και σύνθετα φλαβονοειδή, οι ανθοκυανίνες και τα φαινολικά οξέα (Lin et al., 2016). Οι φαινολικές ενώσεις και περισσότερο τα φλαβονοειδή είναι το κυριότερο υλικό της σύστασης του μελιού. Τα φαινολικά συμμετέχουν ικανοποιητικά στην αντιοξειδωτική δράση του μελιού, με αποτέλεσμα ο ανθρώπινος οργανισμός να ωφελείται σημαντικά με την κατανάλωσή του (Alvarez-Suarez et al., 2012). Και φυσικά η βοτανική καθώς και η γεωγραφική προέλευση του μελιού επηρεάζουν καθοριστικά τη χημική ποικιλότητα των φαινολών (Miguel et al., 2017).

Οι φαινολικές ενώσεις, ομάδα με περίπου 10.000 ενώσεις, αποτελούν μια χημικά ετερογενή ομάδα. Οι ενώσεις αυτές κατατάσσονται σε κατηγορίες ανάλογα με την κύρια χημική δομή τους. Διακρίνονται σε μη φλαβονοειδή και φλαβονοειδή. Από τις φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στο μέλι οι συνηθέστερες είναι τα φλαβονοειδή

(Cortes et al., 2011), τα οποία με την παρουσία τους μέσα στο μέλι καθορίζουν το χρώμα τη γεύση και το άρωμα που έχει αυτό (Alzahrani et al., 2012).

1.3 Είδη μελιού

Αναλόγως την πηγή από την οποία προέρχεται το μέλι, μπορεί να κατηγοριοποιηθεί στο μέλι ανθέων, γνωστό και ως μέλι νέκταρος, που προέρχεται μέσω του νέκταρος των φυτών και το μέλι μελιτώματος που παράγεται μέσω εκκρίσεων των εντόμων τα οποία τρέφονται από φυτά, καθώς και από το χυμό αυτών (Castro-Vázquez et al., 2006). Το μέλι, επιπρόσθετα, μπορεί να κατηγοριοποιηθεί λαμβάνοντας υπόψη και την ποσότητα και την ποικιλομορφία των φυτών από τα οποία προήλθε. Όταν το μέλι προέρχεται από περισσότερες από μία πηγές, τότε χαρακτηρίζεται ως πολυανθικό (π.χ. μέλι δάσους). Αντίθετα, όταν οι μέλισσες τρέφονται μόνο από ένα είδος φυτού, το μέλι ανήκει στην μονοανθική κατηγορία και ονομάζεται με βάση το φυτό από το οποίο προέρχεται (Alvarez – Suarez et al., 2014). Έτσι, ανάλογα με το νέκταρ του κάθε φυτού, κάθε τύπος μονοανθικού μελιού διαθέτει κάποιες χαρακτηριστικές ιδιότητες που αναλύονται παρακάτω.

1.3.1 Πευκόμελο

Το πευκόμελο προέρχεται από το χυμό που παράγουν τα πεύκα και τα μεταλλικά στοιχεία που εντοπίζονται σ' αυτό παρουσιάζουν υψηλή περιεκτικότητα. Το πευκόμελο λαμβάνεται μέσω του μελιτώματος που συλλέγεται και εκκρίνεται από το έντομο *Marchalina* και του χυμού των πεύκων που ανήκουν στα είδη *Pinus brutia Ten* και *Pinus halepensis Mill*, από μέλισσες. Η Τουρκία και η Ελλάδα είναι οι σημαντικότερες χώρες παραγωγής πευκόμελου στον κόσμο με την παραγωγή στην Ελλάδα να ανέρχεται σχεδόν στο 65% της ετήσιας παραγωγής μελιού (Θρασυβούλου et al., 2002). Συγκριτικά με τα μέλια των ανθέων, το πευκόμελο είναι πλούσιο σε μεταλλικά στοιχεία, ενώ διαθέτει το υψηλότερο ποσοστό φαινολικών ενώσεων, μετάλλων, αμινοξέων, οξέων και πρωτεϊνών. Σχετικά με τα φυσικά χαρακτηριστικά του μελιού, η υφή του είναι αρκετά παχύρρευστη με κεχριμπαρένιο χρώμα, ενώ η κρυστάλλωσή του

πραγματοποιείται με σχετικά βραδύ ρυθμό κάτι που οφείλεται στη χαμηλή περιεκτικότητά του μελιού σε γλυκόζη (Eraslan et al., 2010).

1.3.2 Θυμαρίσιο

Το θυμαρίσιο μέλι προέρχεται από τα φυτά *Thymus* και το συναντάμε στη Νέα Ζηλανδία και σε χώρες τις Μεσογείου (Eleftheriou et al., 2009). Ανθίζει συνήθως σε βραχώδεις και ξηρές περιοχές και στην Ελλάδα το βρίσκουμε κυρίως στις ηπειρωτικές περιοχές και στα νησιά. Καταλαμβάνει το 10% της ετήσιας παραγωγής στη χώρα και ξεχωρίζει λόγω της εξαιρετικής ποιότητάς του, της γεύσης, του χρώματος και του αρώματός του. Όταν βρίσκεται σε ρευστή μορφή, το χρώμα του είναι κεχριμπαρένιο, ενώ αλλάζει σε ανοιχτό καφέ σε περίπτωση κρυστάλλωσης, γεγονός που μπορεί να συμβεί σε χρονική περίοδο από 6 μέχρι και 18 μήνες (Θρασυβούλου και συν., 2002). Τα είδη θυμαριού φτάνουν τα 350, αλλά αξιοσημείωτα στην παραγωγή θυμαρόμελου είναι αυτό του *T. Vulgaris*, το *T. Capitatus* και το *T. Serpyllum*.

1.3.3 Πευκοθύμαρο

Το Πευκοθυμαρόμελο Κρήτης είναι ένα προϊόν το οποίο παίρνουμε μετά την ανάμιξη, με φυσικό τρόπο, θυμαρίσιου μελιού μαζί με πευκόμελο, και την ιδιαίτερη διαχείριση των υλικών αυτών από τους Κρητικούς μελισσοκόμους ή και τη συνύπαρξη στον ίδιο χώρο θυμαριών -όψιμα ανθισμένων- του είδους *Coridothymus capitatus*- με τις μελιτοεκκρίσεις του εντόμου *Marchalina hellenica*, που ζει παρασιτικά στην τραχεία πεύκη (*Pinus brutia Ten*) και χαλέπιο πεύκη (*Pinus halepensis Mill*). Εξετάζοντας την εξωτερική όψη του Πευκοθυμαρόμελου και συγκρίνοντάς την με αυτήν του θυμαρίσιου μελιού, παρατηρούμε ότι από το πρώτο απουσιάζει το χρώμα, η διαύγεια και η λαμπερότητα του δευτέρου, ενώ απουσιάζει ακόμα η «θολότητα» που έχει το πευκόμελο, αλλά βλέπουμε έναν ενδιάμεσο χρωματισμό. Χαρακτηριστικά όπως είναι η χρονική διάρκεια της γεύσης, η ένταση, τα επίπεδα γλυκύτητας και η σταθερότητα στο άρωμα του Πευκοθυμαρόμελου κυμαίνονται σε μέτρια επίπεδα. Το άρωμά του προκύπτει από τη συμπύκνωση αρωμάτων λουλουδιών, με το άρωμα ασθενούς ξύλου και ρητίνης ενώ η οσμή του ,η

οποία έχει μέτρια ένταση, μας παραπέμπει σε φρούτα και κεριά. Μετά από σύγκριση με το πευκόμελο, εντοπίζουμε υψηλότερα επίπεδα οξύτητας, διάρκειας γεύσης και πιο έντονο άρωμα λουλουδιών, ενώ είναι πιο ασθενές το άρωμα ξύλου και ρητίνης. Το Πευκοθυμαρόμελο, είναι προϊόν ενδιάμεσης κατάστασης μεταξύ θυμαρίσιου μελιού και πευκόμελου και διατηρείται σε ρευστή κατάσταση τουλάχιστο για 12 μήνες από την ημέρα που θα συλλεχθεί.

Αναφορικά με τη μέθοδο παραγωγής, την περίοδο Ιουνίου-Αυγούστου το μεγαλύτερο μέρος από τα μελίσσια στην Κρήτη μετακινείται στους λεγόμενους «θυμαρότοπους», και πιο συγκεκριμένα σε περιοχές όπως είναι το Νότιο και Βόρειο Ρέθυμνο, η Χώρα Σφακίων, ο Ψηλορείτης, τα Λευκά Όρη, ο Ομαλός, το Ακρωτήρι Ν. Λασιθίου, η Ιεράπετρα, η Σητεία και άλλες περιοχές. Στον πρώτο τρύγο από τα μελίσσια καθώς έχουμε ανάμιξη του θυμαρίσιου μελιού και του πευκόμελου, το παραγόμενο μέλι είναι γνωστό ως Πευκοθυμαρόμελο (pefkothymaromelo) ενώ από το δεύτερο τρύγο συλλέγεται το καθαρό πευκόμελο. Πευκοθυμαρόμελο, Η συλλογή του μελιού αυτού γίνεται ακόμα και σε πολλά μέρη της Κρήτης (Βορίζια, Γέργερη, Σελάκανο, Ανάπολη κ.ά.) όπου το όψιμο θυμάρι ανθίζει συγχρόνως με τις μελιτώδεις εκκρίσεις του πεύκου έτσι ώστε οι μέλισσες να συλλέγουν παράλληλα μελιτώδεις εκκρίσεις του *M. Hellenica* μαζί με νέκταρ από θυμάρι. Οι μελισσοκόμοι κατά τη διαδικασία απομάκρυνσης του μελιού τρυγούν τις κηρήθρες καπνίζοντας προσεκτικά τις μέλισσες. Το μέλι έπειτα εξάγεται με τη διαδικασία της φυγοκέντρισης με χειροκίνητο ή ηλεκτρικό μελιτοεξαγωγέα. Το μέλι αποκτά διαύγεια σε δεξαμενές καθίζησης και μετά ο αφρός αφαιρείται με σχολαστικότητα ενώ, στη συνέχεια, τα δοχεία πληρώνονται εντελώς ώστε να μη μείνει αέρας στο ενδιάμεσο κενό. Το μέλι δε θερμαίνεται σε κανένα από τα στάδια εξαγωγής ή επεξεργασίας του σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 45°C.

Τον Σεπτέμβριο του 2017 το Πευκοθυμαρόμελο Κρήτης (Pefkothymaromelo Kritis) εντάχθηκε στα προϊόντα στον κατάλογο των προστατευόμενων ονομασιών προέλευσης και προστατευόμενων γεωγραφικών ενδείξεων της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΠΟΠ/ΠΓΕ) προϊόντων της χώρας μας. Το Πευκοθυμαρόμελο Κρήτης έγινε το δεύτερο ελληνικό μέλι που έχει αναγνωρισθεί, ενώ το πρώτο είναι το Μέλι Ελάτης Μαινάλου Βανίλια ΠΟΠ (Παστρομάς, 2017).

1.3.4 Μέλι ερείκης

Το μέλι ερείκης χωρίζεται σε τέσσερις διαφορετικούς τύπους προερχόμενοι από το νέκταρ το οποίο εκκρίνεται από τέσσερα φυτά τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των Ερεικωδών και υπάρχουν διάσπαρτα σε αρκετές περιοχές της Ελλάδας. Εκτός από τη φθινοπωρινή και ανοιξιάτικη ερείκη (*Erica verticallata* και *Erica aborea* αντίστοιχα), υπάρχουν και τα φυτά της Κουμαριάς (*Arbutus unedo*) και το Ροδόδεντρο (*Rhododendron*). Το χρώμα του μελιού από ερείκη είναι κοκκινωπό και έχει ιδιαίτερη γεύση και οσμή, ενώ χαρακτηριστικό του αποτελεί η υψηλή περιεκτικότητά του σε γλυκόζη, με το ανοιξιάτικο ερεικόμελο να έρχεται πρώτο, με αποτέλεσμα η κρυστάλλωσή του να πραγματοποιείται σε έναν έως και τρεις μήνες. (Θρασυβούλου et al., 2002). Τέλος, το ερεικόμελο είναι ευεπίφορο σε ζύμωση λόγω της αυξημένης υγρασίας και περιεκτικότητας σε ζαχαρομύκητες, παράγοντες στους οποίους οφείλει την τάση του να ξινίζει αρκετά εύκολα (Θρασυβούλου et al., 2002).

1.3.5 Μέλι Manuka

Το μέλι Manuka, γνωστό για τις ευεργετικές του ιδιότητες, προέρχεται από ένα ενδογενές φυτό της Νέας Ζηλανδίας και της Ανατολικής Αυστραλίας, με όνομα Manuka ή *Leptospermum scoparium*, που ανήκει στην οικογένεια *Myrtaceae*. Για αρκετούς αιώνες η χρήση του μελιού Manuka στην παραδοσιακή ιατρική αφορούσε τις αντιβιοτικές, θεραπευτικές και αντιβακτηριακές του ιδιότητες (Carnwath et al. 2014). Τα άσπρα, ροζ και κόκκινα άνθη του φυτού αυτού παράγουν νέκταρ από το οποίο τρέφονται οι μέλισσες *Apis mellifera*. Όπως και όλα τα μέλια έτσι και το μέλι Manuka είναι πλούσιο σε μέταλλα, λιπαρά οξέα, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, ενώσεις φαινολυκών και φλαβονοειδών (Alvarez- Suarez et al., 2014).

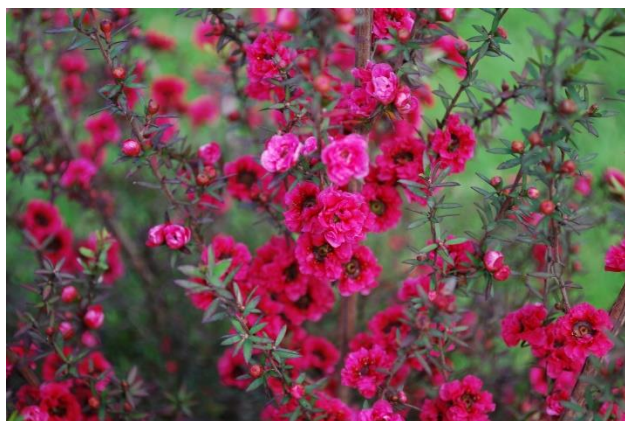
Το συγκεκριμένο μέλι οφείλει τις θεραπευτικές του ιδιότητες στις φυτοχημικές ενώσεις που περιέχει. Η βασική ένωση στην οποία οφείλει τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες το μέλι Manuka είναι η μεθυλγλυοξάλη (MGO), μια μορφή αλδεΐδης του πυροσταφυλικού οξέος, που συνήθως γίνεται αναφορά σ' αυτήν ως «μοναδικός παράγοντας του Manuka» (unique manuka factor ή UMF). Η μονάδα μέτρησης UMF έχει την ικανότητα να κατηγοριοποιήσει το μέλι με κριτήριο τη δράση του κατά των βακτηρίων (Anthimidou and Mossialos 2012), ενώ η τιμή UMF προκύπτει αν συνδυαστούν τιμές κάποιων δεικτών που παρατηρούνται στο μέλι Manuka. Ένας από

τους δείκτες είναι η περιεκτικότητα του μελιού σε φαινολικές ενώσεις. Στην συγκεκριμένη περίπτωση ο UMF αντανακλά την ισοδύναμη συγκέντρωση φαινόλης (% w/v) που απαιτείται για να πετύχει παρόμοια αντιβακτηριακή δράση αυτή του μελιού (Johnston et al., 2018). Για παράδειγμα, ένα μέλι Manuka με τιμή UMF 18 έχει όμοια δραστηριότητα με ένα διάλυμα 18% φαινόλης. Το μέλι Manuka που προορίζεται να έχει κλινική χρήση είναι απαραίτητο να έχει τιμή UMF τουλάχιστον 10 έτσι ώστε να έχει αντιβακτηριακή δράση (Maddocks S. E., Jenkins R. E. , November 2013).

Εκτός από τον UMF, ένας επιπλέον δείκτης με πολλά πλεονεκτήματα είναι και η λεπτοσπερίνη. Η λεπτοσπερίνη είναι εξαιρετικά σταθερή και αντίθετα με τη MGO και παραμένει αμετάβλητη κατά τη διάρκεια αποθήκευσής της (Kato et al., 2014).

