

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»



**Τζήκου Αικατερίνη**

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

**Λάρισα, 2013**

# «Απομόνωση και ταυτοποίηση βακτηρίων από το μέλι με αντιμικροβιακή δράση»



Μέλη Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής :

**Μόσιαλος Δημήτριος** : Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Μαρκουλάτος Παναγιώτης** : Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Καρπούζας Δημήτριος** : Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα επίκουρο καθηγητή κύριο Μόσιαλο Δημήτριο, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, την βοήθεια και την καθοδήγησή του, στην εκτέλεση του πειράματος και στη σύνταξη της συγγραφής του.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, κύριο Μαρκουλάτο Παναγιώτη, καθηγητή του Π. Θ. και στο κύριο Καρπούζα Δημήτριο, επίκουρο καθηγητή του Π. Θ. καθώς και στο προσωπικό του εργαστηρίου ιολογίας και μικροβιολογίας, για την βοήθειά τους στην υλοποίηση του πειράματος.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω ιδιαίτερος την υποψήφια διδάκτορα Νικολούλη Κατερίνα που χωρίς την πολύτιμη βοήθειά της δε θα τα είχα καταφέρει.

Τέλος, ευχαριστώ ολόψυχα τον σύζυγό μου και τους γονείς μου, για την αμέριστη ηθική και οικονομική τους στήριξη σε όλη την διάρκεια της μεταπτυχιακής μου διατριβής και για την συμβολή τους στην επιτυχία των προσπαθειών μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
Abstract.....	9
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1. Το μέλι στην αρχαιότητα.....	11
1.2. Η παραγωγή του μελιού.....	12
1.2.1. Η ανατομία μιας μέλισσας.....	12
1.2.2. Διάρκεια ζωής.....	14
1.2.3. Αναζήτηση τροφής.....	14
1.2.4. Αναπαραγωγή.....	14
1.2.5. Η κυψέλη.....	16
1.2.6. Πώς οι μέλισσες φτιάχνουν το μέλι.....	17
1.3. Άλλα προϊόντα που παράγονται από τις μέλισσες.....	19
1.3.1. Το δηλητήριο της μέλισσας.....	21
1.4. Τα είδη του μελιού.....	22
1.5. Τύποι ελληνικού μελιού.....	23
1.6. Τι περιέχει το μέλι και γιατί είναι τόσο μεγάλη η θρεπτική του αξία.....	29
1.7. Αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση.....	30
1.8. Μικροβιακή ποιότητα του μελιού.....	32

1.8.1. Βακτηριακά είδη κλινικής σημασίας.....	32
1.9. Μέλι-πρότυπο με αντιμικροβιακές ιδιότητες: Manuka honey.....	38
1.10. Προβλήματα που δημιουργεί το μέλι στον ανθρώπινο οργανισμό.....	39
1.10.1. Αλλαντίαση-Βοτουλισμός.....	39
1.10.2. Δηλητηριώδη μέλια.....	41
1.11. Σκοπός της εργασίας.....	42
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	43
2.1. Δείγματα μελιών.....	43
2.2. Απομόνωση βακτηρίων από θρεπτικό υπόστρωμα Bacillus cereus medium και από ορεπτικό υπόστρωμα PCA(plate count agar).....	44
2.3.Θρεπτικά υποστρώματα και άλλα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν.....	45
2.4. Διαδικασία καλλιέργειας βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα μέλια.....	51
2.4.1. Αποθήκευση βακτηρίων σε stock γλυκερόλης 25%.....	51
2.4.2. Ανακαλλιέργεια των αποθηκευμένων βακτηρίων.....	52
2.4.3. Επανάληψη των αποτελεσμάτων.....	54
2.4.4.Stock γλυκερόλης.....	55
2.5.Απομόνωση του DNA από τα βακτηριακά στελέχη.....	56
2.5.1. Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανά δείγμα .....	56
2.6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	57
2.7. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	60
2.8. Καθαρισμός προϊόντων PCR .....	60
2.9. Αλληλούχιση του 16S rRNA γονιδίου και ανάλυση των	

αλληλουχιών.....	61
2.10.Φυλογενετική ανάλυση κλώνων με εργαλεία βιοπληροφορικής.....	61
2.10.1.Επεξεργασία αλληλουχιών.....	61
2.10.2.Ribosomal Database Project (RDP).....	62
2.10.3.Basic local Alignment Search Tool (BLAST).....	63
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	64
3.1. Καταμέτρηση βακτηριακών αποικιών.....	64
3.2. Microtitter plate.....	65
3.3. Αναστολή.....	66
3.4. Αποτελέσματα επαναλήψεων.....	68
3.4.1. Διάμετρος αναστολής.....	69
3.5. Μοριακή ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών.....	69
3.6. Βακτήρια που απομονώθηκαν από το μέλι και εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση.....	71
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	72
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	75
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	81

## 1.ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μέλι, είναι η φυσική γλυκιά ουσία που παράγουν οι μέλισσες του είδους *Apis mellifera* από το νέκταρ των φυτών ή εκκρίσεις από ζωντανά μέρη των φυτών ή εκκρίματα εντόμων που οι μέλισσες συλλέγουν, μεταποιούν, εμπλουτίζουν με δικές τους ουσίες που συντελούν στη μετατροπή του, αποθέτουν, αφυδατώνουν, αποθηκεύουν και το φυλάσσουν στις κηρήθρες της κυψέλης προκειμένου να ωριμάσει.

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

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η απομόνωση βακτηριακών στελεχών από Ελληνικά μέλια και εν συνεχεία αυτά αξιολογήθηκαν όσον αφορά στην αντιμικροβιακή τους δράση έναντι των παθογόνων βακτηρίων *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Acinetobacter Baumannii*.

Χρησιμοποιήθηκαν 9 δείγματα μελιού από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Τα δείγματα ήταν από διαφορετικά είδη φυτών και η παραγωγή τους έγινε το 2009, 2010 και 2012.

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση Gram θετικών βακτηρίων σε ειδικό θρεπτικό υπόστρωμα *Bacillus Cereus Medium* καθώς και άλλων βακτηριακών στελεχών σε θρεπτικό υπόστρωμα *PCA(plate account agar)* και από αυτά έγινε διαλογή των βακτηριακών αποικιών που εμφανίζουν αντιβακτηριδιακή δράση. Ακολούθησε απομόνωση χρωμοσωμικού DNA και με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), ενισχύθηκε το 16S rRNA γονίδιο. Τα προϊόντα της PCR αλληλουχίστηκαν και αναλύθηκαν προκειμένου να γίνει η ταυτοποίηση των βακτηρίων.

Από τα δείγματα μελιών που εξετάστηκαν, στα 5 (δείγματα 5, 10, 19, 21, 22, 25, 26, 30, 32) απομονώθηκαν βακτηριακά στελέχη που εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Staphylococcus aureus* ενώ κανένα δεν εμφάνισε αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι της *Pseudomonas aeruginosa* και έναντι του *Acinetobacter Baumannii*. Ταυτοποιήθηκαν 6 βακτηριακά στελέχη και όλα ανήκουν στο γένος *Bacillus*.



## Abstract

Honey is the natural sweet substance that produces the bees of the kind *Apis mellifera* from the nectar of the plants or secretions of the insects that bees collect, alter, enrich with their substances that contribute to its conversion, deposit, dehydrate, store up and keep it in the honeycomb so as to mature.

Well it is about a product of the nature that doesn't admit any elaboration and consists of the following components : water, natural candies, organic acids, proteins, traces, enzymes, vitamins, aromatic and coloring substances just as other nutritious substances. It plays important role in the metabolism and in the nutrition, to the components of the skeleton and the cells, regulate the acidity of the stomach, it has antiseptic attributes, it is tonic, helps to the quickest restoration of the health and has antimicrobial and antioxidant action (National Honey Board 2010).

In the present study evaluated the presence of bacteria in Greek honeys and what type of them have antimicrobial activity against pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*

They have used 9 samples of honey from different regions of Greece. The samples were from different species of plants and their production was in 2009, 2010 and 2012.

An isolation of Gram positive bacteria from a special nutrient medium (*Bacillus Cereus Medium*) and other bacteria from corresponding

medium, was accomplished and of those, we screened bacterial colonies that exhibit antibacterial activity. Isolation and chromosomal DNA using the polymerase chain reaction (PCR), reinforced the 16S rRNA gene. The PCR products were sequenced and analyzed in order to make the identification of bacteria.

From the honey samples examined, 5 (samples 5, 10, 19, 21, 22, 25, 26, 30, 32 ) showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and none showed antimicrobial properties against *Pseudomonas aeruginosa* either *Acinetobacter baumannii*. With the PCR method identified all bacterial colonies of bacteria that were identified seemed to belong to the genus *Bacillus* .

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Το μέλι στην αρχαιότητα

Η συλλογή μελιού είναι μία αρχαία δραστηριότητα. Οι άνθρωποι άρχισαν προφανώς το κυνήγι για το μέλι τουλάχιστον 8.000 χρόνια πριν, όπως αποδεικνύεται από μία ζωγραφιά των σπηλαίων στη Βαλένθια της Ισπανίας (Eva Crane, 1983). Στην αρχαία Αίγυπτο, το μέλι χρησιμοποιούνταν ως γλυκαντικό σε κέικ και μπισκότα αλλά και σε πολλά άλλα πιάτα. Οι λαοί της αρχαίας Αιγύπτου και γενικότερα της Μέσης Ανατολής χρησιμοποιούσαν επίσης το μέλι για την ταρίχευση των νεκρών (Larry Gonick, 1990). Ο Πλίνιος ο Πρεσβύτερος, στο βιβλίο του *Naturalis Historia* αναφέρεται εκτενώς στις μέλισσες και το μέλι αλλά και σε πολλές χρήσεις του. Σε περίπτωση απουσίας της ζάχαρης, το μέλι ήταν αναπόσπαστο γλυκαντικό συστατικό στις ρωμαϊκές συνταγές και αναφορές για τη χρήση του μπορούν να βρεθούν σε έργα πολλών Ρωμαίων συγγραφέων όπως ο Αθηναίος, ο Cato και ο Bassus (Mark Grant, 2008).

Η τέχνη της μελισσοκομίας στην αρχαία Κίνα υπάρχει από αμνημονεύτων χρόνων και φαίνεται πως είναι δύσκολο να εντοπίσουμε την προέλευσή της. Σε πολλά βιβλία, αναφέρεται η μελισσοκομική

διαδικασία κατά την περίοδο της άνοιξης και του φθινοπώρου, καθώς και η σημασία της ποιότητας του ξύλινου κουτιού όπου φυλάσσονταν οι μέλισσες, η οποία επηρεάζει την ποιότητα του μελιού.

Μέλι επίσης καλλιεργείται και στην αρχαία Κεντρική Αμερική από τους Μάγια, οι οποίοι χρησιμοποιούσαν το μέλι από μέλισσες χωρίς κεντρί για μαγειρικούς σκοπούς. Εκτός όμως από την μαγειρική, οι Μάγια χρησιμοποιούσαν το μέλι σαν αλοιφή για τα εγκαύματα και τα εξανθήματα και για να απαλύνει τον πονόλαιμο, όταν άλλες πρακτικές δεν ήταν διαθέσιμες (Eva Crane, 1983).

## 1.2 Η παραγωγή του μελιού

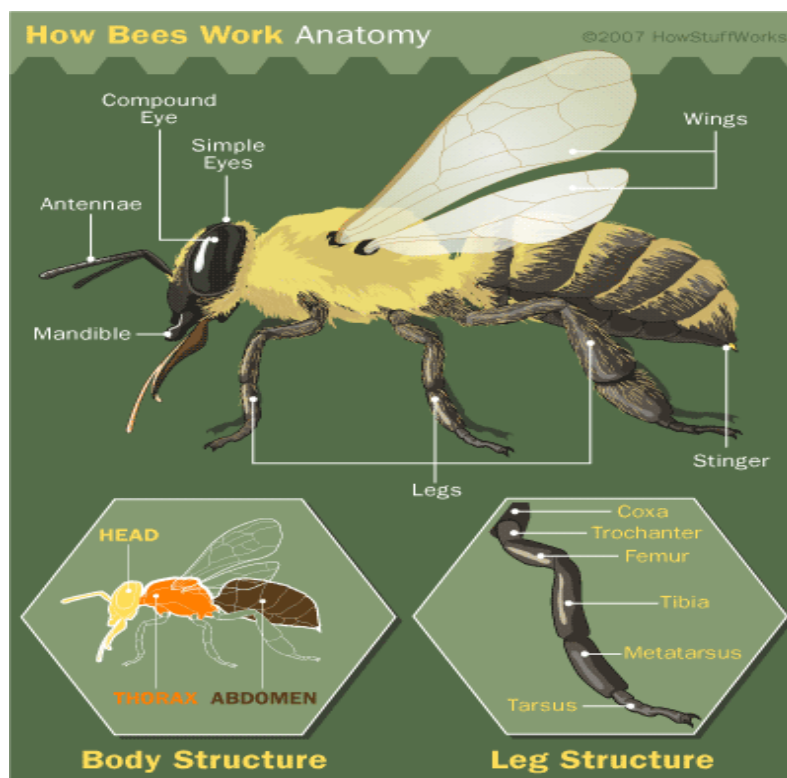
Η κοινωνία των μελισσών αποτελείται από τη βασίλισσα, τις εργάτριες και τους κηφήνες. Ο ρόλος της βασίλισσας είναι να γεννά αυγά ενώ οι εργάτριες την ταΐζουν κατευθείαν στο στόμα και κάνουν όλες τις δουλειές εντός και εκτός της κυψέλης (Root, 1983). Οι κηφήνες παράγουν θερμότητα και ζεσταίνουν το γόνο, αερίζουν την κυψέλη το καλοκαίρι κουνώντας τα φτερά τους, διαμοιράζουν το νέκταρ και γονιμοποιούν τη βασίλισσα (Τσέλλιος και Θρασυβούλου, 1989).

### 1.2.1 Η ανατομία μιας μέλισσα

Οι μέλισσες είναι έντομα με φτερά που ανήκουν στο γένος *Apis*. Το πιο γνωστό είδος μέλισσας είναι η ευρωπαϊκή μέλισσα που φέρει την

επιστημονική ονομασία *Apis mellifera*. Η εξέλιξη των μελισσών υποστηρίζεται ότι έγινε από ένα είδος που έμοιαζε περισσότερο στις σφήκες, γι' αυτό και οι μέλισσες έχουν πολλά φυσικά κοινά χαρακτηριστικά με αυτές.

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



θώρακα και την κοιλιά.

Παρά το μικρό μέγεθος του εγκεφάλου της, η μέλισσα μπορεί να εκτελεί αρκετά πολύπλοκες διαδικασίες. Επίσης, στο κεφάλι της, έχει δύο αισθητήριες κεραίες και πέντε μάτια, τρία απλά και δύο σύνθετα, τα οποία επιτρέπουν την όραση στο πολωμένο φως, κάτι το οποίο είναι αδύνατον στον άνθρωπο. Στο στόμα της βρίσκεται μια μεγάλη

προβοσκίδα, την οποία χρησιμοποιεί για την συλλογή νέκταρ ενώ στο θώρακα φέρει δύο ζευγάρια φτερά και τρία ζευγάρια πόδια. Το δηλητηριώδες κεντρί της μέλισσας βρίσκεται στην άκρη της κοιλιάς (Tracy B.Wilson, 2007).

### 1.2.2 Διάρκεια ζωής

Η βασίλισσα ζει μέχρι 4 – 5 χρόνια, αλλά ύστερα από το δεύτερο χρόνο της ζωής της αρχίζει να γερνά, λιγοστεύει ο αριθμός των αυγών που γεννά και γι' αυτό συνήθως οι εργάτριες την αντικαθιστούν. Η εργάτρια ζει μέχρι 40 μέρες ενώ ο κηφήνας ζει 4 με 5 μήνες (Χαριζάνης, 1996).

### 1.2.3 Αναζήτηση τροφής

Οι μέλισσες μπορούν να απομακρυνθούν μέχρι 3-4 χιλιόμετρα από την κυψέλη προς αναζήτηση τροφής (Δερματόπουλος, 1949).

### 1.2.4 Αναπαραγωγή

Όταν εκκολαφθεί από το βασιλικό κελί ή βασιλοκύτταρο, η βασίλισσα τις πρώτες 2-3 μέρες περιφέρεται μέσα στην κυψέλη σαν ξένη, αδιάφορη για τις μέλισσες που την περιτριγυρίζουν, όπως και εκείνες

είναι αδιάφορες για τη νέα βασίλισσα, την οποία ούτε περιποιούνται ούτε την τρέφουν. Την τρίτη μέχρι την πέμπτη μέρα από την εκκόλαψή της, εφόσον ο καιρός είναι καλός, ηλιόλουστη μέρα χωρίς άνεμο, βγαίνει στη σανίδα πτήσεως της κυψέλης και κάνει μερικές δοκιμαστικές πτήσεις διαγράφοντας κύκλους μπροστά στην κυψέλη, χωρίς να απομακρυνθεί περισσότερο από δύο με τρία μέτρα, με το κεφάλι πάντα γυρισμένο προς την κυψέλη, σημαδεύοντας τη θέση της κυψέλης σε σχέση με τα αντικείμενα που την περιτριγυρίζουν. Όταν έπειτα από αλλεπάλληλες τέτοιες πτήσεις χαράζει στο μνημονικό της την τοποθεσία της κυψέλης, τότε ξεκινά με ορμή για το γαμήλιο ταξίδι και αμέσως τρέχουν πίσω της οι κηφήνες της κυψέλης και των άλλων κυψελών, όσοι πετούν σε εκείνη την περιοχή, προελκόμενοι από την ουσία που εκκρίνουν οι σιαγονικοί της αδένες. Το ζευγάρι με τον κηφήνα γίνεται πετώντας ψηλά στον αέρα. Η βασίλισσα ζευγαρώνει με τον πρώτο κηφήνα που την πλησιάζει από τους πολλούς που την κυνηγούν και αυτός φυσικά θα είναι ο πιο ταχύς και ο πιο δυνατός για να μπορέσει να φτάσει το γρήγορο πέταγμά της. Πάντως το τίμημα της επιτυχίας του κηφήνα να γονιμοποιήσει τη βασίλισσα είναι ο θάνατος, γιατί στο ζευγάρι αποσπώνται τα γεννητικά του όργανα και πέφτει νεκρός από τον ακρωτηριασμό. Μετά το γαμήλιο πέταγμα η βασίλισσα επιστρέφοντας στην κυψέλη της καθαρίζεται από τις εργάτριες, ακολουθεί ανάπαυση 48 ωρών και αμέσως αρχίζει να γεννά. Όταν γεννήσει 80-100 αυγά σταματά λίγα λεπτά για να ξεκουραστεί και να πάρει τροφή. Τότε αμέσως οι μέλισσες που την περιτριγυρίζουν την τροφοδοτούν με τις κεραίες τους απευθείας μέσα στο στόμα με βασιλικό πολτό (Χαριζάνης, 1996).