Η τελική τιμή UMF είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού των επιπέδων των παραπάνω δεικτών ενώ απαραίτητη είναι η παρουσία όλων τους για να λάβει τον χαρακτηρισμό «Μέλι Manuka». Μια υψηλή τιμή UMF δηλώνει ότι οι ευεργετικές ιδιότητες του μελιού Manuka βρίσκονται στο ανάλογο επίπεδο.

Παρά τα τόσα ευεργετικά αποτελέσματα του Manuka, έχουν γεννηθεί και ορισμένοι προβληματισμοί που αφορούν τη χρήση του. Η μεθυλγλυοξάλη, η οποία όπως ήδη αναφέρθηκε, ευθύνεται για τη δράση του κατά των βακτηρίων, είναι και πρόδρομο μόριο για την παραγωγή προϊόντων τελικής γλυκοζυλίωσης (Advanced Glycation End-Products, AGEs) που παρουσιάζουν σημαντική οξειδωτική δράση. Επομένως, η μεθυλγλυοξάλη, σε συνδυασμό με τα παράγωγα στοιχεία της, είναι πιθανό να μπορούν να προκαλέσουν αρνητικά αποτελέσματα κατά κύριο λόγο σε διαβητικά άτομα (Patel & Cichello, 2013).



Εικόνα 1.3.5.1 *Leptospermum scoparium*

1.4 Ευεργετικές ιδιότητες μελιού

Η θεραπευτική χρήση του μελιού για την καταπολέμηση πολλών ασθενειών ανάγεται στην αρχαία εποχή (Ahmed et al., 2018) αφού η αξία του απαντάται σε αρκετά κείμενα της αρχαίας ελληνικής γραμματείας όπως για παράδειγμα στα έπη του Ομήρου καθώς και στα έργα του Αριστοτέλη και του Πλάτωνα (Israili, 2014).

Αν και οι σχετικές με το φυσικό αυτό προϊόν έρευνες προβάλλουν τις ευεργετικές του ιδιότητες, ως φαρμάκου, για τον ανθρώπινο οργανισμό εντούτοις δηλώνεται ότι η χρήση του για θεραπευτικούς σκοπούς προϋποθέτει εξονυχιστικό έλεγχο προκειμένου το μέλι που θα χρησιμοποιηθεί να είναι και ασφαλές. Το μέλι που προέρχεται απευθείας από μελισσοκόμους ή από τα καταστήματα είναι πιθανό να είναι ακατάλληλο για χρήση στην ιατρική και ορισμένες φορές να είναι ακόμα και επικίνδυνο. Η επικινδυνότητα του προϊόντος συνδέεται με την ύπαρξη τοξικών ουσιών ως αποτέλεσμα του ψεκάσμου των φυτών από τα οποία συλλέγεται με ζιζανιοκτόνα φάρμακα ή μόλυνσης από τη χρήση βαρέων μετάλλων και αντιβιοτικών. Αναλυτικότερα, για να χαρακτηριστεί ένα μέλι ως ασφαλές προϊόν, ικανό να χρησιμοποιηθεί σε κάποια θεραπεία, πρέπει να διακρίνεται από τα εξής γνωρίσματα:

1. να είναι βιολογικό, απαλλαγμένο από μολυσματικούς παράγοντες και μη τοξικό
2. να έχει υποστεί αποστείρωση με ακτινοβολία γ σε ελεγχόμενες συνθήκες και να είναι απαλλαγμένο από μικροοργανισμούς
3. να είναι ικανό να εφαρμοστεί σε θεραπείες
4. να έχει ακολουθήσει με αυστηρότητα συγκεκριμένους κανονισμούς για τον τρόπο παραγωγής και τις συνθήκες αποθήκευσης
5. να είναι συμβατό με τα φυσικοχημικά κριτήρια τα οποία είναι απαραίτητα για τη χρήση του μελιού στη θεραπεία πληγών (Hermanns et al., 2019).

1.4.1 Οφέλη στην υγεία

Την ευεργετική επίδραση του μελιού στην υγεία επιβεβαιώνει η δράση του σε προβλήματα που σχετίζονται με:

- **Καρδιά – Κυκλοφορικό**

Άτομα που πάσχουν από καρδιακές διαταραχές μετά από μακροχρόνια κατανάλωση μελιού βλέπουν την κατάστασή τους να βελτιώνεται αφού τα σάκχαρα του μελιού, και κυρίως η γλυκόζη βοηθούν στη λειτουργία της καρδιάς συνδράμοντας στις συστολές του καρδιακού μυ αλλά και αποτελώντας πηγή ενέργειας γι' αυτήν. Παράλληλα το μέλι, σε συνδυασμό με τη συνδρομή των σακχάρων του αλλά και της ακετυλοχολίνης, συμβάλλει στη διαστολή των αγγείων και στη μείωση της υπέρτασης (Alvarez-Suarez et al. 2010).

- **Παθήσεις στομάχου και εντέρου**

Η αλκαλικότητα του μελιού, λόγω των μεταλλικών αλάτων που περιέχονται σε αυτό, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της οξύτητας στο περιβάλλον του στομάχου. Επιπλέον το μέλι είναι ένας ισχυρός αναστολέας του βακτηρίου *Helicobacter pylori*, το οποίο έχει τη ικανότητα πρόκλησης πεπτικών ελκών και γαστρίτιδας ενώ επίσης μειώνει τη χρονική διάρκεια της διάρροιας σε άτομα που πάσχουν από βακτηριακή γαστρεντερίτιδα. Παράλληλα, λειτουργεί και ως φυσικό καθαρτικό καθώς καταπολεμά τη δυσκοιλιότητα λόγω των υψηλών επιπέδων χολίνης που περιέχει. Τέλος οι ολιγοσακχαρίτες που περιέχονται στο μέλι έχουν προβιοτική δράση, αυξάνοντας τα *Bifidobacteria* και τους γαλακτοβάκιλλους, και επομένως υποβοηθούν την ανθρώπινη πέψη.

- **Ήπαρ**

Το ήπαρ αποτελεί το ανθρώπινο όργανο όπου γίνεται η σύνθεση χρήσιμων ουσιών και αποικοδομούνται ουσίες που έχουν βλαπτικό ρόλο για τον ανθρώπινο οργανισμό, όπως οι τοξίνες. Με την κατανάλωση μελιού, η γλυκόζη που περιέχει συμπληρώνει τις εφεδρείες του γλυκογόνου του ήπατος. Η παρουσία γλυκογόνου αυξάνει την αντίσταση του οργανισμού στις μολύνσεις.

- **Νεφρά**

Το μέλι εμπεριέχει πρωτεΐνη και αλάτι σε μικρή ποσότητα, ουσίες οι οποίες είναι απαγορευτικές σε όσους πάσχουν από παθήσεις νεφρών. Βοηθάει ακόμη στον

γρηγορότερο μεταβολισμό του οινοπνεύματος, με αποτέλεσμα την ταχύτερη έξοδο από κατάσταση μέθης, και ιδιαίτερα όταν συνδυάζεται με χυμό λεμονιού.

- **Ανάπτυξη μικροοργανισμών**

Είναι σημαντικός ο ρόλος του μελιού ως προς τον έλεγχο της ανάπτυξης ποικίλων μικροοργανισμών που προκαλούν ασθένειες ή μολύνσεις αλλά και τη θεραπεία που ακολουθείται σε πολλά προβλήματα που απειλούν την υγεία του ανθρώπου (Alvarez-Suarez et al. 2010).

1.4.2 Αντιβακτηριακή δράση

Οι παράγοντες με αντιμικροβιακή δράση είναι απαραίτητοι για την αντιμετώπιση μολυσματικών ασθενειών. Ωστόσο, η ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων μειώνει την αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών και αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ασθενειών που οφείλονται στην παρουσία βακτηρίων. Ως αποτέλεσμα, είναι επιτακτική η ανάγκη εύρεσης εναλλακτικών θεραπειών. Γι' αυτό σήμερα επανεκτιμώνται αρχαία φάρμακα, όπως για παράδειγμα φυτά, αλλά και προϊόντα που σχετίζονται με αυτά, όπως είναι το μέλι. Το μέλι παρουσιάζει εξαιρετική βακτηριοστατική αλλά και βακτηριοκτόνο δράση απέναντι σε πολλά παθογόνα βακτήρια του ανθρώπου, κυρίως βακτηρίων θετικών κατά Gram (Dzugan et al. ,2018). Ειδικότερα, για το μέλι με προέλευση από το φυτό *Leptospermum scoparium*, γνωστό με την ονομασία Manuka, έχει διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητά του έναντι πολλών παθογόνων για τον άνθρωπο βακτηρίων. Το μέλι επειδή δεν είναι βιομηχανικό προϊόν αλλά φυσικό η χημική σύστασή του διαφέρει ανάλογα με τη γεωγραφική και βοτανική του προέλευση. Συνεπώς, τα μέλια διαφέρουν ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση. Όσα εμφανίζουν χαμηλή συγκέντρωση σε φαινολικές ουσίες καθυστερούν την ανάπτυξη των μικροβίων, ενώ όσα έχουν υψηλή συγκέντρωση των συστατικών αυτών διαδραματίζουν ενεργό ρόλο στην καταστροφή των μικροβίων (Gomez-Caravaca et al 2006).

Αν και ο αντιβακτηριακός μηχανισμός του μελιού βρίσκεται ακόμη υπό μελέτη (Vica et al. 2014) η ίδια η αντιβακτηριακή δράση του δεν αμφισβητείται και έχει αναγνωριστεί εδώ και χρόνια ενώ πειράματα στο μέλι Manuka επιβεβαιώνουν την

απουσία ανθεκτικότητας των βακτηρίων στο μέλι (Blair et al., 2009, Cooper et al., 2010). Οι βακτηριοκτόνες ιδιότητες του μελιού έχει φανεί πως πιθανόν οφείλονται στην αποικοδόμηση του DNA, στην αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και στην καταστροφή δομικών στοιχείων των βακτηρίων, κάτι που επιφέρει αλλαγές στο σχήμα και στην επιφάνειά τους. Ακόμη, τα μονοανθικά μέλια έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν τα βακτήρια ώστε να προσδεθούν σε ιστούς, κάτι που αποτελεί προϋπόθεση για τη δημιουργία μόλυνσης, και εμποδίζουν επιπλέον το σχηματισμό biofilm (Israili, 2014). Η δημιουργία biofilm, δηλαδή η ισχυρή προσκόλληση βακτηρίων μεταξύ τους η οποία επιτυγχάνεται με την έκκριση διαφόρων ουσιών, αποτελεί έναν άξιο λόγου μηχανισμό ο οποίος στηρίζει τη μολυσματική ικανότητα των βακτηρίων, αφού συχνά τα βακτήρια που το συνθέτουν επιδεικνύουν ανθεκτικότητα στην αντιβιοτική δράση, με αποτέλεσμα την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης χρόνιων μολύνσεων. Το μέλι όμως έχει δείξει πως μπορεί να λύσει τη συνέχεια του biofilm με διάφορους τρόπους:

α) Η συγκέντρωση του μελιού σε γλυκόζη και φρουκτόζη κινείται σε υψηλά επίπεδα και η παρεμβολή των ουσιών αυτών μεταξύ των βακτηρίων, εμποδίζει την προσκόλληση των κυττάρων, όπως επιβεβαιώνουν σχετικές μελέτες στην *P. aeruginosa* (Lerrer et al., 2007)

β) Στον *Staphylococcus pyogenes* η προσκόλληση των κυττάρων για τη δημιουργία biofilm σε ένα τραύμα γίνεται εφικτή μέσω της σύνδεσης δύο συγκολλητινών (Sof και SfbI) στην φμπρονεκτίνη, μια εξωκυτταρική γλυκοπρωτεΐνη που δίνει τη δυνατότητα προσκόλλησης των βακτηρίων στα κύτταρα του τραύματος του ξενιστή. Αυτή η σύνδεση μπορεί να αναχαιτιστεί από τα υψηλά επίπεδα MGO του Manuka, που δύνανται να περιορίσουν την έκφραση των συγκολλητινών (Maddocks et al., 2012)

γ) Η MGO έχει την ικανότητα άμεσα να παρεμβάλλεται στο biofilm και να συμβάλλει στο θάνατο των βακτηρίων που το σχηματίζουν, κάτι που συμβαίνει σε βακτήρια όπως το *Proteus mirabilis* και το *Enterobacter cloacae* (Majtan et al., 2013).

Έχει διαπιστωθεί ότι συγκεντρώσεις Manuka 0,5% w/v, οι οποίες είναι συγκεντρώσεις πολύ χαμηλότερες από το επίπεδο της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης του (MIC), μπορούσαν να αναστείλουν το σχηματισμό biofilm (Maddocks et al., 2013). Ένας επιπλέον μηχανισμός ο οποίος επηρεάζεται από τη δράση του μελιού είναι η αίσθηση μεγέθους πληθυσμού (Quorum sensing), όπως έχει αποδειχθεί μέσω

πειραμάτων με το μέλι Manuka στο βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* (Kronka et al., 2013).

Ως αίσθηση μεγέθους πληθυσμού χαρακτηρίζεται η δυνατότητα των βακτηρίων να ενεργοποιούν τη ρύθμιση των γονιδίων τους σύμφωνα με την πυκνότητα του βακτηριακού πληθυσμού στον οποίο ανήκουν. Τα σιδηροφόρα είναι μια ομάδα παραγόντων μολυσματικότητας, η έκφραση των οποίων ρυθμίζεται από τον παραπάνω μηχανισμό. Τα μόρια αυτά στην *P. aeruginosa* είναι η πυοβερδίνη και η πυοχελίνη οι οποίες δίνουν στο παθογόνο την δυνατότητα να συσσωρεύει σίδηρο από το περιβάλλον του, γεγονός που σχετίζεται άμεσα με την παθογένεια του. Έχει αποδειχθεί ότι το μέλι Manuka μπορεί να ελαττώνει την έκφραση των γονιδίων τα οποία εξαρτώνται από την «αίσθηση μεγέθους πληθυσμού» καταλήγοντας έτσι στη μείωση της έκφρασης σιδηροφόρων και συνεπώς μειώνοντας τη μολυσματικότητα του βακτηριακού στελέχους (Wang et al., 2012).

Συμπερασματικά, το μέλι έχει τη δυνατότητα να λειτουργεί και ως βακτηριοκτόνο αλλά και ως βακτηριοστατικό μέσω της αναστολής διαφόρων μηχανισμών του βακτηρίου. Συνεπώς, και λαμβάνοντας υπόψη τη δυσκολία αντιμετώπισης συγκεκριμένων βακτηριακών μολύνσεων, το μέλι είναι πιθανό να χορηγηθεί μελλοντικά για την αντιμετώπιση ασθενειών που οφείλονται σε βακτήρια σε συνδυασμό πάντα με αντιβιοτικά (Maddocks et al., 2013). Αυτό αποτελεί ένα σημαντικό πλεονέκτημα έναντι των αντιβιοτικών, τα οποία στις περισσότερες των περιπτώσεων στοχεύουν σε ένα συγκεκριμένο μηχανισμό του παθογόνου, όπως για παράδειγμα η αντιγραφή, η μετάφραση αλλά και η σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Κατά συνέπεια, η πίεση που πιθανώς ασκεί το μέλι είναι τόσο ισχυρή έτσι ώστε να μην υπάρχει το περιθώριο εμφάνισης ανθεκτικότητας σε αυτό (Maddocks et al., 2013).

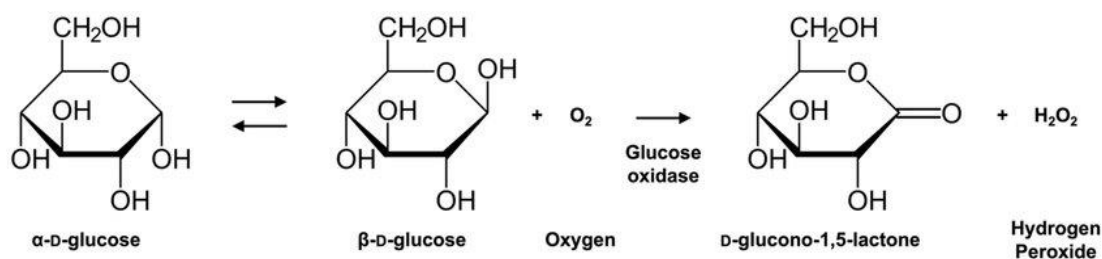
Στην αντιβακτηριακή δράση του μελιού συμβάλλει επίσης και η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων στο μέλι. Το μέλι ουσιαστικά είναι ένα υπέρκορο υδατικό διάλυμα σακχάρων, γεγονός που υποδηλώνει ότι σε αυτό περιέχονται σάκχαρα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από τη συγκέντρωση σακχάρων που μπορεί να υπάρχει στην υγρή φάση του. Η μειωμένη περιεκτικότητα του μελιού σε νερό αναστέλλει την ανάπτυξη πολλών βακτηρίων καθώς και μυκήτων ενώ η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων αυξάνει την οσμωτική πίεση με αποτέλεσμα τη μεταφορά νερού από το εσωτερικό των βακτηρίων προς το περιβάλλον τους και εν τέλει την αφυδάτωση των βακτηρίων και την αδυναμία

ανάπτυξής τους. Όταν τοποθετείται τοπικά πάνω σε τραύματα, το μέλι απορροφάει το νερό από την πληγή, λόγω της όσμωσης, κάνοντας έτσι το μολυσμένο ιστό να αφυδατωθεί με αποτέλεσμα την αποτροπή βακτηριακής λοίμωξης (Molan PC, 1992). Πρέπει να αναφερθεί ωστόσο ότι τεχνητά μέλια που διαθέτουν υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων δεν παρουσιάζουν την ίδια δραστηριότητα όπως τα φυσικά μέλια.