### 1.2.5. Η κυψέλη

Η κυψέλη είναι μία κλειστή δομή που οι μέλισσες ζουν και μεγαλώνουν τα μικρά τους. Οι φυσικές κυψέλες είναι φυσικές δομές που καταλαμβάνονται από αποικίες μελισσών, ενώ οι οικόσιτες μέλισσες οικονομικής σημασίας ζουν σε τεχνητές κυψέλες, συχνά σε μελισσοκομεία. Η εσωτερική δομή της κυψέλης είναι μία πυκνοκατοικημένη μήτρα από κερί μέλισσας που αποτελείται από εξαγωνικά κελιά και ονομάζεται κηρήθρα. Οι μέλισσες χρησιμοποιούν τα κελιά για την αποθήκευση της τροφής τους ( μέλι και γύρη) και για να στεγάσουν το γόννο (αυγά, προνύμφες, χρυσαλίδες) (Robin Dartington, 2000).





### 1.2.6. Πώς οι μέλισσες φτιάχνουν το μέλι

Η πρώτη ύλη του μελιού είναι το νέκταρ από το οποίο παράγεται το ανθόμελο και το μελίτωμα. Το νέκταρ το παίρνουν οι μέλισσες από τα άνθη, ενώ το μελίτωμα προέρχεται από τα παράσιτα των φυτών. Τα παράσιτα απορροφούν το χυμό, ο οποίος περνά από το πεπτικό τους σύστημα και σχηματίζεται το μελίτωμα, το οποίο χρησιμοποιούν για τις ανάγκες τους. Αυτό που περισσεύει βγαίνει με μορφή σταγονιδίων, που οι μέλισσες απομυζούν από το σώμα των παρασίτων ή από τα φύλλα των φυτών όπου πέφτει το μελίτωμα (Δερματόπουλος, 1949).

Οι συλλέκτριες προσθέτουν στο νέκταρ και στο μελίτωμα σάλιο και το μεταφέρουν στις κυψέλες. Εκεί το μοιράζουν στις εργάτριες και στους κηφήνες. Μέχρι να τοποθετηθεί στα κελιά περνά πολλές φορές από τη μια μέλισσα στην άλλη και κάθε φορά προστίθεται σάλιο, το οποίο μεταβάλλει τα σάκχαρα. Το υγρό πιπιλίζεται από τις μέλισσες πολλές φορές, 15-20 λεπτά. Η διαδικασία αυτή συμπυκνώνει το υγρό. Κατά τη διάρκεια πολλών ημερών εξατμίζεται το νερό και η πυκνότητα του υγρού αυξάνει σε σάκχαρα ώσπου να φτάσει στο 70-80%. Στη συνέχεια, οι μέλισσες καλύπτουν το συμπυκνωμένο μέλι με ένα κάλυμμα από κερί. Η σύνθεση του μελιού εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως:

- Τα είδη των φυτών απ' όπου συλλέγουν το νέκταρ και το μελίτωμα
- Τη φύση του εδάφους
- Το είδος των μελισσών

- Τη φυσική κατάσταση του μελισσιού κ.α. (Υφαντίδης, 1983).

Μέσα στην προβοσκίδα της μέλισσας αρχίζει η διαδικασία της μετατροπής του νέκταρ σε μέλι, με την προσθήκη ενζύμων από τους σιελογόνους και υποφαρυγγικούς αδένες. Οι υποφαρυγγικοί αδένες βρίσκονται στο πάνω μέρος του κεφαλιού της μέλισσας και είναι δυο λεπτοί και μακροί αγωγοί με πολλές διακλαδώσεις. Είναι πολύ ανεπτυγμένοι στη νεαρή εργάτρια και παράγουν το βασιλικό πολτό. Στης μεγαλύτερης ηλικίας εργάτριες, συρρικνώνονται και παράγουν το ένζυμο ιμπερτάση, απαραίτητο για τη μετατροπή του νέκταρος σε μέλι και το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης, που μετατρέπει τη γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ.

Η κυρίαρχη χημική μετατροπή (μεταβολισμός) του φυτικού χυμού όταν αυτός γίνεται μέλι είναι η αποικοδόμηση του δισακχαρίτη σουκρόζη (της κοινής ζάχαρης) στα άμεσα αφομοιώσιμα μονοσάκχαρα της γλυκόζης και φρουκτόζης. Η ανασύνθεση δι- και τρι- σακχαριτών είναι ποσοτικά πολύ περιορισμένη. Οι αρωματικές (διάφορα τερπένια) και οι χρωστικές ουσίες του φυτικού χυμού δεν μεταβολίζονται. Το μέλι απλά εμπλουτίζεται και με το άρωμα των οργανικών οξέων από τη διάσπαση της γλυκόζης. Τέλος, τα διάφορα μεταλλικά στοιχεία του μελιού είναι ακριβώς τα ίδια με αυτά τα οποία προέρχονται και στον πρωτογενή φυτικό χυμό (Zanber & Maurizio, 1984).

Ο μεταβολισμός των σακχάρων του νέκταρος και του μελιτώματος συνεχίζεται και ολοκληρώνεται μέσα στα κελιά των κηρήθρων, από την ώρα που οι φυτικοί χυμοί αποθηκεύονται μέσα σε αυτές. Η ικανότητα,

πάντως, των κοινωνικών μελισσών ως ειδών εντόμων να μετατρέπουν το ευαίσθητο σε ζυμώσεις (αλλοιώσεις) νέκταρ και αντίστοιχα μελιτώματα στο εξαιρετικά συντηρήσιμο μέλι, αποτελεί για αυτές έναν από τους βασικούς μηχανισμούς προσαρμογής τους στη φύση, ο οποίος διασφαλίζει την επιβίωσή τους (White, 1993).

### **1.3 Άλλα προϊόντα που παράγονται από τις μέλισσες**

Εκτός από το μέλι, σε ένα μελίτσι μπορεί να παραχθεί :

#### **ΓΥΡΗ**

Είναι το προϊόν που συγκεντρώνουν οι μέλισσες από διάφορα λουλούδια. Είναι η πλουσιότερη φυσική τροφή σε πρωτεΐνες, βιταμίνες, απαραίτητα αμινοξέα, ορμόνες, ένζυμα και άλλα χρήσιμα συστατικά για τη διατροφή μας. Χρησιμοποιείται στη φαρμακοβιομηχανία, στη βιομηχανία καλλυντικών, στη διατροφή του ανθρώπου και των οικιακών ζώων, στην κατασκευή υποκατάστατων γύρης για τη διατροφή των μελισσών, σε διάφορες έρευνες για τις αλλεργίες, σε προγράμματα βελτίωσης φυτών και στην επικονίαση φρούτων και λαχανικών (Παππάς, 1998).

#### **ΠΡΟΠΟΛΗ**

Είναι ρητινώδης κολλητική ουσία που συλλέγουν οι μέλισσες από διάφορα φυτά, την εμπλουτίζουν με κερί, γύρη, ένζυμα και άλλες ουσίες και τη χρησιμοποιούν για να στεγανοποιήσουν και να απολυμάνουν το εσωτερικό της κυψέλης. Το χρώμα της πρόπολης εξαρτάται από τη φυτική της προέλευση. Έχει διάφορες φαρμακευτικές και θεραπευτικές ιδιότητες. Χρησιμοποιείται στη βιομηχανία καλλυντικών και ως αντιμικροβιακό. Ενισχύει τα τριχοειδή αγγεία, καταπολεμά την αναπνευστική ανεπάρκεια,

αναστέλλει την ανάπτυξη μελανώματος και τα κακοήθη νεοπλασματικά κύτταρα (καρκίνος) και είναι αντιδιαβητικό (Herburn, 1986).

## **ΚΕΡΙ**

Είναι το προϊόν που παράγουν σε μικρά λέπια οι νεαρές εργάτριες από 4 ζεύγη κηρογόνων αδένων. Για την παραγωγή ενός κιλού κεριού οι μέλισσες καταναλώνουν 8 κιλά μέλι. Το κεριό είναι ένα μίγμα από 300 περίπου ουσίες (υδρογονάνθρακες, μονοϋδρικές αλκοόλες, λιπαρά οξέα, υδροξυοξέα, διόλες) που είναι απίθανο να συνθέσει ο άνθρωπος.

Το κεριό χρησιμοποιήθηκε ως φαρμακευτική ουσία για αλοιφές και διάφορα άλλα φαρμακευτικά σκευάσματα. Κάποιες από τις φαρμακευτικές του χρήσεις είναι ενάντια της χρόνιας μαστίτιδας, του εκζέματος, των εγκαυμάτων, της δερματίτιδας. Περιέχει αντιβιοτικές ουσίες και παρουσιάζει θεραπευτική δράση για παρειακές στοματικές αρρώστιες και προβλήματα του άνω αναπνευστικού αγωγού. Χρησιμοποιείται στη βιομηχανία καλλυντικών. Άλλες χρήσεις του είναι στη βιομηχανία των κεριών, βερνικιών και ως μονωτικό υλικό (Herburn, 1986).

## **ΒΑΣΙΛΙΚΟΣ ΠΟΛΤΟΣ**

Παράγεται στους υποφαρυγγικούς αδένες των νεαρών εργατριών, είναι άσπρος σαν το γάλα, κρεμώδης, ισχυρά όξινος, με ιδιαίζουσα οσμή και υπόξινη γεύση. Είναι πλούσια πηγή βιταμινών, ανόργανων στοιχείων και αμινοξέων. Περιέχει ακόμη διάφορα λιπαρά οξέα, όπως τα υδροξυλιπαρά οξέα, τα δικαρβοξυλικά οξέα\_ή απλά λιπαρά οξέα τα οποία είναι υπεύθυνα για τις περισσότερες βιολογικές ιδιότητες που έχει ο βασιλικός πολτός. Ορισμένες ευεργετικές επιδράσεις του αφορούν την αντιμετώπιση της ρευματικής αρθρίτιδας, τη μείωση της πίεσης του αίματος, τη

θεραπεία της χρόνιας δυσκοιλιότητας, τις αντισηπτικές και μικροβιοκτόνους ιδιότητες, την ενίσχυση της δυναμικότητας του οργανισμού και την αντοχή στις αρρώστιες. Ακόμη, χρησιμοποιείται στη θεραπεία της νεφρικής ανεπάρκειας, περιέχει γενετήσιες ορμόνες που βοηθούν στη βελτίωση της μυϊκής δύναμης, συμβάλλει στην γαλακτοπαραγωγή μετά τη γέννα των γυναικών και στην αποφυγή της αγγείωσης του δέρματος. Γενικά, ο βασιλικός πολτός βελτιώνει τη διάθεση, αυξάνει την ικανότητα για εργασία και την όρεξη και βοηθά στην απόκτηση μεγαλύτερης διανοητικής και σωματικής δύναμης (Θρασυβούλου, 1996).

### 1.3.1 Το δηλητήριο της μέλισσας

Η απιτοξίνη, ή αλλιώς το δηλητήριο της μέλισσας, είναι ένα πικρό, άχρωμο υγρό. Το δραστικό τμήμα του δηλητηρίου είναι ένα πολύπλοκο μίγμα πρωτεϊνών, που προκαλεί τοπική φλεγμονή και δρα ως αντιπηκτικό. Το δηλητήριο παράγεται στην κοιλιά των εργατριών από ένα μίγμα όξινων και βασικών εκκρίσεων. Η απιτοξίνη έχει όξινο pH, κοντά στο 5. Μία μέλισσα μπορεί να εγχύσει 0,1 mg του δηλητηρίου της μέσα από το κεντρί της. Εκτιμάται ότι το 1% του πληθυσμού είναι αλλεργικό στα τσιμπήματα μελισσών. Η απιτοξίνη απενεργοποιείται με αιθανόλη (Meier J, White J. 1995). Οι ουσίες που περιέχει είναι ενδιαφέρουσες από

βιοχημική και φαρμακολογική πλευρά, όπως είναι η μελιτίνη, η απαμίνη, η ισταμίνη, η ντομαπίνη, η φωσφολιπάση Α χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και για το γαστρικό έλκος. Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται στη θεραπεία για τη σκλήρυνση κατά πλάκας (Τσέλλιος και Θρασυβούλου, 1989).

#### 1.4 Τα είδη του μελιού

Διακρίνουμε τα μέλια σε δύο κατηγορίες: τα μέλια των ανθέων ή νέκταρος που προέρχονται από το νέκταρ των φυτών και τα μέλια μελιτώματος που προέρχονται από τους φυσικούς χυμούς των φυτών και των εντόμων που τρέφονται από τα φυτά αυτά. Τα μέλια των μελιτωμάτων έχουν σκούρο χρώμα και κρυσταλλοποιούνται λίγο σε αντίθεση με τα μέλια του νέκταρος. Η χημική σύνθεση του μελιού ποικίλει από είδος σε είδος (Θρασυβούλου, 1990).

- Μέλια ανθέων: Πορτοκαλιάς, θυμαριού, ευκαλύπτου, δενδρολίβανου, λεβάντας, λυγαριάς, ακακίας είναι μερικά από τα μέλια που προέρχονται από το νέκταρ που παράγουν τα αντίστοιχα φυτά

- Μέλια μελιτώματος: Το μέλι του πεύκου και του ελάτου είναι μερικά από τα μέλια που προέρχονται από τα μελιτώματα των αντίστοιχων φυτών. Στην Κύπρο δεν παράγονται μέλια μελιτώματος (Θρασυβούλου και Μανίκης, 1990).

Θεωρητικά, οι μέλισσες παράγουν τόσα μέλια όσα είναι και τα φυτά που δίνουν νέκταρ και μελίτωμα. Στην πράξη όμως, δεν έχουμε τόσα πολλά μέλια διότι οι ποσότητες που παράγονται δεν είναι μεγάλες. Κάθε

περιοχή παράγει τα δικά της μέλια ανάλογα με την ανθοφορία της. Όταν στην περιοχή δεν υπάρχει μια επικρατούσα ανθοφορία, π.χ. πορτοκαλιάς ή θυμαριού, το μέλι που θα παραχθεί θα είναι μέλι ποικίλης ανθοφορίας. Αντίστοιχα, όταν υπάρχει μια επικρατούσα ανθοφορία, το μέλι θα πάρει τα χαρακτηριστικά της, δηλαδή τη γεύση, το άρωμα και το χρώμα και θα ονομαστεί ανάλογα, π.χ. μέλι θυμαριού (Θρασυβούλου, 2001).

## 1.5 Τύποι ελληνικού μελιού

Το μέλι είναι ένα μοναδικό στο είδος του προϊόν, πλούσιο σε θρεπτικά στοιχεία, άρωμα και γεύση. Υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ανθόμελων και αυτών που προέρχονται από κωνοφόρα δέντρα. Τα ανθόμελα είναι πιο ανοιχτόχρωμα, ελαφρύτερα και κρυσταλλώνουν πολύ πιο εύκολα. Ακόμη, περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό γλυκόζης και φρουκτόζης (μεγαλύτερο από 65%) και μπορεί να περιέχουν υπολείμματα γύρης. Από την άλλη, τα μέλια από κωνοφόρα δέντρα είναι σκουρόχρωμα και κρυσταλλοποιούνται λιγότερο. Έχουν μικρότερο ποσοστό σακχάρων (38-65%), αλλά είναι πλούσια σε μεταλλικά άλατα (Υφαντίδης, 1983).

### ◆ Πευκόμελο (*Pinus silvestris*)

Οι κυριότερες περιοχές παραγωγής μελιού στην Ελλάδα είναι η Βόρεια Εύβοια, η Χαλκιδική, η Θάσος, η Σκόπελος, η Ζάκυνθος και η Ρόδος. Το 65% περίπου της συνολικής παραγωγής μελιού στην Ελλάδα προέρχεται από τα πεύκα, τα οποία μάλιστα θεωρούνται το σημαντικότερο μελισσοκομικό φυτό της χώρας μας. Λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης

σακχάρων, δεν είναι ιδιαίτερα γλυκό στη γεύση. Έχει ωστόσο ιδιαίτερο άρωμα και πολύ σκούρο χρώμα. Το πευκόμελο κρυσταλλώνει αργά αφού η φυσική περιεκτικότητά του σε γλυκόζη είναι χαμηλή. Θεωρείται μέλι υψηλής αξίας και αυτό οφείλεται κυρίως στον μεγάλο αριθμό διαφορετικών ουσιών που περιέχει. Από αυτές τις ουσίες, επικρατούν τα μέταλλα και τα ιχνοστοιχεία όπως το ασβέστιο, το μαγνήσιο, ο ψευδάργυρος, ο σίδηρος, ο χαλκός κ.α., τα οποία βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις (Θρασυβούλου και Μανίκης, 1990).