Παράλληλα η οξύτητα του μελιού με το χαμηλό pH είναι ένας επιπλέον αντιβακτηριακός παράγοντας. Το μέλι είναι ελαφρώς όξινο. Η παρουσία οργανικών οξέων και κυρίως του γλυκονικού είναι υπεύθυνη για την οξύτητα του μελιού. Οι χαμηλές τιμές του pH είναι ανασταλτικός παράγοντας ανάπτυξης των βακτηρίων μιας και η πλειονότητα των βακτηρίων αναπτύσσεται ιδανικά σε περιβάλλοντα με pH από 6,5 μέχρι 7,5 (Lusby et al 2005). Συνεπώς το pH ενός μελιού έχει τη δυνατότητα να αποτρέπει την ανάπτυξη βακτηρίων όταν το μέλι εφαρμόζεται τοπικά πάνω σε τραύματα (Molan PC,1992) (Mandal M. et al 2011).

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) χαρακτηρίζεται ως η κύρια πηγή αντιβακτηριακής δράσης που διαθέτει το μέλι. Η αντιμικροβιακή ικανότητα του μελιού είναι αποτέλεσμα της ενζυμικής παραγωγής του υπεροξειδίου του υδρογόνου μέσω της δράσης του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης που προέρχεται από τους υποφαρυγγικούς αδένες των μελισσών. Το ένζυμο ενεργοποιείται όταν το μέλι αραιώνεται. Συγκεκριμένα, στο μη αραιωμένο μέλι το γλυκονικό οξύ που παράγεται συμβάλλει κατά πολύ στη μείωση του pH, το οποίο τελικά εμποδίζει την ενζυμική δράση και κατά συνέπεια εμποδίζει να παραχθεί το υπεροξειδίο του υδρογόνου (Molan PC, 1992) (Ewnetu et al. 2013). Το υπεροξειδίο του υδρογόνου παράγεται συνέχεια αλλά όχι σε μεγάλες ποσότητες στο μέλι και δεν χρειάζεται υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης στη δράση του κατά των μικροβίων. Η συνεχής παραγωγή σε μικρές ποσότητες καθιστά τα μικρόβια μη ανθεκτικά στη δράση του ενώ ταυτόχρονα αποφεύγεται ο κίνδυνος βλαβών στο δέρμα που θα πιθανώς να δημιουργούνταν αν υπήρχε υψηλή συγκέντρωση H_2O_2 που τοποθετείται απευθείας στο δέρμα (Cooper et al 1999). Υπάρχουν όμως και διάφορες ποικιλίες μελιού που εμφανίζουν πιο υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης υπεροξειδίου. Το μέλι Manuka, για παράδειγμα, χαρακτηρίζεται από έντονη δράση κατά των μικροβίων, κάτι που εξηγείται από τις συγκεντρώσεις υπεροξειδίου που παρατηρούνται σε αυτό. Επίσης οι υψηλές συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων που περιέχονται στο μέλι αυτό, πιθανόν να εμποδίζουν ακόμη την ανάπτυξη των βακτηριδίων (Cooper et al 1999). Επομένως δεν

είναι όλα τα μέλια ίδια ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση. Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι παράγοντες που έχουν αποδειχτεί ότι επηρεάζουν τη συσσώρευση υπεροξειδίου του υδρογόνου στο μέλι είναι η απενεργοποίηση της οξειδάσης της γλυκόζης μετά από έκθεση σε θερμότητα ή φως ή η αποικοδόμησή του από το ένζυμο καταλάση, η οποία δεν παρατηρείται στο μέλι. Αν και η προσθήκη του ενζύμου καταλάση μειώνει τη συγκέντρωση υπεροξειδίου, επομένως και της αντιβακτηριακής ικανότητας (Maddocks S.E., Jenkins R.E., November 2013), μερικά μέλια όταν το υπεροξείδιο του υδρογόνου οδηγείται σε διάσπαση με την προσθήκη καταλάσης, εξακολουθούν να εμφανίζουν αξιοσημείωτη δράση εναντίον των βακτηρίων η οποία δηλώνεται ως μη-υπεροξειδιακή αντιβακτηριακή δράση (Alvarez-Suarez et al.2010).



Εικόνα 1.4.2.1 Αντίδραση οξείδωσης γλυκόζης που καταλύεται από οξειδάση γλυκόζης

Η μεθυλγλυοξάλη (MGO) είναι μια οργανική ένωση με έντονη αντιβακτηριακή δράση. Βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο μέλι Manuka και έχει προταθεί ότι η μεθυλγλυοξάλη είναι απολύτως υπαίτια για την μη-υπεροξειδιακή αντιμικροβιακή δράση του μελιού Manuka (Kwakman et al 2012). Τα αυξημένα επίπεδα της μεθυλγλυοξάλης στο συγκεκριμένο μέλι σχηματίζονται κατά τη μετατροπή της διυδροξυακετόνης (DHA) που παρατηρείται σε αυξημένες συγκεντρώσεις στο νέκταρ των λουλουδιών του είδους *L.scoparium*. Η συγκεκριμένη μετατροπή συμβαίνει μη ενζυματικά με αργό ρυθμό κατά τη διάρκεια αποθήκευσης του μελιού (Kwakman et al 2012).

Στο μέλι υπάρχουν αρκετές φαινολικές ενώσεις με αντιβακτηριακή δράση, ωστόσο δεν είναι γνωστός ο τρόπος που συμβάλλουν στη δραστηριότητα του μελιού. Μεμονωμένες φαινολικές ενώσεις που έχουν απομονωθεί από το μέλι εμφανίζουν χαμηλή δραστηριότητα ώστε να δικαιολογείται η αντιμικροβιακή του δράση. Πιθανόν η παράλληλα δράση διαφορετικών φαινολικών ενώσεων σε αντίθεση με των μεμονωμένων θα μπορούσε να ενισχύσει την δράση του μελιού κατά των μικροβίων (Kwakman et al 2012).

Συμπερασματικά οι διάφοροι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στο μέλι θεωρούνται από πολλούς ότι πιθανόν αποτελούν πηγή των αντιμικροβιακών ενώσεων (Molan PC, 1992). Τα βακτήρια που απομονώθηκαν από το μέλι έχουν τη δυνατότητα παραγωγής αντιμικροβιακών ενώσεων, στην *in vitro* καλλιέργεια τους, ωστόσο δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί αν ενώσεις αυτού του είδους περιέχονται στο μέλι (Kwakman et al 2012, Tsadila et al 2021).

1.4.3 Αντιοξειδωτική δράση

Ο όρος οξειδωτικές ουσίες χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις δραστικές ουσίες που δέχονται ηλεκτρόνια κατά τη διαδικασία οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων ενώ καταληκτικά παράγονται ελεύθερες ρίζες. Οι ελεύθερες ρίζες είναι ουσίες που έχουν ένα ελεύθερο μονήρες ηλεκτρόνιο. Ανάμεσα στις ουσίες αυτές, οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) είναι οι βασικότερες, όπως για παράδειγμα το μονήρες οξυγόνο, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, η ρίζα υδροξυλίου, η σουπεροξειδική ανιονική ρίζα, καθώς και το όζον αλλά και το νιτροξειδίο τα οποία έχουν συμπεριφορά ανάλογη με αυτήν των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Erejuwa et al., 2012). Παράλληλα, μπορεί να έχουμε παραγωγή δραστικών ριζών με τη μορφή απόκρισης σε κάποια φλεγμονή. Οι ρίζες αυτές απελευθερώνονται από τα φαγοκύτταρα προκειμένου να αμυνθούν αυτά εναντίον των βακτηρίων. (Θρασυβούλου και συν., 2002). Για την εξουδετέρωση των ριζών αυτών απαιτείται ένα σύστημα αντιοξειδωτικών που έχουν τα κύτταρα, και που μπορεί να είναι αντιοξειδωτικά τόσο ενδογενή όσο και εξωγενή. Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά αποτελούνται από ουσίες όπως είναι η δισμουτάση του σουπεροξειδίου, η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, αλλά και από μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά όπως είναι η γλουταθειόνη, οι βιταμίνες C και E καθώς και

διάφορα μικρά μόρια. Αντίθετα οι εξωγενείς αντιοξειδωτικές ουσίες έχουν στη σύνθεσή τους θρεπτικά στοιχεία αλλά και άλλες ενώσεις με προέλευση που συνδέεται με κάποια εξωγενή πηγή (Erejuwa et al., 2012).

Το μέλι που προέρχεται από ποικίλες φυτικές και γεωγραφικές πηγές προέλευσης παρουσιάζει αυξημένη αντιοξειδωτική δραστηριότητα με το να καταστρέφει τις ρίζες. Η ιδιότητά του αυτή οφείλεται κατά κύριο λόγο στη δράση των φαινολικών οξέων και τα φλαβονοειδών. Η φυτική προέλευση του μελιού επηρεάζει τη φαινολική του σύσταση, κάτι που μπορεί να αποτελέσει ασφαλές κριτήριο προκειμένου να ταξινομηθεί το μέλι αλλά και να ελεγχθεί η αυθεντικότητά του, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις πολυανθικών ποικιλιών (Maddocks S. E. , Jenkins R. E. , November 2013).

Με την αντιοξειδωτική δράση που διαθέτει το μέλι μπορεί να προληφθούν διάφορες οξείες αλλά και χρόνιες παθήσεις (φλεγμονές, αλλεργίες, καρδιαγγειακά νοσήματα, διαβήτης, καρκίνος). Ένα από τα χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η περίπτωση της στεφανιαίας νόσου, στην οποία τα φλαβονοειδή, καθώς εμφανίζουν αντιοξειδωτική, αντιθρομβωτική και αντισπασμική δράση, μπορούν να περιορίσουν την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου βελτιώνοντας τη διαστολή των αγγείων, μειώνοντας την ικανότητα πήξης των αιμοπεταλίων και αναστέλλοντας τη χαμηλή πυκνότητα λιποπρωτεϊνών (Samarghandian et al., 2017).

Όπως στην αντιβακτηριακή ικανότητα, έτσι και στην αντιοξειδωτική, σημαίνοντα ρόλο παίζει η βοτανική προέλευση των μελιών. Συγκρινόμενα με το μέλι Manuka έχει αποδειχθεί ότι τα Ελληνικά μέλια μπορεί να εμφανίσουν παρόμοια ή ακόμα και καλύτερη αντιοξειδωτική δράση από αυτό, γεγονός που πιθανόν να είναι αποτέλεσμα των υψηλότερων συγκεντρώσεων σε πολυφαινόλες που παρουσιάζουν, είτε στην ύπαρξη πολυφαινόλων που έχουν διαφορετική χημική σύσταση (Stagkos et al., 2018). Επίσης, το χρώμα και η αντιοξειδωτική δράση που διαθέτει το μέλι αποδείχτηκε πως σχετίζονται με άμεσο τρόπο. Το σκούρο χρώμα προδίδει την παρουσία πολλών φαινολικών ενώσεων και μάλιστα όσο πιο σκούρο χρώμα διαθέτει το μέλι τόσο περισσότερες φαινολικές ενώσεις περιέχει γι' αυτό και είναι υψηλότερη και η αντιοξειδωτική του δραστηριότητα (Shekilango et al., 2016).

1.4.4 Αντιφλεγμονώδης δράση

Τα κυριότερα στοιχεία που συμμετέχουν στη σηματοδότηση μιας φλεγμονής αποτελούν οι MAPK καθώς και ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB, οι οποίοι κινητοποιούν συγκεκριμένους μεσολαβητές οι οποίοι συμμετέχουν στη δημιουργία της φλεγμονής. Το μέλι έχει τη δυνατότητα να περιορίζει το ρόλο των προφλεγμονωδών παραγόντων IL-6, TNF-α, PGE2, NO, iNOS και COX-2 μειώνοντας τα επίπεδά τους στο πλάσμα του αίματος. Παράλληλα, παρεμποδίζει την μετατόπιση του NF-κB στον πυρήνα, έτσι ώστε να μην του δίνεται η δυνατότητα ενεργοποίησης της μεταγραφής προφλεγμονωδών γονιδίων, ενώ εμποδίζει και την αποικοδόμηση του αναστολέα του NF-κB (IκBα), για να συνεχίσει να βρίσκεται σε ανενεργή κατάσταση ο NF-κB. Οι φαινολικές ενώσεις και ιδιαίτερα τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα –των οποίων την παρουσία βρίσκουμε στο μέλι- δύνανται να περιορίσουν τη δραστική ικανότητα ενζύμων που έχουν ρόλο στην πρόκληση μιας φλεγμονής όπως για παράδειγμα είναι η κυκλοοξυγενάση 2 (COX-2) αλλά και η επαγόμενη συνθάση του οξειδίου του αζώτου (iNOS). Τα φλαβονοειδή, επιπλέον, που εμπεριέχονται στο μέλι συμβάλλουν στη μείωση της έκφρασης του φλεγμονώδους μεσολαβητή MMP-9, που είναι ικανός να δημιουργήσει χρονίζουσα φλεγμονή, ενώ η παραγωγή του H₂O₂ από το μέλι συμβάλλει στην ανάπτυξη ινοβλαστών καθώς και επιθηλιακών κυττάρων, ώστε να αντιμετωπίσουν το πρόβλημα που προέκυψε εξαιτίας της φλεγμονής. Τέλος, το μέλι αναστέλλει την απελευθέρωση μακροφάγων, μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων έτσι ώστε να μην μπορούν να παραχθούν Reactive oxygen species, ROS (δραστικές ρίζες οξυγόνου) παρεμποδίζοντας τη φλεγμονή η οποία, ακόμη, περιορίζεται με τη μειωμένη παραγωγή κερατινοκυττάρων και λευκοκυττάρων (Ahmed et al., 2018).

1.4.5 Αντικαρκινική δράση

Έρευνες έχουν δείξει ότι το μέλι, επιπρόσθετα, παρουσιάζει αντικαρκινική δράση αφού είναι σε θέση να προκαλέσει απόπτωση σε πολλά είδη καρκινικών κυττάρων κάτι που γίνεται εφικτό μέσω της ρύθμισης της έκφρασης προαποπτωτικών αλλά και αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών ως αποτέλεσμα της δράσης που παρουσιάζουν οι φαινολικές ενώσεις που περιέχονται σ' αυτό. Πιο συγκεκριμένα, είναι υπεύθυνο για την αύξηση της έκφρασης της p53, της κασπάσης 3 και της πρωτεΐνης Bax ενώ αντιθέτως μειώνει την έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl2. Ερευνητικά πειράματα,

βασισμένα στη χρήση Manuka σε ποντίκια έδειξαν ότι λαμβάνει χώρα απόπτωση χορηγώντας μέλι είτε από τη στοματική οδό είτε ενδοφλεβίως, ενεργοποιώντας σε κάθε περίπτωση από τις δύο και διαφορετικούς μηχανισμούς. Η αποπτωτική δράση εξαρτάται αφενός από τα επίπεδα συγκέντρωσης του μελιού και αφετέρου από το είδος της κυτταρικής σειράς (Samarghandian et al., 2017). Επίσης, η καταστολή του κύκλου των καρκινικών κυττάρων του εντέρου στη φάση G0/G1 είναι αποτέλεσμα της δράσης των φλαβονοειδών ενώσεις και των φαινολών στο μέλι (Jaganathan et al., 2009). Συμπερασματικά λοιπόν, το μέλι αποτελεί φυσικό στοιχείο που παρουσιάζει αντικαρκινική δράση γι' αυτό και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και η οποία δράση βεβαίως θα μπορούσε να ενισχυθεί έτι περαιτέρω αν χρησιμοποιηθεί το μέλι συνδυαστικά και με άλλους παράγοντες οι οποίοι δύνανται να εμφανίσουν αποπτωτική δράση.