#### ◆ **Μέλι καστανιάς (*Castanea sativa*)**

Είναι αρκετά διαδεδομένο στα ορεινά μέρη της Ελλάδας και κυρίως παράγεται στη χερσόνησο του Αγίου Όρους. Παράγεται από το νέκταρ και τις μελιτώδεις εκκρίσεις της καστανιάς. Η γεύση του είναι αρκετά δυνατή και ελαφρώς πικρή. Έχει έντονο άρωμα και το χρώμα του ποικίλει ανάλογα με την προέλευσή του, από ανοιχτό καφετί μέχρι σκούρο. Κρυσταλλώνει πολύ αργά, είναι ανθεκτικό στη θέρμανση και είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία, κάλιο, μαγνήσιο, μαγγάνιο και βάριο. Λέγεται ότι ευνοεί την κυκλοφορία του αίματος (Θρασυβούλου και Μανίκης, 1990).

#### ◆ **Θυμαρίσιο μέλι (*Thymus serpyllus*)**

Ανήκει στα ανθόμελα αλλά στην πραγματικότητα αποτελεί ξεχωριστή κατηγορία λόγω των έντονων αρωματικών και γευστικών χαρακτηριστικών του. Θεωρείται μέλι άριστης ποιότητας και έχει μεγάλη ζήτηση από τους καταναλωτές για το άρωμα και την γεύση του. Η παραγωγή του ανέρχεται περίπου στο 10% της συνολικής παραγωγής μελιού της Ελλάδας. Οι καλύτερες περιοχές παραγωγής θυμαρίσιου



μελιού θεωρούνται τα ελληνικά νησιά και ιδιαίτερα η Κρήτη και τα Κύθηρα, εντοπίζεται όμως και στη Θεσσαλία και Εύβοια. Έχει ευχάριστη γεύση, αλλά μερικές φορές αφήνει μία αίσθηση καψίματος λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σε φρουκτόζη. Έχει έντονο άρωμα, το χρώμα του είναι συνήθως ανοιχτό κεχριμπαρένιο και κρυσταλλώνει σε διάστημα 6-18 μηνών. Θεωρείται ότι έχει τονωτικές και αντισηπτικές ιδιότητες (Θρασυβούλου και Μανίκης, 1990).

#### ◆ Μέλι Ελάτης (*Abies alba*)

Προέρχεται κυρίως από τις ορεινές περιοχές της Ευρυτανίας, της Πίνδου, του Ολύμπου, από τα βουνά Μαίναλο, Πάρνωνα και Χελμό της Πελοποννήσου και από την Πάρνηθα Αττικής. Είναι μία από τις πιο εξαιρετικές και ακριβές ποικιλίες μελιού. Υπολογίζεται ότι το 5-10% περίπου του μελιού που παράγεται στην Ελλάδα είναι από έλατα. Αυτό που παράγεται στον Μαίναλο ή στον Πάρνωνα φέρει την ονομασία «ελατοβανίλια», χάρη στις κρεμώδεις ανταύγειες που δημιουργούνται στο εσωτερικό του. Μάλιστα, αυτό του Μαινάλου είναι το μοναδικό ελληνικό μέλι που έχει χαρακτηριστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση ως Π.Ο.Π. Έχει φινετσάτη γεύση αλλά όχι ιδιαίτερο άρωμα. Το χρώμα του είναι έντονο μελί. Είναι εξαιρετικά πυκνόρρευστο και δεν κρυσταλλώνει εξαιτίας του χαμηλού ποσοστού γλυκόζης. Είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία και περιέχει βιταμίνες σε πολύ μικρές ποσότητες. Ωστόσο, ακόμα και αυτή η μικρή ποσότητα βοηθάει στην καλύτερη αφομοίωση των σακχάρων από τον ανθρώπινο οργανισμό (Μπίκος, 1991).

### ◆ **Ερεικόμελο (*Erica multipolyflora*)**

Υπάρχουν δύο τύποι ερεικόμελου, το μέλι φθινοπωρινής ερείκης (είναι ευρέως γνωστό και ως σουσούρα) και το ανοιξιάτικο μέλι ερείκης. Είναι μία από τις πιο σημαντικές ποικιλίες μελιού στην Ελλάδα και παράγεται σχεδόν σε όλη τη χώρα. Είναι αρκετά γευστικό, με δυνατή γεύση. Έχει χαρακτηριστικό, λεπτό άρωμα, το χρώμα του είναι κοκκινωπό και κρυσταλλώνει πολύ γρήγορα (1-3 μήνες), λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε γλυκόζη. Το μέλι αυτό ξινίζει και πιο εύκολα γιατί έχει υψηλής υγρασία και μεγάλη περιεκτικότητα σε σακχαρομύκητες. Έχει υψηλή θρεπτική αξία γι' αυτό και διατίθεται κυρίως από καταστήματα υγιεινής διατροφής (Seeley, 1985).

### ◆ **Μέλι πορτοκαλιάς (*Citrus aurantium*)**

Η πορτοκαλιά είναι ο κύριος αντιπρόσωπος των εσπεριδοειδών και αποτελεί μία σημαντική πηγή νέκταρος για την παραγωγή μελιού. Παράγεται κυρίως στην Κρήτη, στον Πόρο, στην Πελοπόννησο και την Ήπειρο. Έχει την ιδιαίτερη γεύση και το άρωμα του πορτοκαλιού και το χρώμα του είναι ανοιχτό κίτρινο. Κρυσταλλώνει πολύ γρήγορα (1-2 μήνες) και δεν αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες (Θρασυβούλου και Μανίκης, 1990).

### ◆ **Μέλι κουμαριάς (*Arbutus unedo*)**

Παράγεται στην Πελοπόννησο και την Χαλκιδική. Έχει υψηλά ποσοστά υγρασίας και μεγάλη φυσική περιεκτικότητα σε ζύμες, γι' αυτό και πολλές φορές ξινίζει εύκολα. Έχει έντονο άρωμα αλλά πικρή γεύση και το χρώμα του είναι πολύ σκούρο, σχεδόν μαύρο. Μερικές από τις

ιδιότητές του είναι να καθαρίζει το αίμα, να ρυθμίζει τα επίπεδα της χοληστερόλης, να τονώνει το ανοσοποιητικό σύστημα και να χαρίζει μακροζωία (Θρασυβούλου και Μανίκης, 1990).

#### ◆ **Μέλι κρόκου (*Crocus sativus*)**

Το μέλι αυτό προέρχεται από το φυτό κρόκος, το οποίο στη χώρα μας επικρατεί στην περιοχή της Κοζάνης και υπάρχουν ελάχιστες φυτείες και στη Θράκη. Το χρώμα του είναι ανοιχτό, έχει άρωμα που θυμίζει το φυτό από το οποίο προέρχεται, κρυσταλλοποιείται σε 8-10 μήνες και η συγκομιδή του είναι εξαιρετικά δύσκολη. Είναι ένα από τα πιο σπάνια και ακριβά μέλια και σχεδόν το 90% από το μέλι που παράγεται στην Ελλάδα, εξάγεται στο εξωτερικό (Wilkins & Yinrong, 1993).

➤ Υπάρχουν και άλλες ποικιλίες μελιού, που προέρχονται από πολλά και διαφορετικά φυτά. Η παραγωγή τους ωστόσο είναι περιορισμένη στην Ελλάδα και είναι πιο σπάνιο να τα εντοπίσει κανείς στην αγορά. Αναφέρονται ενδεικτικά οι παρακάτω ποικιλίες :

#### ◆ **Μέλι πολύκομβου (*Polygonum ssp.*)**

Είναι ένα σκουρόχρωμο μέλι με χαρακτηριστική μυρωδιά αλλά όχι και τόσο ωραία γεύση. Είναι από τα πιο πλούσια σε ένζυμα μέλια που υπάρχουν, περιέχει μεταλλικά στοιχεία και είναι αρκετά ανθεκτικό στη θέρμανση.

#### ◆ **Μέλι ακακίας (*Robinia pseudocacia*)**

Αυτό το μέλι δεν είναι πολύ διαδεδομένο στην Ελλάδα αλλά περισσότερο

στην Κεντρική Ευρώπη. Είναι ανοιχτόχρωμο και διαυγές, αραιό, με λεπτό άρωμα ακακίας και κρυσταλλώνει σχετικά δύσκολα.

◆ **Μέλι από βαμβάκι (*Gossypium hirsutum*)**

Το μέλι από το άνθος του βαμβακιού είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε σάκχαρα (έως 70%). Εξαιτίας αυτού του γεγονότος, κρυσταλλώνει πολύ γρήγορα (2 μήνες). Είναι ανοιχτόχρωμο αλλά μετατρέπεται σε άσπρο χρώμα μετά την κρυστάλλωσή του.

◆ **Μέλι από ευκάλυπτο (*Eucalyptus spp.*)**

Είναι ανοιχτόχρωμο, με έντονο χρώμα και γεύση ευκαλύπτου.

◆ **Μέλι από ηλίανθο (*Helianthus annuus*)**

Συλλέγεται κατά κύριο λόγο στον Έβρο. Είναι ανοιχτόχρωμο προς κιτρινωπό, εξαιρετικά παχύρρευστο, κρυσταλλώνει σε 1-2 μήνες και έχει διακριτικό άρωμα. Είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες.

◆ **Μέλι από τσάι του βουνού (*Sideritis spp.*)**

Παράγεται κυρίως στην χερσόνησο του Αγίου Όρους. Έχει σκούρο χρώμα και πολύ έντονο άρωμα και γεύση του τσαγιού. Είναι παχύρρευστο και θεωρείται από τα καλύτερα και πιο αρωματικά μέλια της Ελλάδας (Τσέλλιος και Θρασυβούλου, 1989).

Οι εξαγόμενες ποσότητες μελιού το 2008 ανήλθαν σε 601 τόνους περίπου αντιπροσωπεύοντας αξία 2.996.867 € με μέση τιμή πώλησης 4,99 €/κιλό.

Ο κύριος όγκος των εξαγωγών μας κατευθύνεται κυρίως σε τέσσερις χώρες και συγκεκριμένα στο Ηνωμένο Βασίλειο, την Κύπρο, τη Γερμανία και τις ΗΠΑ που κάλυψαν το 2008 το 76 % περίπου των εξαγωγών.

## 1.6 Τι περιέχει το μέλι και γιατί είναι τόσο μεγάλη η θρεπτική του αξία

Το βασικό συστατικό του μελιού είναι οι υδατάνθρακες, σε ποσοστό που κυμαίνεται από 70-80%. Οι δύο βασικοί υδατάνθρακες είναι οι γλυκόζη και η φρουκτόζη, σε ίση περίπου αναλογία. Στο μέλι υπάρχουν και άλλοι υδατάνθρακες σε μικρότερες ποσότητες.

Το νερό κυμαίνεται κατά μέσο όρο στο 16-17%. Η περιεκτικότητα του μελιού σε νερό εξαρτάται από τις κλιματολογικές συνθήκες στον τόπο παραγωγής του. Στην Κύπρο, λόγω του θερμού κλίματος, τα μέλια έχουν πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό, γι' αυτό και είναι παχύρρευστα.

Στο μέλι, υπάρχουν επίσης κατά μέσο όρο 0,17% μέταλλα και ιχνοστοιχεία. Τα βασικότερα είναι το κάλιο, νάτριο, ασβέστιο, φώσφορος και μαγνήσιο. Οι ποσότητες των βιταμινών που περιέχονται στο μέλι είναι ελάχιστες και είναι κυρίως οι βιταμίνες A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C, D και E. Τέλος, υπάρχουν πολύ μικρές ποσότητες πρωτεϊνών και ελεύθερων αμινοξέων και όσον αφορά τα ένζυμα, είναι αυτά που παράγονται σχεδόν στο σύνολό τους από τους αδένες των μελισσών και είναι αυτά που μετατρέπουν το νέκταρ και το μελίτωμα των φυτών σε μέλι (Σταθόπουλος, 1993).

Το μέλι έχει ευεργετικές επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι υδατάνθρακες που περιέχει είναι απλά σάκχαρα και αφομοιώνονται γρήγορα από τον οργανισμό, χωρίς να επιβαρύνει το συκώτι ή άλλα όργανα. Μετατρέπεται αμέσως σε ενέργεια λόγω της γλυκόζης, η οποία

χρειάζεται μόνο 15 λεπτά για να βρεθεί στην κυκλοφορία του αίματος. Δυναμώνει και τονώνει τον οργανισμό σε κατάσταση πνευματικής και σωματικής κόπωσης. Έρευνες απέδειξαν ότι αυξάνει την αιμοσφαιρίνη του αίματος και το σωματικό βάρος κατά την παιδική ηλικία, χωρίς όμως να αυξάνει το ζάχαρο στο αίμα ή την οξύτητα στο ουρικό οξύ. Έχει ευεργετικές επιδράσεις στο ήπαρ, στην καρδιά και στο πεπτικό σύστημα, βοηθά στην επούλωση τραυμάτων, έχει αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση και υποβοηθά στην τόνωση του ανοσοποιητικού συστήματος (Herold, 1970).

### 1.7 Αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση

Ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που συμβάλλουν στην αντιμικροβιακή δράση του μελιού, είναι η υψηλή περιεκτικότητά του σε σάκχαρα. Υπάρχουν πολλά σάκχαρα στο μέλι, για την ακρίβεια, είναι ένα υπέρκορο υδατικό διάλυμα σακχάρων, που σημαίνει ότι περιέχει σάκχαρα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από εκείνες που κανονικά μπορούν να ανευρίσκονται μέσα στην υγρή φάση του. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να περιέχει πολύ μικρή ποσότητα νερού. Η υψηλή αυτή περιεκτικότητα των σακχάρων δημιουργεί ένα υψηλό ωσμωτικό δυναμικό και συνεπώς, τα βακτήρια κυριολεκτικά αφυδατώνονται και πεθαίνουν μέσα στη μάζα του (Joirisch, 1970). Ειδικότερα, όσον αφορά τα βακτήρια της οικογένειας *Clostridium*, δεν μπορούν να επιβιώσουν σε περιβάλλον με πολλά σάκχαρα. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι τα βακτήρια αυτής της οικογένειας είναι υπεύθυνα για πολλές σοβαρές ασθένειες του ανθρώπου όπως αλλαντίαση, κολίτιδα, τροφική δηλητηρίαση και τέτανο (Wells CL, Wilkins TD, 1996).

Ένας δεύτερος παράγοντας που παίζει ρόλο στην αντιμικροβιακή δράση, είναι ένα ένζυμο που περιέχεται στο μέλι, η οξειδάση της γλυκόζης. Το ένζυμο αυτό είναι υπεύθυνο για την παρασκευή του γλυκονικού οξέος ενώ ως παραπροϊόν της βιοχημικής αυτής αντίδρασης σχηματίζεται το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ). Χάρη σε αυτά τα δύο συστατικά, τα περισσότερα βακτήρια δεν μπορούν να αναπτυχθούν μέσα στη μάζα του μελιού. Το  $H_2O_2$ , όχι μόνο αναχαιτίζει την ανάπτυξη των βακτηρίων αλλά και τα θανατώνει. Επίσης, το  $H_2O_2$  βρέθηκε ότι σε μικρές συγκεντρώσεις συμμετέχει ως ένας από τους παράγοντες επούλωσης πληγών, όταν σε αυτές εφαρμόζονται επιθέματα με μέλι (Herold, 1970).

Ένας άλλος παράγοντας που σχετίζεται με την αντιμικροβιακή δράση του μελιού είναι η οξύτητά του. Το pH του κυμαίνεται μεταξύ 3 με 4. Τα βακτήρια δεν επιβιώνουν σε ένα τόσο όξινο περιβάλλον όπως αυτό. Ωστόσο, αν το μέλι αραιωθεί, μπορεί να μειωθεί σε ένα βαθμό η οξύτητά του (White JW et al, 1963).

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του μελιού. Οι δράσεις αυτές αφορούν τον περιορισμό των αντιδράσεων οξείδωσης μέσα στα τρόφιμα και στον ανθρώπινο οργανισμό. Φάνηκε πως οι ουσίες του μελιού προστατεύουν τις μεμβράνες των κυττάρων από τις διαδικασίες της οξείδωσης και περιορίζουν την ενδοκυτταρική παραγωγή των επιβλαβών ελευθέρων ριζών. Τα φυτοχημικά που περιέχει το μέλι, όπως τα φαινολικά οξέα, η λυσοζύμη, τα φλαβονοειδή και διάφορες άλλες πρωτεΐνες και ολιγοπεπτίδια που προέρχονται από τα στομάχια των μελισσών, ενισχύουν την άμυνα του οργανισμού απέναντι

στο οξειδωτικό στρες (Wadhan, 1998).

## 1.8 Μικροβιακή ποιότητα του μελιού

Το μέλι έχει ιδιότητες που αναστέλλουν ή σκοτώνουν τους περισσότερους μικροοργανισμούς. Εκτός από τις διάφορες ουσίες που περιέχει (σάκχαρα, φυτοχημικά, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), το μέλι φέρει και ένα πλούσιο βακτηριακό και μυκητιακό φορτίο, το οποίο συμβάλλει στην αντιμικροβιακή του δράση. Σύμφωνα με έρευνες, έχουν απομονωθεί αρκετά βακτήρια από το μέλι, τα περισσότερα από τα οποία ανήκουν στο γένος *Bacillus* και *Staphylococcus*. Κάποια από αυτά τα βακτήρια, πιθανώς να συμβάλλουν στις αντιμικροβιακές του ιδιότητες. Έλεγχος που πραγματοποιήθηκε για τη συνολική αντιμικροβιακή δράση του μελιού, έδειξε ότι δείγματα μελιών εμφάνισαν μικροβιοκτόνες ιδιότητες έναντι πρότυπων Gram+ βακτηριακών στελεχών όπως *S. aureus*, *S. epidermidis* καθώς και Gram- βακτηριακών στελεχών όπως *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* αλλά και βακτηρίων στοματικής κοιλότητας *S. viridians*, *S. mutans* και των ανθρωπαθογόνων μυκήτων *C. albicans*, *C. tropicalis* και *C. glabrata*. Όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν, έδειξαν μεγάλη αντιμικροβιακή δράση (Chinou et al, 1998).