1.4.6 Αντική δράση

Το μέλι αποτελεί προϊόν με αποδεδειγμένη αντική δράση αφού συστατικά του βρέθηκε ότι έχουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο ανάπτυξης αλλοιώσεων ιογενούς χαρακτήρα. Ο χαλκός είναι ένα ιχνοστοιχείο από αυτά που βρίσκονται στο μέλι, ο οποίος μπορεί να αδρανοποιεί ιικά στελέχη και αποτελεί το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα. Παράλληλα, η παρουσία ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C) και φλαβονοειδών καθώς και η παραγωγή H₂O₂ αναστέλλουν την ιική ανάπτυξη αφού παρεμποδίζουν τη μεταγραφή και τη μετάφραση των ιών (Ahmed et al., 2018). Η αναφορά στην αντική δράση του μελιού αφορά πολλούς τύπους ιών. Αναλυτικότερα, βάσει in vitro μελετών, έχει δειχθεί η αντική δράση του μελιού σε ιούς όπως *Rubella*, *Herpes simplex* και *Varicella zoster viruses* (Al-Waili, 2004, Zeina et al., 1996, Shahzad et al., 2012). Επιπρόσθετα, το μέλι φαίνεται να έχει και αντική δράση έναντι του ιού της γρίπης, κάτι το οποίο συνδέεται με την παρουσία των φλαβονοειδών ρουτοσίδης και 5,7-διυδροξυφλαβόνης (chrysin) (Watanabe et al., 2014).

Επιπλέον, στο μέλι εμπεριέχονται ουσίες τις οποίες εκκρίνουν οι μέλισσες από τους σιελογόνους αλλά και τους φαρυγγικούς αδένες τους. Στους σιελογόνους αδένες των μελισσών έχουμε την παρουσία ενώσεων όπως είναι το οξειδίο του αζώτου (NO), καθώς επίσης τα νιτρώδη (NO₂-) και τα νιτρικά (NO₃-), ενώσεις οι οποίες διεγείρουν την άμυνα του ξενιστή έναντι DNA και RNA ιών, όπως οι πολιοϊοί, ο ιός

της Ιαπωνικής εγκαφλίτιδας, ο ιός του απλού έρπητα τύπου 1, ο ιός Έπσταϊν-Μπαρ κ.α. Ειδικότερα, το NO καθυστερεί την ανάπτυξη αλλοιώσεων ιογενούς χαρακτήρα και εμποδίζεται με αυτό τον τρόπο η αντιγραφή των ιών, καθώς παρεμβαίνει τόσο στην πολυμεράση του ιού όσο και στο γενετικό του υλικό αλλά και στις καψιδιακές του πρωτεΐνες. Το NO επιπλέον μπορεί να δρα και ως αντιαγωγός παράγοντας. Η παραγωγή του ενεργοποιείται είτε άμεσα από τον ιό που προσβάλλει το κύτταρο, είτε έμμεσα μέσω της ιντερφερόνης γ. Πιο συγκεκριμένα, η ιντερφερόνη γ αποτελεί μέρος της αρχικής, μη ειδικής ανοσολογικής απόκρισης του κυττάρου, η οποία θα οδηγήσει στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων NO μέσω της iNOS. Ακολούθως, το NO περνά στα γειτονικά κύτταρα και προσφέρει στον οργανισμό μια αρχική αντίσταση έναντι της ιικής μόλυνσης. Παρά την προστασία, όμως, που προσφέρει το NO σε ιικές μολύνσεις, υπάρχουν έρευνες που έχουν δείξει πως το οξείδιο του αζώτου και τα παράγωγά του μπορούν να καταστούν επιβλαβή για τον οργανισμό (Torre et al., 2002).

Επιπρόσθετα, όπως έχει αναφερθεί, τα φλαβονοειδή είναι ένα ακόμα συστατικό του μελιού που μπορεί να αναστέλλει την αντιγραφή και την μεταγραφή του ιού (Ahmed et al., 2018). Θα ήταν εφικτό, λοιπόν, να χρησιμοποιηθεί το μέλι ακόμα και σαν φυσικό φάρμακο για τη θεραπεία ιικών μολύνσεων για τις οποίες δεν υπάρχουν διαθέσιμα αντιικά φάρμακα, όπως είναι για παράδειγμα η μόλυνση που μπορούν να προκαλέσουν οι εντεροϊοί.

Αντικά φάρμακα για εντεροϊούς

Μέχρι στιγμής, δεν έχουν υπάρξει αποτελεσματικά ούτε αποδεκτά αντικά φάρμακα ή εμβόλια προκειμένου να καταπολεμηθούν οι μολύνσεις από τους Εντεροϊούς EV-D68, EV-A71 και CVB5. Ο κυβερνητικός οργανισμός των Ηνωμένων Πολιτειών CDC (Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών) δοκίμασε 16 φάρμακα για την ικανότητα τους να μπορέσουν να λειτουργήσουν σαν πιθανά φάρμακα για την καταπολέμηση των μολύνσεων από τον Εντεροϊό EV-D68. Από αυτά τα 16, τα V-7404 και DAS181 προκάλεσαν αξιοσημείωτη αναστολή του ιού (Zenilman et al., 2015), (Esposito et al., 2015). Άλλα φάρμακα που μπορούν να δράσουν ως πιθανοί αναστολείς των εντεροϊών

αυτών πιθανώς να είναι καρδιακοί αναστολείς που δεν επιτρέπουν την πρόσδεση σε υποδοχείς, και αναστολείς των λειτουργικών πρωτεϊνών των εντεροϊών (Lin et al., 2019). Το ότι δεν υπάρχουν ούτε διαθέσιμα φάρμακα ούτε εμβόλια κατά της μόλυνσης από εντεροϊούς επισημαίνει τη σημασία χρήσης του μελιού ως φυσικού φαρμάκου για την καταπολέμηση ασθενειών που οφείλονται σε ιούς.

1.5 Βακτηριακά είδη

1.5.1 *Staphylococcus aureus*

Ο *Staphylococcus aureus* αποτελεί ένα κοκκοειδές βακτήριο το οποίο είναι θετικό κατά Gram, που ανήκει στο φύλο *Firmicutes*. Ο *S.aureus* είναι το πιο σημαντικό βακτήριο από κλινικής άποψης (Lee A. S. et al., May 2018). Η προέλευση της ονομασίας του σχετίζεται άμεσα με τον τρόπο ανάπτυξής του, αφού αναπτύσσεται υπό την μορφή ακανόνιστων μαζών που ομοιάζουν με τσαμπί σταφυλιού. Η σταφυλοξανθίνη, που είναι μια καροτενοειδής χρωστική ουσία, προσδίδει το χρυσό χρώμα στις αποικίες του (Anthimidou and Mossialos 2012). Ο *S. aureus* αναπτύσσεται τόσο στο δέρμα όσο και στην ανώτερη αναπνευστική οδό και αποτελεί ένα από τα πιο συχνά νοσοκομειακά παθογόνα. Το συγκεκριμένο βακτήριο παρόλο που βρίσκεται στην συμβιωτική μικροβιακή χλωρίδα του ρινικού βλεννογόνου στο 20-40% του πληθυσμού, όταν η δερματική και η βλεννογόνος στοιβάδα διαταράσσεται λόγω χρόνιων δερματικών παθήσεων, τραυμάτων ή χειρουργικών παρεμβολών ο *S. aureus* καταφέρνει και αποκτά πρόσβαση στους υποκείμενους ιστούς ακόμα και στην κυκλοφορία του αίματος προκαλώντας έτσι μολύνσεις. Άτομα με επεμβατικά ιατρικά μηχανήματα (όπως περιφερικοί ή κεντρικοί καθετήρες) ή με καταπονημένο ανοσοποιητικό σύστημα είναι

αρκετά επιρρεπείς σε μολύνσεις από το βακτήριο *S. aureus* (Lee A. S. et al., May 2018). Είναι ακόμη ικανό να προκαλέσει ακόμα και τροφικές δηλητηριάσεις, επειδή καθώς αναπτύσσεται παράγει διάφορες θερμοσταθερές πρωτεϊνικές εντεροτοξίνες που απελευθερώνονται στο σώμα. Ακόμη ο *S.aureus* αποτελεί το πιο σύνηθες παθογόνο σε έλκη διαβητικών. Πολλά από τα στελέχη του είναι εξαιρετικά επιθετικά και παράλληλα ανθεκτικά σε κοινά αντιβιοτικά, κάτι που καθιστά την αντιμετώπιση τους εξαιρετικά δύσκολη. Επειδή εμφανίζει υψηλή ευαισθησία στο μέλι, ο *Staphylococcus aureus* χρησιμοποιείται σε πολλά πειράματα σχετικά με τις αντιβακτηριακές ιδιότητες του μελιού. Πειράματα δείχνουν ότι το μέλι παράγει ζώνες αναστολής ενάντια του. Το βακτηριακό στέλεχος *S.aureus* εμφανίζει υψηλή ευαισθησία στο μέλι Manuka γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτό επιδρά σε συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου αλλά και στον κυτταρικό του κύκλο (Henriques et al. 2010).

1.5.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Η *Pseudomonas aeruginosa* αποτελεί ένα ραβδόμορφο βακτήριο αρνητικό κατά Gram το οποίο ανήκει στην οικογένεια των *Pseudomonadaceae*. Τα συγκεκριμένα βακτήρια παρόλο που έχουν διαφορές στο μέγεθος κυμαίνονται μεταξύ 1,5-3 μm. Στο περιβάλλον εντοπίζονται μεμονωμένα, είτε σε ζεύγη είτε σε μικρές αλυσίδες. Το πολικό μαστίγιο που διαθέτουν είναι αυτό που δίνει τη δυνατότητα κίνησης τους (Stratton, 1983).

Η *P.aeruginosa* έχει την δυνατότητα να προσβάλλει στα όα, τα φυτά καθώς και τον άνθρωπο, ενώ εντοπίζεται στο έδαφος, το νερό αλλά και στη γλωρίδα του δέρματος. Είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο βακτήριο για τον ανθρώπινο οργανισμό και αποτελεί μία από τις βασικές αιτίες σοβαρών ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων μολύνοντας με ευκολία ασθενείς που ακολουθούν θεραπεία για παθήσεις (Bailey TA et al 2000, Rahme LG 2000), όπως για παράδειγμα ουρολοιμώξεις, μηνιγγίτιδα, λοιμώξεις από καθετήρες, σηψαιμία, πνευμονία κ.α. κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς (Khan MO et al., Unsel H et al., 2000). Άλλες λοιμώξεις όπως ωτίτιδα, λοιμώξεις τραυμάτων, επιπεφυκίτιδα μπορούν ακόμη να προκληθούν από την *Pseudomonas aeruginosa* (Grogan JB, 1996). Αναπτύσσεται βέλτιστα κυρίως σε υγρό και θερμό

περιβάλλον και γι' αυτό το λόγο το νοσοκομειακό περιβάλλον παρέχει αμέτρητες εστίες για την ανάπτυξη του βακτηρίου.

Λοιμώξεις του αναπνευστικού

Η *Pseudomonas aeruginosa* αποτελεί σχεδόν αποκλειστικό παράγοντα, υπεύθυνο για αναπνευστικές λοιμώξεις σε άτομα που έχουν πρόβλημα στην κατώτερη αναπνευστική οδό ή που ο συστηματικός αμυντικός μηχανισμός τους βρίσκεται σε καταστολή. Πρωτογενής πνευμονία εμφανίζεται σε ασθενείς οι οποίοι πάσχουν από χρόνια πνευμονοπάθεια και συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια. Βακτηριαμική πνευμονία παρουσιάζεται πιο συχνά σε ασθενείς ουδετεροπενικούς με καρκίνο οι οποίοι υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία. Όταν όμως συμβεί αποικισμός της κατώτερης αναπνευστικής οδού με βλεννώδη στελέχη του *Pseudomonas aeruginosa* σε ασθενείς που πάσχουν από κυστική ίνωση είναι σχεδόν αδύνατο, να αντιμετωπιστεί η περίπτωση αυτή (Grogan JB, 1996).

Βακτηριαμία και σηψαιμία

Η *Pseudomonas aeruginosa* προκαλεί βακτηριαμία πρωτίστως σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Προδιατεθειμένες συνθήκες περιλαμβάνουν αιματολογικές κακοήθειες, ανοσοανεπάρκεια που έχει σχέση με το AIDS, ουδετεροπενία, σακχαρώδη διαβήτης, καθώς και σοβαρά εγκαύματα. Η *Pseudomonas* είναι υπεύθυνη σχεδόν για το 25% του συνόλου των αποκτηθέντων Gram-αρνητικών βακτηριαμιών (Grogan JB, 1996).

Μολύνσεις αυτιών, συμπεριλαμβανομένων εξωτερική ωτίτιδα

Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι το πρωταρχικό παθογόνο βακτήριο σε ορισμένες περιπτώσεις εξωτερικής ωτίτιδας, συμπεριλαμβανομένων του «αυτιού του

κολυμβητή». Το βακτήριο αυτό δεν εντοπίζεται συχνά στο υγιές αυτί, ωστόσο μπορεί να «κατοικεί» στον εξωτερικό ακουστικό πόρο σε συνδυασμό με τραυματισμό, διαβροχή, φλεγμονή, ή απλά υγρές συνθήκες.

Μολύνσεις των ματιών

Η *Pseudomonas aeruginosa* έχει τη δυνατότητα να μολύνει τα μάτια. Αποτελεί μια από τις πιο συχνές αιτίες βακτηριακής κερατίτιδας. Η *Pseudomonas* καταφέρνει να αποικίσει το οφθαλμικό επιθήλιο και αν οι άμυνες του περιβάλλοντος βρίσκονται σε κίνδυνο, το βακτήριο δύναται να πολλαπλασιαστεί γρήγορα μέσω της παραγωγής ενζύμων όπως για παράδειγμα η ελαστάση, αλκαλική πρωτεάση και εξοξολίνη Α, και να προκαλέσει μια εξαιρετικά γρήγορη καταστροφική λοίμωξη που μπορεί να οδηγήσει ακόμα και σε πλήρη απώλεια όρασης.

Λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος

Λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος (ουρολοιμώξεις), που προκαλούνται από την *Pseudomonas aeruginosa* είναι σχεδόν πάντα ενδονοσοκομειακές και έχουν σχέση με καθετηριασμό, όργανα ή χειρουργική επέμβαση του ουροποιητικού. Η *Pseudomonas aeruginosa* αποτελεί την τρίτη κύρια αιτία των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων του ουροποιητικού, χαρακτηρίζοντας περίπου το 12% όλων των μολύνσεων από αυτού του τύπου. Όπως συμβαίνει και στην περίπτωση της *E. coli*, λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω μιας αύξουσας ή φθίνουσας διαδρομής. Επιπρόσθετα, η *Pseudomonas* μπορεί να εισχωρήσει στην κυκλοφορία του αίματος μέσω του ουροποιητικού συστήματος και αυτή είναι η πηγή του σχεδόν 40 % της βακτηριαιμίας από *Pseudomonas* (Khan et al., 2000).