### 1.8.1 Βακτηριακά είδη κλινικής σημασίας

Τα βακτήρια *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Acinetobacter baumannii* αποτελούν πολύ συχνά παθογόνα του ανθρώπου



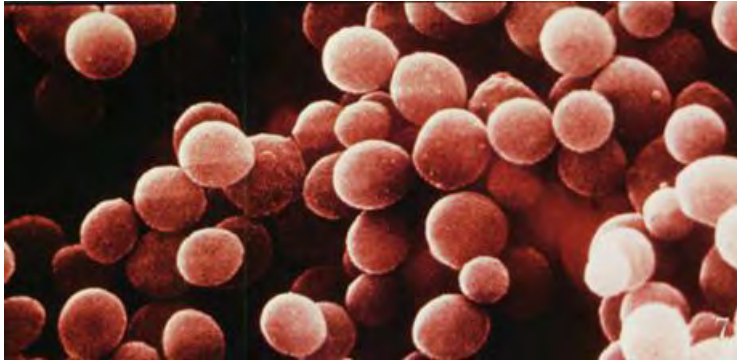
και μάλιστα, εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Τα τρία αυτά βακτηριακά στελέχη, εμφανίζουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- *Staphylococcus aureus* (Χρυσίζων Σταφυλόκοκκος)

Ο *S. aureus* ανήκει στο γένος βακτηρίων που είναι θετικοί κατά Gram κόκκοι. Υποδιαιρείται σε διάφορα επίπεδα σχηματίζοντας ακανόνιστες μάζες που μοιάζουν με τσαμπί σταφυλιού και εκεί ακριβώς οφείλει την ονομασία του. Ο *S. aureus* είναι το πιο κοινό είδος σταφυλόκοκκου το οποίο προκαλεί τις πιο συχνές μολύνσεις που οφείλονται σε σταφυλόκοκκους. Ένας από τους λόγους για αυτό είναι μια καροτενοειδής χρωστική ουσία, η σταφυλοξανθίνη (staphyloxanthin), η οποία είναι υπεύθυνη για το χαρακτηριστικό χρυσό χρώμα των αποικιών του *S. Aureus*.

Αναπτύσσεται στο δέρμα, στην ανώτερη αναπνευστική οδό, ιδίως στη μύτη και στο λαιμό, στη φυσιολογική χλωρίδα του ρινοφάρυγγα των υγιών ενηλίκων, οι οποίοι μπορεί να είναι φορείς του παθογόνου χωρίς ωστόσο να νοσούν. Μπορεί επίσης να επιβιώσει σε οικόσιτα ζώα όπως σκυλιά, γάτες και άλογα.

Ο *S. aureus* είναι ένα από τα σημαντικότερα νοσοκομειακά παθογόνα. Πρόκειται για τον συνηθέστερο αιτιολογικό παράγοντα της πνευμονίας και το τρίτο κατά σειράν σημαντικότερο αίτιο λοιμώξεων του αίματος. Πολλά στελέχη του είναι ασυνήθιστα επιθετικά και ταυτοχρόνως ανθεκτικά στα κοινά αντιβιοτικά, γεγονός που καθιστά την αντιμετώπισή τους ιδιαίτερα δύσκολη.



*Staphylococcus aureus*

Προκαλεί πυρετογόνες μολύνσεις (εξανθήματα κλπ.), λοιμώξεις του δέρματος και των πληγών, λοιμώξεις του αναπνευστικού, σύνδρομο τοξικής καταπληξίας (TTS), τοξική επιδερμική νεκρόλυση, φλύκταινες, οστεομυελίτιδα, μηνιγγίτιδα και αρθρίτιδα. Επίσης, είναι το συνηθέστερο παθογόνο σε έλκη διαβητικών.

Η δυσλειτουργία των αμυντικών μηχανισμών γύρω από τους νεκρωμένους ιστούς ή μέσα στα οστά επιτρέπει στον *S. aureus* να προκαλεί οξείες λοιμώξεις (Νικολόπουλος, 2006). Τοπική χρήση επιθεμάτων μελιού έχουν ευεργετική επίδραση στις πληγές αυτές καθώς και σε τομές εγχείρησης και εγκαύματα που έχουν προσβληθεί από το βακτήριο (Mollan, 1998). Ο *S. aureus* προκαλεί και τροφικές δηλητηριάσεις, διότι καθώς αναπτύσσεται παράγει διάφορες θερμοσταθερές πρωτεϊνικές εντεροτοξίνες οι οποίες απελευθερώνονται στη μάζα της τροφής. Αν αυτή η μολυσμένη με εντεροτοξίνες τροφή καταναλωθεί εντός 1-6 ωρών, τότε εμφανίζεται γαστρεντερίτιδα συνοδευόμενη από ναυτία και εμετό. Οι τροφές που συνήθως συνδέονται με δηλητηριάσεις σταφυλοκοκκικής προέλευσης είναι τα προϊόντα που περιέχουν κρέμα, τα διάφορα κρέατα (συμπεριλαμβανομένου και των πουλερικών), τα αυγά, οι πουτίγκες και οι κρεμώδεις σάλτσες. Θάνατος από σταφυλοκοκκική δηλητηρίαση είναι πολύ σπάνιος, αν και τέτοιες

περιπτώσεις έχουν συμβεί σε ηλικιωμένα άτομα, σε βρέφη και σοβαρά εξασθενημένους οργανισμούς (Βιολογία των Μικροοργανισμών Brock, Τόμος I &II).

- ***Pseudomonas aeruginosa***

Η φθορίζουσα ψευδομονάδα ανήκει στα Gram αρνητικά βακτήρια. Είναι μη σπορογόνο που σχετίζεται συχνά με μολύνσεις του ουροποιητικού και του αναπνευστικού συστήματος του ανθρώπου. Τα κύτταρά της διατάσσονται μεμονωμένα, σε ζεύγη ή σε μικρές αλυσίδες. Αν και ταξινομείται στα αερόβια βακτήρια, θεωρείται από πολλούς προαιρετικά αναερόβιο, διότι προσαρμόζεται καλά και σε συνθήκες μερικής ή ολικής έλλειψης οξυγόνου.

Η *P. aeruginosa* προκαλεί ασθένειες σε ζώα, φυτά και στον άνθρωπο. Βρίσκεται στο έδαφος, το νερό και στη χλωρίδα του δέρματος. Είναι ευκαιριακό παθογόνο μικρόβιο για τον άνθρωπο και σημαντική αιτία σοβαρών ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων, όπως ουρολοιμώξεις, μηνιγγίτιδα, λοιμώξεις από καθετήρες, σηψαιμία, πνευμονία κ.α. ειδικά σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς (Khan MO et al, 2000).



***Pseudomonas aeruginosa***

Επίσης, μπορεί να προκαλέσει και άλλες λοιμώξεις όπως ωτίτιδα, λοιμώξεις τραυμάτων, επιπεφυκίτιδα κ.α. λοιμώξεις από *P. aeruginosa* παρατηρούνται κυρίως σε ασθενείς που πάσχουν από λευχαιμία ή άλλες νεοπλασίες, σε άτομα που έχουν υποστεί εγκαύματα, σε άτομα που πάσχουν από ινοκυστική νόσο, σε άτομα που έχουν υποστεί μεγάλες χειρουργικές επεμβάσεις και σε ασθενείς που θεραπεύονται με ακτινοβολίες, αντιβιοτικά και ανοσοκατασταλτικά φάρμακα. Αν προσβάλλει κρίσιμα όργανα όπως πνεύμονες, ουρικό σύστημα και νεφρά τα αποτελέσματα μπορεί να είναι θανατηφόρα. Το βακτήριο είναι εκ φύσεως ανθεκτικό σε πολλά από τα συνήθη αντιβιοτικά, άρα η χημειοθεραπεία είναι συχνά δύσκολη. Η ανθεκτικότητά του οφείλεται συνήθως σε ένα πλασμίδιο μεταφοράς ανθεκτικότητας (πλασμίδιο R), το οποίο φέρει γονίδια που κωδικοποιούν την αδρανοποίηση της τοξικότητας διαφόρων αντιβιοτικών.

Η *P. aeruginosa* απαντάται συνήθως στο περιβάλλον νοσοκομείων και μολύνει εύκολα ασθενείς που ακολουθούν θεραπεία για άλλες παθήσεις. Εποικίζει πολύ εύκολα σε ενδοσκοπικά ιατρικά όργανα και στα εξαρτήματά τους. Σε υγιείς ανθρώπους μπορούμε να την βρούμε στο φάρυγγα (0-7%), στα πτύελα (2%) και στα κόπρανα (3-24%) ενώ στους νοσοκομειακούς ασθενείς μπορεί να ανευρεθεί σε ακόμη μεγαλύτερα ποσοστά. Πολύ καλύτερα αναπτύσσεται σε υγρό και θερμό περιβάλλον.

Το βακτήριο αυτό παράγει διάφορες χρωστικές ουσίες όπως πυοκυανίνη, πυορουμπίνη, πυομελανίνη και φθορεσεΐνη. Περισσότερα από το 50% των στελεχών *P. aeruginosa* παράγουν την υδατοδιαλυτή χρωστική πυοκυανίνη η οποία έχει κυανοπράσινο χρώμα και χαρακτηρίζει τα στελέχη της χωρίς να χρειάζονται

περισσότερες βιοχημικές δοκιμασίες για την ταυτοποίησή τους (Grogan JB, 1996).