1.5.3 *Salmonella Typhimurium*

Η *Salmonella* αποτελεί έναν από τους συχνότερους αιτιολογικούς παράγοντες μολυσματικών ασθενειών που οφείλονται σε τρόφιμα, με βασικότερη τη γαστρεντερίτιδα. Περίπου 2500 ορότυποι είναι καταγεγραμμένοι. Η *Salmonella Typhimurium* αντιστοιχεί στον πρώτο ο οποίος σχετίζεται άμεσα με την σαλμονέλωση παγκοσμίως. Η *S. typhimurium* αποτελεί ένα αρνητικό κατά Gram παθογόνο βακτήριο που μεταδίδεται κυρίως μέσω της χρήσης ωμού ή μερικώς μαγειρεμένου φαγητού όπως για παράδειγμα είναι τα αυγά, τα λαχανικά και τα πουλερικά. Η παρουσία του βακτηρίου αυτού στην τροφή αποτελεί σοβαρό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Ακόμη λιποπολυσακχαρίτες όπως είναι οι ενδοτοξίνες αποτελούν μέρος της εξωτερικής μεμβράνης όλων των Gram αρνητικών βακτηρίων όπως και η *S. typhimurium*. Οι λιποπολυσακχαρίτες οδηγούν σε σηπτικό σοκ, υπόταση, διάρροια και ανάπτυξη θρόμβων στα αιμοφόρα αγγεία. Επομένως η ανίχνευση των λιποπολυσακκάρων είναι εξαιρετικά σημαντική για την ιατρική αλλά και την τροφική ασφάλεια. Αυτός είναι και ο λόγος που ευαίσθητες και ποσοτικές μέθοδοι για τον εντοπισμό *S. typhimurium* είναι απαραίτητες για την εξασφάλιση της ασφάλειας και της ποιότητας της τροφής (Ansari N. et al., 15 June 2017)

1.5.4 *Klebsiella pneumoniae*

Η *Klebsiella pneumoniae* αποτελεί ένα αρνητικό κατά Gram παθογόνο βακτήριο. Σε στερεό θρεπτικό μέσο εμφανίζει μυκοειδή φαινότυπο. Η *Klebsiella pneumoniae* ανήκει στην οικογένεια των εντεροβακτηροειδών στην οποία ανήκουν και άλλα γνωστά παθογόνα όπως είναι για παράδειγμα η *Escherichia coli*, το είδος *Yersinia*, το είδος *Salmonella* και το είδος *Shigella*. Η *Klebsiella pneumoniae* αναφέρθηκε από τον Carl Friedlander το 1882 ως ένα βακτήριο το οποίο απομονώθηκε από τους πνεύμονες ασθενών που πέθαναν από πνευμονία. Είδη της *Klebsiella* έχουν τη δυνατότητα να εντοπιστούν παντού στην φύση και πιο συγκεκριμένα σε φυτά, στα ζώα αλλά και στον άνθρωπο. Το συγκεκριμένο βακτήριο εμπλέκεται ως παράγοντας σε διάφορους τύπους μολύνσεων στον άνθρωπο, όπως είναι για παράδειγμα η μόλυνση της αναπνευστικής οδού, η μόλυνση της ουροποιητικής οδού και η μόλυνση του κυκλοφορικού συστήματος. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι συγκεκριμένες μολύνσεις συμβαίνουν κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς νοσοκομείων και αντιμετωπίζονται με β-

λακτάμες ή άλλα αντιβιοτικά που είναι αποτελεσματικά έναντι εντεροβακτηριοειδών (Martin R. M., Bachman M. A., 22 January 2018)

1.5.5 *Citrobacter freundii*

Το *Citrobacter freundii* είναι ένα ραβδοειδούς σχήματος, αρνητικό κατά Gram, αερόβιο βακτήριο της οικογένειας *Enterobacterales*, με τυπικό μέγεθος 1-5μm. Εντοπίζεται σε τρόφιμα, στο νερό, το έδαφος, το φυσικό περιβάλλον, λύματα αλλά και στις εντερικές οδούς ανθρώπων και ζώων. Είναι μια γνωστή αιτία νοσοκομειακών λοιμώξεων και κυρίως λοιμώξεων του αναπνευστικού, ουρολοιμώξεων, μηνιγγίτιδας, της νεογνικής σήψης και της λοιμώδους διάρροιας. Το *C. freundii* μπορεί να παραμείνει στους ξενιστές του για μεγάλο χρονικό διάστημα και να αποκτήσει μηχανισμούς αντίστασης, καθιστώντας δύσκολη τη θεραπεία των λοιμώξεων που προκαλεί (Liu, L. et al., 2018), (Ramsamy, Y. Et al., 2020).

1.5.6 *Acinetobacter baumannii*

Το είδος *Acinetobacter* αποτελεί αρνητικά κατά Gram βακτήρια με σχήμα κοκκοβακίλλων τα οποία δεν κινούνται και είναι θετικά στην δοκιμή καταλάσης. Λόγω των πολλών στενά συγγενικών ειδών είναι εξαιρετικά δύσκολο να ξεχωριστεί η ταξινόμια του *Acinetobacter* αποκλειστικά με την χρήση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών και χημειοταξικών μεθόδων. Το γεγονός ότι η ευαισθησία στα αντιβιοτικά αλλά και η κλινική σημασία είναι πολύ διαφορετική μεταξύ διαφορετικών γενωμικών ειδών, έχει σαν αποτέλεσμα να απαιτείται η ακριβής ταυτοποίηση για το είδος *Acinetobacter*. Ανάμεσα στο είδος *Acinetobacter*, το *Acinetobacter baumannii* είναι το κυριότερο που συνδέεται με ενδονοσοκομειακές μολύνσεις. Παρόλο που το συγκεκριμένο βακτήριο έχει χαρακτηριστεί ως χαμηλού επιπέδου παθογόνο είναι ικανό να προκαλέσει μολύνσεις στο δέρμα, στην κυκλοφορία του αίματος, στην ουρηθική οδό και στους μαλακούς ιστούς. Πολλές έρευνες έδειξαν πως το *A. baumannii* αναπτύσσει πολύ γρήγορα ανθεκτικότητα σε αντιμικροβιακά φάρμακα και έχουν απομονωθεί στελέχη με πολλαπλή ανθεκτικότητα. Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας WHO το βακτήριο *A. baumannii* είναι από τα πιο επικίνδυνα των οργανισμών ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, και είδη

εντεροβακτηρίων) που αντιστέκεται με επιτυχία στην δράση αντιβακτηριακών φαρμάκων. Αρκετοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας του βακτηρίου είναι πλέον γνωστοί, όπως για παράδειγμα η ενζυμική καταστολή φαρμάκων, η τροποποίηση στόχων, η ύπαρξη καναλιών εκροής φαρμάκων αλλά και η μείωση διαπερατότητας (Lee C. et al. , 13 March 2017)

1.5.7 *Streptococcus mutans*

Ο *Streptococcus mutans* είναι ένα σημαντικό βακτηριακό είδος της ανθρώπινης στοματικής μικροχλωρίδας που αποικίζει κυρίως τις επιφάνειες του σκληρού ιστού των δοντιών και θεωρείται γενικά ως ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας που ευθύνεται για την έναρξη και την εξέλιξη της τερηδόνας, μιας από τις πιο διαδεδομένες μολυσματικές ασθένειες στον κόσμο. Η λοιμογόνος δράση του *S. mutans* στην οδοντική τερηδόνα συνδέεται στενά με την έκφραση των γλυκοζυλοτρανσφερασών (GTF), εκκρινόμενα ένζυμα υπεύθυνα για τη σύνθεση εξωκυτταρικών πολυμερών της γλυκάνης από τη σακχαρόζη και επακόλουθο σχηματισμό biofilm (πλάκα). Οι εκκρινόμενες GTF καλύπτουν την επιφάνεια του σμάλτου των δοντιών με γλυκάνες και είναι κυρίως υπεύθυνες για το σχηματισμό μιας εξωκυτταρικής μήτρας που αγκυρώνει και υποστηρίζει το πολυμικροβιακό βιοφίλμ.

Τα βιοφίλμ διαδραματίζουν επομένως κρίσιμο ρόλο σε χρόνιες λοιμώξεις όπως η οδοντική πλάκα και η τερηδόνα, και φαίνεται να παίζουν ρόλο στον στοματικό αποικισμό που σχετίζεται με τη σοβαρότητα της περιοδοντικής νόσου. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να αναπτυχθούν νέα φαρμακευτικά μόρια που μπορούν να δράσουν ενάντια σε αυτόν τον κρίσιμο σχηματισμό τερηδογονικού βιοφίλμ, καθώς η τερηδόνα εξακολουθεί να επικρατεί σε όλες τις ηλικιακές ομάδες παγκοσμίως.

Εξωστοματικά, ο *S. mutans* και άλλοι στοματικοί στρεπτόκοκκοι μπορούν να προκαλέσουν μολυσματική ενδοκαρδίτιδα (Gabe, V. Et al., 2020), (Avilés-Reyes, A. Et al., 2018).

II. Σκοπός της εργαστηριακής μελέτης

Ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η διερεύνηση της αντιβακτηριακής δράσης δώδεκα δειγμάτων μελιού από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της Κρήτης και διαφορετικής βοτανικής προέλευσης έναντι των βακτηρίων *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter baumannii* και *Streptococcus mutans* καθώς και να μελετηθούν οι μηχανισμοί της αντιμικροβιακής δράσης των μελιών αυτών.

Για την μελέτη της αντιβακτηριακής ικανότητας των μελιών χρησιμοποιήθηκε η *in vitro* μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) με την χρήση πλακών μικροτιτιλοδότησης (microtiter plates) και η *in vitro* μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (Minimum Bactericidal Concentration), ενώ για την εκτίμηση των μηχανισμών της αντιβακτηριακής τους δράσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσδιορισμού MIC με την προσθήκη α) Καταλάσης, που διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου και β) Πρωτεΐνάσης K, η οποία καταστρέφει πρωτεΐνες ή ολιγοπεπτίδια που υπάρχουν στο μέλι και μπορεί να συμβάλλουν στην αντιβακτηριακή του δράση.

Η αντιβακτηριακή τους δράση συγκρίθηκε με την αντίστοιχη δραστηριότητα του μελιού Manuka, το οποίο έχει μελετηθεί εκτεταμένα όχι μόνο για την αντιβακτηριακή, αλλά και για την αντική του δράση.

III. Πειραματικό μέρος

3. Υλικά και μέθοδοι

Παρακάτω αναφέρονται όλα τα υλικά καθώς και τα εργαστηριακά μηχανήματα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, καθώς και τα στελέχη των βακτηρίων και τα θρεπτικά υποστρώματα.

3.1 Υλικά

3.1.1 Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν

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

3.1.2 Εργαστηριακά μηχανήματα και εξοπλισμός

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

3.1.3 Θρεπτικά

Τα υποστρώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρασκευάστηκαν σύμφωνα με οδηγίες που δόθηκαν από τον κατασκευαστή. Αυτά ήταν:

- **Θρεπτικό υλικό Mueller Hinton Broth:** της εταιρίας CONDA Pronadisa που περιέχει Beef infusion solids 2.0 g/L, Acid Casein Peptone (H) 17.5 g/L και Corn Starch 1.5 g/L.
- **Θρεπτικό υλικό Mueller-Hinton agar:** της εταιρίας NEOGEN Culture Media που περιέχει Beef extract 2.0 g/L, Acid Hydrolysed Casein 17.5 g/L, Starch 1.5 g/L και Bacteriological Agar 17.0 g/L.
- **Θρεπτικό υλικό Brain Heart Infusion Broth**

Brain Heart Infusion Broth: της εταιρείας CONDA Pronadisa που περιέχει Calf's Brain Infusion 12.5 g/L, Enzymatic Digest of Animal Tissue 10.0 g/L, Beef Heart Infusion 5.0 g/L, Sodium Chloride 5.0 g/L, Disodium Phosphate 2.5 g/L και Glucose 2.0 g/L.

Για τη δημιουργία στερεού θρεπτικού υλικού το Brain Heart Infusion Broth αναμείχθηκε μαζί με Muller-Hinton Agar: όπως αναγράφεται παραπάνω σε ποσότητα 15.0 g/L

Το συγκεκριμένο θρεπτικό χρησιμοποιήθηκε για την αναερόβια καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους *Streptococcus mutans*.

3.1.4 Καλλιέργειες βακτηριακών στελεχών έναντι των οποίων μετρήθηκε η αντιβακτηριακή δραστηριότητα των μελιών :

1. *Staphylococcus aureus*
2. *Pseudomonas aeruginosa*
3. *Salmonella typhimurium*
4. *Klebsiella pneumoniae*
5. *Citrobacter freundii*
6. *Acinetobacter baumannii*
7. *Streptococcus mutans*

3.1.5 Δείγματα μελιών

Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκε η αντιβακτηριακή δράση 12 μελιών, τα οποία προέρχονται ποικίλης βοτανικής προέλευσης της γεωγραφικής περιοχής της Κρήτης. Τα μέλια, αφού στάλθηκαν από τους παραγωγούς, φυλάχθηκαν σε δροσερό και σκιερό μέρος εντός του εργαστηρίου για την βέλτιστη διατήρησή τους. Στον πίνακα που παρουσιάζεται παρακάτω φαίνονται αναλυτικά όσα μέλια χρησιμοποιήθηκαν, η βοτανική τους προέλευση καθώς και η περιοχή και η περίοδος συλλογής.

Πίνακας 3.1.5.1 Αναλυτική περιγραφή μελιών που χρησιμοποιήθηκαν (γεωγραφική προέλευση, ημερομηνία συγκομιδής)

Κωδικός δείγματος	Βοτανική προέλευση	Περιοχή συλλογής	Περίοδος συλλογής
1	Θυμάρι	Μαριδάκι, Ηρακλείου	Αύγουστος, 2021
2	Θυμάρι	Ροδωπός, Χανίων και Σελάκανο, Λασιθίου	Αρχές Σεπτεμβρη, 2021
3	Πευκοθύμαρο	Σελάκανο, Λασιθίου	Αρχές Οκτώβρη, 2021
140	Πεύκο	Σελάκανο-Ιεράπετρα, Λασιθίου	20 Σεπτεμβρίου 2019
142	Πευκοθύμαρο	Σελάκανο-Ιεράπετρα, Λασιθίου	15 Οκτώβρη 2019

145	Θυμάρι	Μοίρες Τρυπητά, Ηρακλείου	10 Ιουλίου 2019
146	Θυμάρι	Αστρίτσι, Ηρακλείου	5 Αυγούστου 2019
147	Θυμάρι	Μπαλί Μυλοπόταμος, Ρεθύμνου	10 Οκτωβρίου 2019
152	Θυμάρι	Ζίρος-Σητεία, Λασιθίου	25 Αυγούστου 2019
153	Πευκοθύμαρο	Μάλες, Άγιος Νικόλαος	10 Οκτωβρίου 2019
218	Ερείκη	Χανιά	10 Δεκεμβρίου 2020
224	Ερείκη	Σητεία, Λασιθίου	4 Δεκεμβρίου 2020

3.1.6 Μέλι Manuka

Το μέλι Manuka που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη είναι της εταιρείας NEW ZEALAND HONEY CO. Αυτό το δείγμα μελιού Manuka έχει UMF 24+ το οποίο αντιστοιχεί σε τιμή MGO 1122+ (1122 mg/kg of Methylglyoxal), κάνοντας το ένα από τα πιο ισχυρά μέλια Manuka, αφού τιμές αυτές είναι από τις υψηλότερες στην αγορά. Η αντιμικροβιακή δράση των ελληνικών μελιών συγκρίθηκε με την αντίστοιχη αντιμικροβιακή ικανότητα του Manuka, καθώς έχει μελετηθεί εκτενώς σχετικά με τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες.



Εικόνα 3.1.6.1 Μέλι Manuka της εταιρείας New Zealand honey co.

3.2 Μέθοδοι

Για να αποδειχθεί η αντιβακτηριακή δράση των μελιών που εξετάστηκαν εφαρμόστηκαν δύο μέθοδοι *in vitro*. Η μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης των βακτηρίων, minimum inhibitory concentration (MIC) με την χρήση πλακών μικροτιτλοδότησης και στη συνέχεια η μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης των βακτηρίων, minimum bactericidal concentration (MBC). Στα μέλια με την πιο ισχυρή αντιβακτηριακή ικανότητα επαναλήφθηκε η μέθοδος MIC παρουσία καταλάσης, για να προσδιοριστεί αν η αντιβακτηριακή δράση των μελιών οφείλεται στην ύπαρξη υπεροξειδίου του υδρογόνου, και πρωτεΐνάσης K για να προσδιοριστεί εάν η αντιβακτηριακή δράση οφείλεται σε αντιβακτηριακές πρωτεΐνες ή ολιγοπεπτίδια του εκάστοτε μελιού (Mundo et al 2004).

3.2.1 Εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης δειγμάτων μελιού μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (minimum inhibitory concentration) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (microtiter plates)

3.2.1.1 Αρχή της μεθόδου

Η πρώτη in vitro μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) έγινε σε αποστειρωμένες μικροπλάκες (microplates) πολυστερίνης 96 θέσεων (96-wells) η καθεμία. Για τη δοκιμασία της μεθόδου ακολουθήθηκε η διαδικασία όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία (Patton et al.2006, Sherlock et al 2010).

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

Για τον έλεγχο της ανάπτυξης των βακτηρίων οι μικροπλάκες τοποθετήθηκαν στο microplate reader (ELx808 Absorbance Microplate Reader, BioTek) το οποίο ήταν συνδεδεμένο με έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή. Οι μικροπλάκες μετρήθηκαν στα 600 nm. Για την ανάλυση των οπτικών απορροφήσεων των καλλιεργείων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Gen5™ Data Analysis Software (BioTek).

3.2.1.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάστηκαν οι καλλιέργειες των βακτηρίων χρησιμοποιώντας καλλιέργειες (glycerol stock) που διατηρούνται στους -80°C. Κάτω από ένα λύχνο Bunsen σε ασηπτικό περιβάλλον λήφθηκε μια ποσότητα του εν λόγω βακτηρίου από την καλλιέργεια stock με την βοήθεια αυτόματης πιπέτας και τοποθετήθηκε σε vial με θρεπτικό υπόστρωμα Muller Hinton Broth (5 ml) με εξαίρεση το βακτήριο *Streptococcus mutans* το οποίο τοποθετήθηκε σε vial με θρεπτικό υπόστρωμα Brain Heart Infusion Broth. Τα vials τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα (incubator shaker)

overnight στους 37°C και υπό ανάδευση στις 210 στροφές με εξαίρεση πάλι τον *Streptococcus mutans* που αναπτύσσεται κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Όσον αφορά την καλλιέργεια του *Streptococcus mutans* τα τετράγωνα τρυβλία Petri και οι μικροπλάκες τοποθετήθηκαν σε ειδικό δοχείο αναερόβιας καλλιέργειας AnaeroJar AG25 με το σύστημα AnaeroGen Atmosphere Generation στους 30°C για 4 μέρες.

Κάτω από έναν λύχνο Bunsen ετοιμάστηκε μια σειρά από αποστειρωμένα Eppendorf των 1500μl. Για την παραγωγή διαδοχικών αραιώσεων κάθε δείγματος μελιού μετρήθηκαν 750μl δείγματος μελιού με πιπέτα των 1000μl με κομμένο tip και άλλα 750μl θρεπτικού Muller Hinton δημιουργώντας την πρώτη αραιώση 50% του δείγματος. Το δείγμα έπειτα ομοιογενοποιήθηκε με την βοήθεια Vortex και γεμίστηκαν άλλα 5 Eppendorf με 750μl θρεπτικό κάτω από στείρες συνθήκες. Από το Eppendorf που περιείχε το κατά 50% αραιωμένο μέλι μετρήθηκαν 750μl και προστέθηκε στο περιεχόμενο του δεύτερου Eppendorf, δημιουργώντας την συγκέντρωση 25%. Η διαδικασία αυτή συνεχίστηκε μέχρι το τελευταίο Eppendorf. Αποτέλεσμα της παραπάνω διαδικασίας ήταν να παρθούν 6 Eppendorf με τις εξής αραιώσεις: 50% v/v, 25% v/v, 12.5% v/v, 6.25% v/v, 3.125% v/v και 1.56% v/v. Σε μια πλάκα καλλιέργειας 96 θέσεων γεμίστηκαν τα «πηγαδάκια» με 190μl των δειγμάτων. Σε κάθε πλάκα 96 θέσεων έγινε έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης 4 δειγμάτων με το κάθε δείγμα να έχει τρεις επαναλήψεις καθώς και δυο επαναλήψεις του μελιού Manuka. Τέλος δυο σειρές από 6 πηγαδάκια λειτούργησαν σαν θετικό control (Θρεπτικό Muller Hinton μαζί με καλλιέργεια βακτηρίων) και αρνητικό control (Θρεπτικό Muller Hinton) όπως φαίνεται παρακάτω. Με το αρνητικό control ήταν εφικτό να εντοπιστεί πιθανό λάθος κατά τον χειρισμό του ερευνητή ή κάποια πιθανή επιμόλυνση του θρεπτικού στην περίπτωση που στο αρνητικό control είχαμε ανάπτυξη βακτηρίου.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G	M	M	M	M	M	M	+	+	+	+	+	+
H	M	M	M	M	M	M	-	-	-	-	-	-

Σχήμα 3.2.1.2.1 Αναπαράσταση της διάταξης της πλάκας μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων

Στη συνέχεια αραιώθηκε η καλλιέργεια για παρασκευή εναιωρήματος θολερότητας ίσης με 0,5 McFarland που αντιστοιχεί σε πυκνότητα $1,5 \times 10^8$ cfu/ml, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Αυτό με τη σειρά του αντιστοιχεί σε απορρόφηση ίση με 0,132 στα 600 nm και συνεπώς πραγματοποιούνταν αραιώσεις της καλλιέργειας μέχρι την τιμή αυτή. Μετά έγινε μια επιπρόσθετα αραιώση 10% έτσι ώστε τα 10 μl καλλιέργειας που προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι να αντιστοιχούν σε 5×10^4 CFUs. Αφού έγινε και η τελευταία αραιώση, πάρθηκαν από αυτή 100μl που προστέθηκαν σε Eppendorf που περιέχει 900μl αποστειρωμένο θρεπτικό Muller Hinton. Μετά από μία ελαφριά ανακίνηση προστέθηκαν στα πηγαδάκια που είχαν γεμισθεί προηγουμένως, 10μl από την αραιή καλλιέργεια. Η πλάκα τοποθετήθηκε στο 96 well plate reader (ELx808 Absorbance Microplate Reader, BioTek) για την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) του κάθε «πηγαδιού» και τα αποτελέσματα αποθηκεύτηκαν ως χρόνος $t = 0$. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν και καταγράφηκαν από το λογισμικό **Gen5™ Data Analysis Software**. Η μέτρηση έγινε στα 600 nm. Η πλάκα στην συνέχεια επωάστηκε για 24 ώρες σε κλίβανο επώασης ρυθμισμένο στους 37°C. Μετά το πέρας των 24 ωρών η πλάκα τοποθετήθηκε ξανά στο 96 well plate reader όπου και μετρήθηκε πάλι η οπτική πυκνότητα του κάθε «πηγαδιού» και τα αποτελέσματα αποθηκεύτηκαν αυτή τη φορά ως χρόνος $t=24$. Τα αποτελέσματα καταγράφηκαν ως

αρχεία Microsoft excel. Είναι δυνατόν να βρεθεί η ελάχιστη συγκέντρωση όπου η ανάπτυξη του βακτηρίου αναστέλλεται (MIC), αφαιρώντας τις τιμές του χρόνου t24 από αυτές του t0.

3.2.2 Εκτίμηση της βακτηριοκτόνου δράσης δειγμάτων μελιού μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (minimum bactericidal concentration) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (microtiter plates)

3.2.2.1 Αρχή της μεθόδου

Η δεύτερη *in vitro* μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αφορούσε τον προσδιορισμό της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC).

Το MBC ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα, στην οποία καταστέλλεται το υπό εξέταση βακτήριο.

3.2.2.2. Πειραματική διαδικασία

Μετά την μέτρηση και την λήψη των αποτελεσμάτων από τις πλάκες για την δοκιμασία MIC ακολουθήθηκε η μέθοδος MBC. Η διαδικασία είχε ως εξής: το replicator, ένα όργανο που χρησιμοποιείται για τη μεταφορά μικρών όγκων ενοφθαλμίσματος σε μικροπλάκες ή στερεές καλλιέργειες και αποτελείται από 96 προεξοχές από ανοξείδωτο χάλυβα για να είναι ανθεκτικό στην αποστείρωση με φλόγα, αποστειρώθηκε πάνω από τον λύχνο Bunsen. Μόλις οι ακίδες κρύωσαν, το replicator τοποθετήθηκε στην 96-well- plate με τέτοιο τρόπο ώστε κάθε μια από τις ακίδες να εμβαπτιστεί σε ένα από τα πηγαδάκια της πλάκας που της αντιστοιχεί. Στην συνέχεια ακόμη κάτω από τον λύχνο, για να παραμείνουν στείρες οι συνθήκες, ανοίχθηκε ένα τετράγωνο τρυβλίο με άγαρ Muller-Hinton και τοποθετήθηκε πάνω του το replicator πάνω στο οποίο ασκήθηκε ελαφριά πίεση χωρίς όμως να τρυπηθεί το άγαρ. Το replicator στην συνέχεια τοποθετήθηκε σε αλκοόλη και επαναλήφθηκε η διαδικασία αποστείρωσής του. Τα τρυβλία στην συνέχεια επώαστηκαν overnight (16h) ανάποδα

στον κλίβανο επώασης που ήταν ρυθμισμένος στους 37°C. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται προκειμένου να ταυτοποιηθεί 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, αναμένεται ανάπτυξη στο τρυβλίο σε τιμές ίσες με το MIC ή μεγαλύτερες, καθώς τα αδρανοποιημένα βακτήρια παρουσία πλέον ευνοϊκών συνθηκών μπορούν να αναπτυχθούν και να δημιουργήσουν αποικίες.

3.2.3. Εκτίμηση των μηχανισμών της αντιμικροβιακής δράσης των μελιών μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (minimum inhibitory concentration) με την χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (microtiter plates) με την προσθήκη α) καταλάσης και β) πρωτεΐνάσης K

Με αυτή τη μέθοδο δοκιμάστηκαν όσα μέλια έδωσαν όμοια ή καλύτερα αποτελέσματα από το μέλι Manuka για κάθε εξεταζόμενο βακτήριο. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ακόμη αυτή του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (minimum inhibitory concentration) με την χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (microtiter plates).

3.2.3.1. Αρχή της μεθόδου

Χρησιμοποιήθηκε η *in vitro* μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) σε αποστειρωμένες μικροπλάκες (microplates) πολυστερίνης 96 θέσεων (96-wells), μετά την προσθήκη α) καταλάσης και β) πρωτεΐνάσης K. Μέσω της προσθήκης καταλάσης στο μέλι μπορεί να προσδιοριστεί εάν η αντιβακτηριακή δράση του εκάστοτε μελιού οφείλεται στο υπεροξειδίο του υδρογόνου (Paulus H.S. Kwakman et al 2010). Αντίστοιχα μέσω της προσθήκης πρωτεΐνάσης K μπορεί να προσδιοριστεί

εάν η αντιβακτηριακή δράση οφείλεται σε αντιβακτηριακές πρωτεΐνες ή ολιγοπεπτίδια του εκάστοτε μελιού (Mundo et al 2004).

Ο προσδιορισμός του MIC έγινε όπως περιγράφηκε στην ενότητα 3.2.1. Και σε αυτή την περίπτωση για την μέτρηση της ανάπτυξης των βακτηρίων οι μικροπλάκες τοποθετήθηκαν στο microplate reader (ELx808 Absorbance Microplate Reader, BioTek) το οποίο ήταν συνδεδεμένο με έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η μέτρηση έγινε στα 600 nm. Για την ανάλυση των οπτικών απορροφήσεων των καλλιιεργειών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Gen5™ Data Analysis Software (BioTek).

3.2.3.2 Πειραματική διαδικασία

Το πρώτο βήμα, το οποίο είναι ίδιο με την διαδικασία που παρουσιάστηκε στην ενότητα 3.2.1, ήταν η προετοιμασία των καλλιιεργειών των βακτηρίων χρησιμοποιώντας καλλιιεργειες (glycerol stock) που διατηρούνται στους -80°C . Υπό την παρουσία λύχνου Bunsen και ασηπτικό επομένως περιβάλλον λήφθηκε μια μικρή ποσότητα του εκάστοτε βακτηρίου από την καλλιιεργεια stock και τοποθετήθηκε σε vial με θρεπτικό υπόστρωμα Luria-Bertani Broth (LB Broth) (5 ml). Τα vials τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα overnight στους 37°C και υπό ανάδευση (incubator shaker) στις 210 στροφές. Στη συνέχεια οι καλλιιεργειες αραιώθηκαν μέχρι την παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος (inoculum) θολερότητας ίσης με 0,5 McFarland (περίπου $1,5 \times 10^8$ cfu/ml). Η μέτρηση οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm έγινε με τη χρήση φασματοφωτόμετρου μέχρι την επίτευξη τελικής απορρόφησης τιμής 0,132 που αντιστοιχεί σε 0,5 McFarland (περίπου $1,5 \times 10^8$ cfu/ml). Για κάθε ένα από τα προς εξέταση μέλια δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις (50% v/v, 25% v/v, 12,5% v/v, 6,25% v/v, 3,125% v/v, 1,56% v/v) για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης.

A) *Καταλάση*: Το stock καταλάσης (Paulus H.S. Kwakman et al 2010), (33.000 U/ml) έγινε με διάλυση 30mg σκόνη καταλάσης από συκώτι βοοειδούς (SERNA) σε 10 ml Phosphate buffer (pH 7.4). Στη συνέχεια, σε eppendorf των 2ml που περιείχε 1,5 ml μελιού αραιώσης 50% v/v (750 μl μέλι + 750 μl Muller Hinton Broth), συμπεριλαμβανομένου και του μελιού Manuka, προστέθηκαν 30 μl από το stock ώστε η τελική συγκέντρωση καταλάσης να είναι 600 U/ml. Το eppendorf τοποθετήθηκε σε

επωαστήρα υπό ανάδευση (incubator shaker) overnight στους 37°C στις 210 στροφές και στη συνέχεια έγιναν οι υπόλοιπες 6 διαδοχικές αραιώσεις με την κλασική μέθοδο αραιώσεων που παρουσιάστηκε.

B) *Πρωτεΐνωση K*: για το stock πρωτεΐνωσης K συγκέντρωσης 10 mg/ml, έγινε διάλυση 10 mg από την πρωτεΐνωση K σε σκόνη (HT Biotechnology LTD) σε 1 ml απιονισμένο νερό. Έπειτα ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την προσθήκη καταλάσης.

Το κάθε δείγμα μελιού που περιείχε την καταλάση και την πρωτεΐνωση K αραιώθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο αραιώσεων που παρουσιάστηκε στην ενότητα 3.2.1. Από το Eppendorf που περιείχε το κατά 50% αραιωμένο μέλι μετρήθηκαν 750μl και προστέθηκε στο περιεχόμενο του δεύτερου Eppendorf που περιείχε 750μl θρεπτικό, δημιουργώντας την συγκέντρωση 25%. Η διαδικασία αυτή συνεχίστηκε μέχρι το τελευταίο Eppendorf. σαν αποτέλεσμα πάρθηκαν 6 Eppendorf με τις εξής αραιώσεις: 50% v/v, 25% v/v, 12,5% v/v, 6,25% v/v, 3,125% v/v, 1,56% v/v. Σε μια πλάκα καλλιέργειας 96 θέσεων γεμίσθηκαν τα «πηγαδάκια» με 190μl των δειγμάτων. Σε κάθε πλάκα έγινε έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης των μελιών, με το κάθε δείγμα να έχει τρεις επαναλήψεις καθώς και δύο επαναλήψεις του μελιού Manuka. Τέλος δύο σειρές από 6 πηγαδάκια λειτούργησαν σαν θετικό control (Θρεπτικό Muller Hinton μαζί με καλλιέργεια βακτηρίων) και αρνητικό control (Θρεπτικό Muller Hinton).

Η μικροπλάκα στη συνέχεια τοποθετήθηκε στο Elx808 Absorbance Microplate Reader και έγινε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm (t=0). Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν και καταγράφηκαν από το λογισμικό Gen5™ Data Analysis Software. Στη συνέχεια η μικροπλάκα τοποθετήθηκε σε επωαστήρα (binder/incubator) στους 37°C overnight. Μετά από την επώαση των 24 ωρών η πλάκα τοποθετήθηκε ξανά στο 96 well plate reader και ακολούθησε μια δεύτερη ανάγνωση από το Absorbance Microplate Reader (t=24). Τα αποτελέσματα καταγράφηκαν ως αρχεία Microsoft excel και βρέθηκε η ελάχιστη συγκέντρωση όπου το βακτήριο αναστέλλεται (MIC), αφαιρώντας τις τιμές που πήραμε του χρόνου t=24 από αυτές του t=0.

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4. Εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης δειγμάτων μελιού μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) και της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC) με χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (microtiter plates)

Με τη μέθοδο της μικροτιτλοποίησης προσδιορίστηκε η ελάχιστη συγκέντρωση των μελιών που απαιτείται για την αναστολή των εκάστοτε βακτηρίων. Όλα τα μέλια εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις των 50%v/v, 25%v/v, 12,5%v/v, 6,25%v/v, 3,125%v/v και 1,56%v/v. Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων όλων των δειγμάτων για το κάθε βακτήριο.

4.1.1 *Staphylococcus aureus*

Κωδικός δείγματος	MIC	MBC
1	6.25%	6.25%
2	6.2%	6.25%
3	6.25%	12.5%
140	6.25%	6.25%
142	6.25%	6.25%
145	6.25%	6.25%
146	3.125%	3.125%
147	3.125%	3.125%
152	6.25%	6.25%
153	6.25%	6.25%
218	12.5%	12.5%

224	3.125%	3.125%
Manuka	3.125%	3.125%

4.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Κωδικός δείγματος	MIC	MBC
1	12.5%	12.5%
2	12.5%	12.5%
3	12.5%	12.5%
140	12.5%	12.5%
142	12.5%	12.5%
145	6.25%	6.25%
146	6.25%	6.25%
147	6.25%	6.25%
152	12.5%	12.5%
153	12.5%	12.5%
218	25%	25%
224	12.5%	12.5%
Manuka	12.5%	12.5%

4.1.3 *Salmonella Typhimurium*

Κωδικός δείγματος	MIC	MBC
1	6.25%	6.25%
2	12.5%	12.5%
3	12.5%	12.5%
140	12.5%	12.5%
142	12.5%	12.5%
145	12.5%	12.5%
146	6.25%	6.25%
147	6.25%	6.25%
152	12.5%	12.5%
153	12.5%	12.5%
218	25%	50%
224	6.25%	12.5%
Manuka	6.25%	6.25%

4.1.4 *Klebsiella pneumoniae*

Κωδικός δείγματος	MIC	MBC
1	12.5%	12.5%
2	12.5%	12.5%
3	12.5%	12.5%
140	25%	25%
142	12.5%	12.5%

145	12.5%	12.5%
146	12.5%	12.5%
147	6.25%	6.25%
152	12.5%	12.5%
153	12.5%	12.5%
218	25%	25%
224	6.25%	6.25%
Manuka	6.25%	6.25%

4.1.5 *Citrobacter freundii*

Κωδικός δείγματος	MIC	MBC
1	6.25%	6.25%
2	12.5%	12.5%
3	12.5%	12.5%
140	6.25%	6.25%
142	6.25%	6.25%
145	6.25%	6.25%
146	6.25%	6.25%
147	6.25%	6.25%
152	6.25%	6.25%
153	6.25%	6.25%
218	25%	25%
224	6.25%	6.25%

Manuka	6.25%	6.25%
--------	-------	-------

4.1.6 *Acinetobacter baumannii*

Κωδικός δείγματος	MIC	MBC
1	12.5%	12.5%
2	12.5%	12.5%
3	12.5%	12.5%
140	12.5%	12.5%
142	12.5%	12.5%
145	6.25%	6.25%
146	12.5%	12.5%
147	6.25%	6.25%
152	12.5%	12.5%
153	12.5%	12.5%
218	25%	25%
224	12.5%	12.5%
Manuka	6.25%	6.25%

4.1.7 *Streptococcus mutans*

Κωδικός δείγματος	MIC	MBC
1	25%	25%
2	25%	25%
3	25%	25%
140	25%	25%
142	12.5%	12.5%
145	12.5%	12.5%
146	12.5%	12.5%
147	12.5%	12.5%
152	25%	25%
153	25%	25%
218	25%	25%
224	25%	25%
Manuka	6.25%	6.25%

4.2 Εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης δειγμάτων μελιτος μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) με χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (microtiter plates) μετά την προσθήκη α) καταλάσης και β) πρωτεΐνάσης K

Με τη μέθοδο της μικροτιτλοποίησης προσδιορίστηκε η ελάχιστη συγκέντρωση των μελιών που απαιτείται για την αναστολή της ανάπτυξης του εκάστοτε βακτηρίου με την προσθήκη α) καταλάσης και β) πρωτεΐνάσης K. Όσα από τα 12 δείγματα που ελέγχθηκαν για αντιβακτηριακή δράση μέσω προσδιορισμού MIC είχαν ίδια ή καλύτερη δράση από το μέλι Manuka ελέγχθηκαν και στη συνέχεια για τον πιθανό μηχανισμό δράσης, μέσω προσθήκης α) καταλάσης και β) πρωτεΐνάσης K. Τα

αποτελέσματα συνοψίζονται στους παρακάτω πίνακες. Τα μέλια εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις των 50%v/v, 25%v/v, 12,5%v/v, 6,25%v/v, 3,125%v/v και 1,56%v/v.

<i>Staphylococcus aureus</i>	Αρχικό MIC	ΚΑΤΑΛΛΑΣΗ (MIC)	ΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗ Κ (MIC)
146	3,125%	25%	6,25%
147	3,125%	25%	6,25%
224	3,125%	25%	12,5%
Manuka	3,125%	3,125%	3,125%

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Αρχικό MIC	ΚΑΤΑΛΛΑΣΗ (MIC)	ΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗ Κ (MIC)
145	6,25%	25%	12,5%
146	6,25%	25%	12,5%
147	6,25%	12,5%	12,5%
Manuka	12,5%	12,5%	12,5%

<i>Salmonella tTyphimurium</i>	Αρχικό MIC	ΚΑΤΑΛΛΑΣΗ (MIC)	ΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗ Κ (MIC)
146	6,25%	25%	12,5%
147	6,25%	25%	12,5%
224	6,25%	25%	25%
Manuka	6,25%	6,25%	6,25%

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Αρχικό MIC	ΚΑΤΑΛΛΑΣΗ (MIC)	ΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗ Κ (MIC)
147	6,25%	25%	12,5%
224	6,25%	25%	25%
Manuka	6,25%	6,25%	6,25%

<i>Citrobacter freundii</i>	Αρχικό MIC	ΚΑΤΑΛΛΑΣΗ (MIC)	ΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗ Κ (MIC)
145	6,25%	12,5%	12,5%
147	6,25%	12,5%	12,5%
224	6,25%	25%	12,5%
Manuka	6,25%	6,25%	6,25%

<i>Acinetobacter baumannii</i>	Αρχικό MIC	ΚΑΤΑΛΑΣΗ (MIC)	ΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗ Κ (MIC)
145	6,25%	12,5%	12,5%
147	6,25%	25%	12,5%
Manuka	6,25%	6,25%	6,25%

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες είναι σημαντικοί στην αντιμετώπιση μολυσματικών ασθενειών παγκοσμίως. Ωστόσο, καθώς αναπτύσσονται και εξαπλώνονται ανθεκτικά παθογόνα, η αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών μειώνεται. Αυτός ο τύπος βακτηριακής αντοχής στους αντιμικροβιακούς παράγοντες αποτελεί πολύ σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία. Ως εκ τούτου, χρειάζονται επείγοντως εναλλακτικές αντιμικροβιακές στρατηγικές. Αυτή η κατάσταση οδήγησε σε επαναξιολόγηση της θεραπευτικής χρήσης αρχαίων φαρμάκων, όπως τα φυτά και τα φυτικά προϊόντα, συμπεριλαμβανομένου του μελιού.

Η χρήση της παραδοσιακής ιατρικής εφαρμόζεται από την αρχή της ανθρωπότητας και το μέλι που παράγεται από τις μέλισσες *Apis mellifera* είναι από τα παλαιότερα παραδοσιακά φάρμακα και θεωρείται σημαντικό για τη αντιμετώπιση πολλών ανθρώπινων παθήσεων.

Το μέλι από το φυτό *Leptospermum scoparium* (Manuka) έχει μελετηθεί ευρέως για την αντιβακτηριακή του ικανότητα, η οποία οφείλεται στο μόριο μεθυλγυοξάλη. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχουν αυξηθεί σημαντικά οι έρευνες πάνω σε τοπικά, όχι τόσο γνωστά σε ευρεία κλίμακα μέλια και έχει αποφανθεί πως μπορούν να έχουν ίδια ή και καλύτερη δράση έναντι βακτηρίων.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της αντιβακτηριακής δράσης 12 δειγμάτων μελιού διαφορετικής βοτανικής προέλευσης από διαφορετικές περιοχές της Κρήτης, έναντι των νοσοκομειακών και τροφιμογενών βακτηρίων *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter baumannii* και *Streptococcus mutans*. Η αντιβακτηριακή τους δράση μελετήθηκε συγκρινόμενη με αυτή του μελιού Manuka. Οι τεχνικές προσδιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν δύο διαφορετικές, η τεχνική MIC και η τεχνική MBC για τον προσδιορισμό της ελάχιστης συγκέντρωσης των δειγμάτων του μελιού στα οποία τα βακτήρια αναστέλλονται και «θανατώνονται» αντίστοιχα, ενώ ελέγχθηκε παράλληλα και ο μηχανισμός της αντιβακτηριακής ικανότητας μέσω της προσθήκης καταλάσης, η οποία υποδεικνύει ότι το υπεροξειδίο του υδρογόνου συμβάλλει στην αντιβακτηριακή δράση, και πρωτεΐνης K η οποία

επιβεβαιώνει πως πρωτεΐνες ή ολιγοπεπτίδια που βρίσκονται στο μέλι συμβάλλουν στην αντιβακτηριακή δράση του μελιού.

Όσον αφορά την τεχνική MIC, αντιβακτηριακή δράση έναντι του βακτηρίου:

- ***S. aureus*** εμφάνισαν και τα δώδεκα από τα υπό μελέτη μέλια. Συγκεκριμένα όλα τα μέλια έδωσαν MIC μεγαλύτερο από αυτό του Manuka (12,5% v/v και 6,25% v/v) εκτός από τα δείγματα 146, 147 και 224 τα οποία έδωσαν MIC 3,125% v/v, ίδιο με αυτό του Manuka και άρα αντίστοιχη ανασταλτική δράση.
- ***P. aeruginosa*** εμφάνισαν και τα δώδεκα υπό μελέτη μέλια. Συγκεκριμένα ένα μόνο μέλι έδωσε MIC μεγαλύτερο από αυτό του Manuka (25% v/v) και τα περισσότερα εμφάνισαν παρόμοια ανασταλτική δράση με αυτή του μελιού Manuka. Ωστόσο τρία από τα μέλια που μελετήθηκαν έδωσαν MIC 6,25% v/v, δηλαδή μικρότερο από αυτό του Manuka (145,146 και 147) συνεπώς εμφανίζουν ισχυρότερη αντιβακτηριακή δράση έναντι του συγκεκριμένου βακτηρίου.
- ***Salmonella typhimurium*** εμφάνισαν και τα δώδεκα από τα μέλια. Συγκεκριμένα όλα τα μέλια έδωσαν MIC μεγαλύτερο από αυτό του Manuka (25% v/v και 12,5% v/v) εκτός από τα δείγματα 1, 146 και 147 τα οποία έδωσαν MIC 6,25% v/v, ίδιο με αυτό του Manuka και άρα εμφανίζουν αντίστοιχη ανασταλτική δράση.
- ***Klebsiella pneumonia*** εμφάνισαν και τα δώδεκα από τα μέλια. Συγκεκριμένα όλα τα μέλια έδωσαν MIC μεγαλύτερο από αυτό του Manuka (25% v/v και 12,5% v/v) εκτός από τα δείγματα 147 και 224 τα οποία έδωσαν MIC 6,25% v/v, ίδιο με αυτό του Manuka και άρα εμφανίζουν αντίστοιχη ανασταλτική δράση.
- ***Citrobacter freundii*** εμφάνισαν και τα δώδεκα από τα μέλια. Συγκεκριμένα πέντε από τα μέλια έδωσαν MIC μεγαλύτερο από αυτό του Manuka (25% v/v και 12,5% v/v) εκτός από τα δείγματα 1,142,145,146,147,152 και 224 τα οποία έδωσαν MIC 6,25% v/v, ίδιο με αυτό του Manuka και άρα εμφανίζουν αντίστοιχη ανασταλτική δράση.
- ***Acinetobacter baumannii*** εμφάνισαν και τα δώδεκα από τα μέλια. Συγκεκριμένα όλα τα μέλια έδωσαν MIC μεγαλύτερο από αυτό του Manuka (25% v/v και 12,5% v/v) εκτός από τα δείγματα 145 και 147 τα οποία έδωσαν MIC 6,25% v/v, ίδιο με αυτό του Manuka και άρα εμφανίζουν αντίστοιχη ανασταλτική δράση.
- ***Streptococcus mutans*** εμφάνισαν και τα δώδεκα από τα μέλια, αλλά σε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση μελιού. Συγκεκριμένα όλα τα μέλια έδωσαν MIC μεγαλύτερο από αυτό του Manuka (25% v/v και 12,5% v/v).

Σύμφωνα με τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η πλειοψηφία των δειγμάτων που ελέγχθηκαν είχε παρόμοια δράση με αυτή του μελιού Manuka, γεγονός που επιβεβαιώνει την αρχική υπόθεση ότι το μέλι γενικώς μπορεί να έχει ισχυρή αντιβακτηριακή δράση. Τα δείγματα 145,146 και 147 φαίνεται να έχουν την μεγαλύτερη αντιβακτηριακή δράση από τα υπό μελέτη μέλια συνολικά αφού αναστέλλουν επαρκώς όλα τα βακτήρια, με το 147 να είναι το πιο δραστικό. Επίσης μπορεί να υποτεθεί πως σημαντικό ρόλο μπορεί να παίζει τόσο η βοτανική όσο και η γεωγραφική προέλευση αφού και τα τρία αυτά δείγματα είναι μέλια που προέρχονται από θυμάρι ενώ το δείγμα 147 είναι το μοναδικό δείγμα που προέρχεται από την περιοχή του Ρεθύμνου.

Μέσω της μεθόδου MBC (minimum bactericidal concentration) αποδείχθηκε πως στα περισσότερα δείγματα η ελάχιστη συγκέντρωση που προκαλεί την αναστολή των βακτηρίων είναι ίδια με την βακτηριοκτόνο συγκέντρωση. Τρεις ήταν οι εξαιρέσεις, το δείγμα 3 κατά τον έλεγχο του βακτηρίου *S. aureus* το οποίο είχε MIC 6,25% v/v και MBC 12,5% v/v και τα δείγματα 218 με MIC 25% v/v και MBC 50% v/v και 224 με MIC 6,25% v/v και MBC 12,5% v/v στο βακτήριο *Salmonella typhimurium*. Τα παραπάνω αποδεικνύουν ότι χρειάζεται μεγαλύτερη συγκέντρωση των συγκεκριμένων μελιών προκειμένου τα αντίστοιχα βακτήρια να ανασταλούν πλήρως.

Όσον αφορά τους μηχανισμούς δράσης φάνηκε ότι σε όλα τα μέλια σημαντικό ρόλο στην αντιβακτηριακή του δράση των μελιών παίζει το υπεροξειδίο του υδρογόνου αλλά και πρωτεΐνες ή ολιγοπεπτίδια που υπάρχουν σε αυτά καθώς μετά την προσθήκη καταλάσης και πρωτεΐνάσης K αντίστοιχα το MIC αυξήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις.

Είναι γνωστή η συσχέτιση μεταξύ της έντασης του χρώματος που διαθέτουν τα μέλια και της αντιοξειδωτικής τους δράσης, καθώς τα μέλια με πιο σκούρο χρώμα έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικά και αντιοξειδωτικούς παράγοντες από ότι τα μέλια με πιο ανοιχτό χρώμα. Τα μέλια οφείλουν το χρώμα τους σε χρωστικές όπως τα καροτενοειδή και τα φλαβονοειδή που εμπεριέχονται σε αυτά, τα οποία εξαρτώνται τόσο από τη γεωγραφική όσο και τη βοτανική προέλευση των μελιών (Al-Farsi et al., 2018). Παρατηρήθηκε λοιπόν ότι τα δείγματα μελιών που εμφάνισαν τις υψηλότερες αντιβακτηριακές ιδιότητες (145,146,147) διέθεταν αρκετά σκούρο χρώμα που πιθανόν

αντανεκλά την υψηλή συγκέντρωση φυτοχημικών όπως οι φαινόλες και τα φλαβονοειδή τα οποία συμβάλλουν στην αντιμικροβιακή δράση του μελιού.

Συμπερασματικά, από τη στιγμή που όλα τα μέλια που εξετάστηκαν εμφάνισαν αντιβακτηριακή δράση θα ήταν ωφέλιμο να θεωρηθούν τα κρητικά μέλια ως ένα λειτουργικό τρόφιμο και επιπλέον πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω ώστε πιθανόν να αποτελέσουν πηγή φαρμακευτικών προϊόντων, ειδικά σε μια εποχή που τα βακτήρια καθίστανται ολοένα και πιο ανθεκτικά σε αντιβιοτικά.

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Ahmed, Sarfraz, et al. "Honey as a Potential Natural Antioxidant Medicine: An Insight into Its Molecular Mechanisms of Action." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2018, 2018, pp. 1–19.
2. Al-Eqabi, S. R. S., & Al-Abedi, G. J. K. (2021). Pathological, Immunological, and Hematological Parameters Associated with Experimental Infection of *Citrobacter Freundii* in Rabbits. *Archives of Razi Institute*, 76(6), 1607.
3. Al-Farsi, Mohamed et al. "Color, flavonoids, phenolics and antioxidants of Omani honey." *Heliyon* vol. 4,10 e00874. 21 Oct. 2018.
4. Alqarni, Abdulaziz S., et al. "Mineral Content and Physical Properties of Local and Imported Honeys in Saudi Arabia." *Journal of Saudi Chemical Society*, vol. 18, no. 5, 2014, pp. 618–625.
5. Alvarez-Suarez J. M. , Tulipani S. , Romandini S. , Bertoli E. , Battino M., 2010, Contribution of honey in nutrition and human health: a review, *Mediterr J Nutr Metab* 3:15–23
6. Alvarez-Suarez, José M et al. "The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey." *Foods (Basel, Switzerland)* vol. 3,3 420-432. 21 Jul. 2014.
7. Alvarez-Suarez, José M., et al. "Phenolics from Monofloral Honeys Protect Human Erythrocyte Membranes against Oxidative Damage." *Food and Chemical Toxicology*, vol. 50, no. 5, 2012, pp. 1508–1516.
8. Al-Waili, Noori S. "Topical honey application vs. acyclovir for the treatment of recurrent herpes simplex lesions." *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* vol. 10,8 (2004): MT94- 8
9. Alzahrani A. H. , Alsabehi R. , Boukraâ L. , Abdellah F. , Bellik Y. and Bakhotmah A. B. , 2012, Antibacterial and Antioxidant Potency of Floral Honeys from Different Botanical and Geographical Origins, *Molecules*, 17
10. 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.

11. Anthimidou E. and Mossialos D. , 2012, Antibacterial activity of Greek and Cypriot honeys against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in comparison to Manuka honey, *Journal of medicinal food* 16 (1): 42-47
12. Avilés-Reyes, A., Freires, I. A., Kajfasz, J. K., Barbieri, D., Miller, J. H., Lemos, J. A., & Abranches, J. (2018). Whole genome sequence and phenotypic characterization of a Cbm⁺ serotype e strain of *Streptococcus mutans*. *Molecular Oral Microbiology*, 33(3), 257.
13. Blair, S., Cokcetin, N., Harry, E., & Carter, D. (2009). The unusual antibacterial activity of medical-grade *Leptospermum* honey: antibacterial spectrum, resistance and transcriptome analysis. *European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 28(10), 1199-1208
14. Carnwath R., Graham E.M., Reynolds K., Pollock P.J., 2014, The antimicrobial activity of honey against common equine wound bacterial isolates, *The Veterinary Journal* 199 :110–114
15. Castro-Vázquez, Lucia et al. “Volatile composition and contribution to the aroma of Spanish honeydew honeys. Identification of a new chemical marker.” *Journal of agricultural and food chemistry* vol. 54,13 (2006): 4809-13.
16. Cooper RA, Molan PC, 1999 The use of honey as an antiseptic in managing *Pseudomonas* infection. *J. Wound Care* 8 (4) 161-164
17. Cooper RA, Molan PC, Harding KG (1999) Bactericidal activity of different types of honey against clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* *J R Soc Med* 1999 92: 283
18. Cooper RA, Molan PC, Harding KG, 1999. Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. *Journal of Royal Society of Medicine* 92, 283– 285
19. Cooper, R., Jenkins, L., Henriques, A., Duggan, R., & Burton, N. (2010). Absence of bacterial resistance to medical-grade manuka honey. *European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 29(10), 1237-1241
20. Cortes 2011
21. Cortés, M. E., Vigil, P., & Montenegro, G. (2011). The medicinal value of honey: a review on its benefits to human health, with a special focus on its effects on glycemic regulation. *Ciencia e Investigación Agraria*, 38(2), 303–317.
22. da Silva, Priscila Missio et al. “Honey: Chemical composition, stability and authenticity.” *Food chemistry* vol. 196 (2016): 309-23.

23. di Girolamo, F., D'Amato, A., & Righetti, P. G. (2012). Assessment of the floral origin of honey via proteomic tools. *Journal of Proteomics*, 75(12), 3688–3693.
24. Dżugan, M., Tomczyk, M., Sowa, P., & Grabek-Lejko, D. (2018). Antioxidant Activity as Biomarker of Honey Variety. *Molecules*, 23(8), 2069
25. Eleftheriou, E., Tsiripidis, I., Karabournioti, S. (2009). Melissopalynological attributes of some Greek thyme honeys. *Journal of Apicultural Research*, 48(2), 104-114.
26. Eraslan, Gökhan et al. “Beneficial effect of pine honey on trichlorfon induced some biochemical alterations in mice.” *Ecotoxicology and environmental safety* vol. 73,5 (2010): 1084-91.
27. Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., & Wahab, M. S. (2012). Honey: A Novel Antioxidant. *Molecules*, 17(4), 4400-4423
28. Escuredo, O., Dobre, I., Fernandez-Gonzalez, M., & Seijo, M. C. (2014). Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chemistry*, 149, 84-90.
29. Esposito, Susanna et al. “Enterovirus D68 Infection.” *Viruses* vol. 7,11 6043- 50. 24 Nov. 2015.
30. Eteraf-Oskouei, Tahereh, and Moslem Najafi. “Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: a review.” *Iranian journal of basic medical sciences* vol. 16,6 (2013): 731-742.
31. Ewnetu et al., 2013, Antibacterial effects of *Apis mellifera* and stingless bees honeys on susceptible and resistant strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* in Gondar, Northwest Ethiopia. *BMC Complementary and Alternative Medicine*
32. Gabe, V., Zeidan, M., Kacergius, T., Bratchikov, M., Falah, M., & Rayan, A. (2020). Lauryl Gallate Activity and *Streptococcus mutans*: Its Effects on Biofilm Formation, Acidogenicity and Gene Expression. *Molecules*, 25(16), 3685.
33. Gomez-Caravaca AM, Gomez-Romero M, Arraez-Roman D, Segura-Carretero A, Gutierrez F, 2006 advances A in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*. 2006; 41:1220–1234
34. Henriques A.F. & Jenkins R.E. & Burton N.F. & Cooper R.A., 2010 The intracellular effects of manuka honey on *Staphylococcus aureus* *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29:45–50

35. Iglesias, M. Teresa, et al. "Changes in the Free Amino Acid Contents of Honeys During Storage at Ambient Temperature." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 24, 2006, pp. 9099–9104.
36. Israili, Zafar H. "Antimicrobial Properties of Honey." *American Journal of Therapeutics*, vol. 21, no. 4, 2014, pp. 304–323.
37. Johnston, Matthew et al. "Antibacterial activity of Manuka honey and its components: An overview." *AIMS microbiology* vol. 4,4 655-664. 27 Nov. 2018.
38. Karabagias, Ioannis K et al. "Botanical discrimination of Greek unifloral honeys with physico-chemical and chemometric analyses." *Food chemistry* vol. 165 (2014): 181-190.
39. Kato, Yoji et al. "Plausible authentication of manuka honey and related products by measuring leptosperin with methyl syringate." *Journal of agricultural and food chemistry* vol. 62,27 (2014): 6400-7.
40. Khan MO, Montecalvo MA, Davis I, Wormser GP (2000) Ecthyma gangrenosum in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Cutis* 66:121-123
41. Kronka, J., Cooper, R., & Maddocks, S. (2013). Manuka honey inhibits siderophore production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*, 115(1), 86- 90.
42. Kwakman H. S. P. and Zaat A. J. S. , January 2012, Antibacterial Components of Honey, *IUBMLife*, 64(1): 48–55
43. Kwakman H. S. P., Velde A. A., Boer L., Speijer D., VandebrouckeGrauls M. J. E. C. and Zaat A. J. S., 2010, How honey kills bacteria *FASEB Journal*. 24, 2576–2582
44. 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.
45. 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
46. León-Ruiz, Virginia, et al. "Analysis of Water-Soluble Vitamins in Honey by Isocratic RP-HPLC." *Food Analytical Methods*, vol. 6, no. 2, 2012, pp. 488– 496.

47. Lerrer, B., Zinger-Yosovich, K., Avrahami, B., & Gilboa-Garber, N. (2007). Honey and royal jelly, like human milk, abrogate lectin-dependent infection-preceding *Pseudomonas aeruginosa* adhesion. *The ISME Journal*, 1(2), 149-155
48. Lin, Derong, et al. "An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes." *Molecules*, vol. 21, no. 10, 2016, p. 1374.
49. Lin, JY., Kung, YA. & Shih, SR. Antivirals and vaccines for Enterovirus A71. *J Biomed Sci* 26, 65 (2019).
50. Liu, L., Chen, D., Liu, L., Lan, R., Hao, S., Jin, W., Sun, H., Wang, Y., Liang, Y., & Xu, J. (2018). Genetic Diversity, Multidrug Resistance, and Virulence of *Citrobacter freundii* From Diarrheal Patients and Healthy Individuals. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(JUL), 233.
51. Lusby, P. E., Coombes, A. L., & Wilkinson, J. M. (2005). Bactericidal Activity of Different Honeys against Pathogenic Bacteria. *Archives of Medical Research*, 36(5), 464-467.
52. Machado De-Melo, A. A., Almeida-Muradian, L. B. de, Sancho, M. T., & Pascual-Maté, A. (2017). Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1338444>, 57(1), 5–37.
53. 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
54. Maddocks, S., Lopez, M., Rowlands, R., & Cooper, R. (2012). Manuka honey inhibits the development of *Streptococcus pyogenes* biofilms and causes reduced expression of two fibronectin binding proteins. *Microbiology*, 158(3), 781-790
55. Majtan, Juraj et al. "Fir honeydew honey flavonoids inhibit TNF- α -induced MMP-9 expression in human keratinocytes: a new action of honey in wound healing." *Archives of dermatological research* vol. 305,7 (2013).
56. Mandal, Manisha Deb, and Shyamapada Mandal. "Honey: Its Medicinal Property and Antibacterial Activity." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 1, no. 2, 2011, pp. 154–160.
57. 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.

58. Mato, Inés, et al. “Rapid Determination of Nonaromatic Organic Acids in Honey by Capillary Zone Electrophoresis with Direct Ultraviolet Detection.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 5, 2006, pp. 1541– 1550
59. Miguel, M G et al. “Honey as a Complementary Medicine.” *Integrative medicine insights* vol. 12 1178633717702869. 24 Apr. 2017.
60. Molan PC. 1992 The antibacterial activity of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World* 1992; 73:5-28
61. Mundo MA, Padilla-Zakour OI, Worobo RW, 2004 Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys, *Cornell University, USA* 97(1):1-8
62. Patel, Seema, and Simon Cichello. “Manuka honey: an emerging natural food with medicinal use.” *Natural Products and Bioprospecting* vol. 3,4 121–128. 5 Jul. 2013.
63. Patton T, Barrett J, Brennan J, Moran N, 2006 Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey, *Institute of technology Sligo, IT Sligo, Ballinode, Sligo, Ireland* 64(1):84-95
64. Pohl, Pawel, et al. “Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn from Commercial Bee Honeys.” *Food Chemistry*, vol. 134, no. 1, 2012, pp. 392– 396.
65. Ramsamy, Y., Mlisana, K. P., Amoako, D. G., Allam, M., Ismail, A., Singh, R., Abia, A. L. K., & Essack, S. Y. (2020). Pathogenomic Analysis of a Novel Extensively Drug-Resistant *Citrobacter freundii* Isolate Carrying a bla_{NDM-1} Carbapenemase in South Africa. *Pathogens*, 9(2).
66. S. K. Jaganathan and M. Mandal (2009) Honey constituents and their apoptotic effect in colon cancer cells, *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, vol. 1, no. 2, pp. 29–36, 2009.
67. Sak bosnar sakac
68. Sakač, N., & Sak-Bosnar, M. (2012). A rapid method for the determination of honey diastase activity. *Talanta*, 93, 135–138.
69. Samarghandian, Saeed et al. “Honey and Health: A Review of Recent Clinical Research.” *Pharmacognosy research* vol. 9,2 (2017): 121-127.
70. Shahzad, Aamir, and Randall J Cohrs. “In vitro antiviral activity of honey against varicella zoster virus (VZV): A translational medicine study for potential remedy for shingles.” *Translational biomedicine* vol. 3,2 (2012)

71. Shekilango, S.G, R.J Mongi and N.B Shayo (2016) Colour and Antioxidant Activities of Honey From Different Floral Sources and Geographical Origins in Tanzania, Tanzania Journal of Agricultural Sciences Vol.15 No.2, 101-113
72. Sherlock O, Dolan A, Athman R, Power A, Gethin G, Cowman S, Humphreys H, 2010 Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, BMC Complementary and Alternative Medicine 2010, 10:47
73. Stagos, D., Soulitsiotis, N., Tsadila, C., Papaeconomou, S., Arvanitis, C., Ntontos, A., . . Mossialos, D. (2018). Antibacterial and antioxidant activity of different types of honey derived from Mount Olympus in Greece. International Journal of Molecular Medicine
74. Stratton, C. W. (1983). *Pseudomonas aeruginosa*. Infection Control, 4(1), 36-40.
75. Tornuk, F., Karaman, S., Ozturk, I., Toker, O. S., Tastemur, B., & Sagdic, O., et al. (2013) Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. Industrial Crops and Products. 46, 124 – 131.
76. Torre, Donato, et al. “Role of Nitric Oxide in HIV-1 Infection: Friend or Foe?” The Lancet Infectious Diseases, vol. 2, no. 5, 2002, pp. 273–280.
77. Tsadila, C., Nikolaidis, M., Dimitriou, T. G., Kafantaris, I., Amoutzias, G. D., Pournaras, S., & Mossialos, D. (2021). Antibacterial Activity and Characterization of Bacteria Isolated from Diverse Types of Greek Honey against Nosocomial and Foodborne Pathogens. Applied Sciences 2021, Vol. 11, Page 5801, 11(13), 5801.
78. Vica M. , Glevitzky M. , Dumitrel G. , Junie M. & Popa M. , 2014, Antibacterial activity of different natural honeys from Transylvania, Romania, Journal of Environmental Science and Health, Part B 49,176–181
79. Watanabe, Ken, et al. “Anti-Influenza Viral Effects of Honey In Vitro: Potent High Activity of Manuka Honey.” Archives of Medical Research, vol. 45, no. 5, 2014, pp. 359–365.
80. Won, S. A., Li, C., Kim, J., & Rhee, H. (2009). Immunological characterization of honey major protein and its application. Food Chemistry, 113, 1334–1338.
81. Zander E., Maurizio A., 1975 Handbuch der Bienenkunde 6 Der Honig Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer

82. Zeina, Bassam, et al. "Effect of Honey versus Thyme on Rubella Virus Survival in Vitro." *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, vol. 2, no. 3, 1996, pp. 345–348
83. Zenilman, Jonathan M et al. "Phase 1 clinical trials of DAS181, an inhaled sialidase, in healthy adults." *Antiviral research* vol. 123 (2015): 114-9.
84. Θρασυβούλου Α., Μανίκης Ι., Τανανάκη Χ., Τσέλλιος, Καραμπουρνιώτη Σ., Δήμου Μ., 2002, Η ταυτότητα του ελληνικού μελιού, φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που στηρίζουν την ποιότητα του προϊόντος, 1ο Επιστημονικό Συνέδριο Μελισσοκομίας –Σηροτροφίας, Αθήνα, 29 Νοεμβρίου–1 Δεκεμβρίου 2002
85. Θρασυβούλου, Α., Μανίκης, Ι., Τανανάκη, Χ., Τσέλλιος, Καραμπουρνιώτη, Σ., Δήμου, Μ. (2002). Η ταυτότητα του ελληνικού μελιού, φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που στηρίζουν την ποιότητα του προϊόντος. 1ο Επιστημονικό Συνέδριο Μελισσοκομίας – Σηροτροφίας, Αθήνα, 29 Νοεμβρίου – 1 Δεκεμβρίου 2002.
86. Παστρωμάς Ν. (2017) Πευκοθυμαρόμελο Κρήτης ΠΟΠ, Δήμητρα, τεύχος 19, σελ. 8.