- ***Acinetobacter baumannii***

Είναι ένα είδος παθογόνου βακτήριο το οποίο αναφέρεται σαν αερόβιο, Gram- βακτηρίδιο και είναι ανθεκτικό στα περισσότερα αντιβιοτικά. Χαρακτηρίζεται σαν ευκαιριακά παθογόνο βακτήριο το οποίο προκαλεί ποικιλία σοβαρών λοιμώξεων στον άνθρωπο.



Ένα στέλεχος *baumannii* έχει ενοχοποιηθεί για σοβαρές λοιμώξεις επικίνδυνες για τη ζωή όπως νεκρωτική περιτονίτιδα. Μπορεί να προκαλέσει σοβαρή πνευμονία και λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, του αιμοποιητικού αλλά και άλλων συστημάτων του οργανισμού. Το *Acinetobacter baumannii* ως παθογόνο σχετίζεται άμεσα με τη νοσοκομειακή περίθαλψη.

Αποτελεί αίτιο ανάπτυξης τόσο ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων όσο και ενδημικών επεισοδίων σε ειδικό περιβάλλον, όπως ο χώρος των

ΜΕΘ, με αυξανόμενη συχνότητα 1,2. Επίσης, η εμφάνιση πολυανθεκτικών στελεχών - Multi Drug Resistant *Acinetobacter baumannii*- αποτελεί παγκόσμια πραγματικότητα, που καθιστά εξαιρετικά δύσκολο τον έλεγχο και την αντι-μετώπιση των λοιμώξεων αυτών.

### 1.9 Μέλι-πρότυπο με αντιμικροβιακές ιδιότητες: *Manuka honey*

Το μέλι Manuka προέρχεται από το φυτό *Leptospermum scoparium*, ένα γηγενές φυτό της νότιας Ζηλανδίας και νοτιοανατολικής Αυστραλίας.

Είναι θάμνος ή μικρό δέντρο ιδιαίτερα γνωστό στη φυλή Maori, οι οποίοι το χρησιμοποιούσαν για αιώνες στην παραδοσιακή ιατρική τους. Το χρησιμοποιούσαν επίσης για τις θεραπευτικές, αντιβιοτικές και αντιβακτηριδιακές του ιδιότητες. Το φυτό αυτό βρίσκεται σήμερα σε ολόκληρη τη Ν. Ζηλανδία αλλά είναι ιδιαίτερα κοινό στις ξηρότερες ανατολικές ακτές του Βορείου και του Νοτίου Νησιού, στην Αυστραλία, στην Τασμανία, στην Βικτώρια και στη Νέα Νότια Ουαλία.

Η μοντέρνα ιατρική ανέπτυξε μια μέθοδο για να μετράει την αντισηπτική ισχύ αυτού του μοναδικού στον κόσμο μελιού, το Unique Manuka Factor (UMF). Η μονάδα μέτρησης UMF κατηγοριοποιεί το μέλι με βάση την αντιβακτηριδιακή του δύναμη. Κάθε παρτίδα ελέγχεται συστηματικά από εγκεκριμένο εργαστήριο και ταξινομείται κατά αύξουσα σειρά αποδοτικότητας σε κλίμακα από το 0 μέχρι το 25. Όσο πιο υψηλότερο το επίπεδο, τόσο πιο αποδοτική είναι η αντισηπτική δράση του Manuka honey. Η UMF, η μοναδική αξιόπιστη μονάδα μέτρησης

αποδοτικότητας του μελιού Manuka, έχει προκύψει από τη σύγκριση της αντισηπτικής του ιδιότητας με αυτή του διαλύματος καρβοξυλικού οξέος, το οποίο είναι ένα πανίσχυρο αντισηπτικό μόριο που χρησιμοποιείται ευρέως στη μοντέρνα ιατρική.

Το 2008, αναγνωρίστηκε η δραστική ουσία του Manuka honey, η μεθυλογλυοξάλη (MGO), η οποία ανιχνεύεται σε υψηλά επίπεδα (Adams CJ, 2009).

## **1.10 Προβλήματα που δημιουργεί το μέλι στον ανθρώπινο οργανισμό**

Υπάρχουν πράγματι κάποιες περιπτώσεις κατά τις οποίες η κατανάλωση μελιού σε κάποιες κατηγορίες ή ηλικίες ανθρώπων μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα, αν και η συχνότητα αυτών των περιπτώσεων είναι ελάχιστη (Frank, 2004).

### **1.10.1 Αλλαντίαση – Βοτουλισμός**

Η αλλαντίαση είναι μία παραλυτική ασθένεια που προκαλείται από τη νευροτοξίνη που παράγει το μικρόβιο κλωστρίδιο *Clostridium botulinum*. Σπόρια του μικροβίου μπορούν να βρεθούν στο χώμα, στο νερό, στα φύκη της θάλασσας, στην οικιακή σκόνη ή στην επιφάνεια τροφίμων. Ανάλογα με τον τρόπο ή την αιτία εισόδου των σπορίων του μικροβίου στον οργανισμό του ανθρώπου, διακρίνονται 4 τύποι εκδήλωσης της ασθένειας:

- ◆ Κατάποση σπορίων του μικροβίου που έχουν αναπτυχθεί σε πλημμελώς αποστειρωμένες ή κακώς συντηρημένες κονσέρβες.
- ◆ Είσοδος σπορίων στον οργανισμό μέσω ενός τραύματος, χειρουργικού ή άλλου.
- ◆ Βρεφικός βοτουλισμός.
- ◆ Βοτουλισμός σε ενήλικες ή μεγαλύτερα παιδιά (Nakano & Sakaguchi, 1991).

Αν και οι περισσότερες περιπτώσεις μόλυνσης του ανθρώπου από τη νευροτοξίνη της αλλαντίασης οφείλονται σε τροφική δηλητηρίαση, το μέλι έχει συσχετισθεί με το βρεφικό βοτουλισμό (Frank, 2004).

Σε συνήθειες συνθήκες η μικροχλωρίδα του εντέρου του ανθρώπου καταστέλλει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των σπορίων του κλωστριδίου που μπορεί να βρεθεί εκεί. Στον εντερικό σωλήνα όμως των βρεφών, παιδιών ηλικίας μικρότερη του 1 έτους, καθώς η μικροχλωρίδα αυτή δεν έχει πλήρως αναπτυχθεί, τα σπόρια του μικροβίου μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να παράγουν τη νευροτοξίνη. Σε ένα διάστημα 16 ετών (1976-1992), 1.134 περιπτώσεις βρεφικού βοτουλισμού αναφέρθηκαν στις ΗΠΑ, με ένα μέσο όρο 60 περιπτώσεων ανά έτος.

Αν και το ποσοστό θανατηφόρων κρουσμάτων κυμαίνεται στο 2%, ο βρεφικός βοτουλισμός θεωρείται υπεύθυνος για το 5% των περιπτώσεων του συνδρόμου «βρεφικού αιφνίδιουθανάτου». Από αυτές, οι περιπτώσεις που έχουν ταυτιστεί με την κατανάλωση μελιού αποτελούν το 20% (Beetlestone, 1994).

Είναι γνωστό ότι σπόρια του *Clostridium botulinum* μπορούν να βρεθούν στο μέλι. Πιθανές πηγές θεωρούνται το νέκταρ και η γύρη των ανθέων, αλλά και η μόλυνση του μελιού κατά το στάδιο της επεξεργασίας



του (Berthold, 1997).

Βρέθηκε ότι το 10-15% των δειγμάτων μελιού που εξετάστηκαν στις ΗΠΑ, περιείχαν σπόρια του κλωστριδίου *Clostridium botulinum* (Midula et al, 1979). Όσον αφορά στα ελληνικά μέλια, δεν γνωρίζουμε εάν περιέχουν σπόρια αλλαντίασης, σε ποια συχνότητα και ποιου τύπου (υπάρχουν 6 διαφορετικοί τύποι αλλαντίασης). Εκείνο όμως που είναι γνωστό είναι ότι δεν έχει αναφερθεί καμία περίπτωση βρεφικού βοτουλισμού για την οποία υπεύθυνη να είναι η κατανάλωση μελιού (Beetlestone, 1994).

#### 1.10.2 Δηλητηριώδη μέλια

Είναι γνωστό ότι πολλών ειδών φυτά διαθέτουν σε διάφορα μέρη τους, όπως βλαστοί, φύλλα, ρίζα, ουσίες τοξικές. Αυτές συνήθως είναι αλκαλοειδή, γλυκοσίδες, δεψικές ουσίες. Οι ουσίες αυτές προστατεύουν τα φυτά από φυσικούς τους εχθρούς ή αποτρέπουν ζώα από το να τα φάνε. Μάλιστα, μερικές από αυτές τις ουσίες, κυρίως αλκαλοειδή, σε μικρές δόσεις χρησιμοποιούνταν παλαιότερα από τον άνθρωπο ως φαρμακευτικές ουσίες, όπως η ατροπίνη (Krochmol, 1999).

Κάτω από ιδιαίτερες συνθήκες, συνήθως εξαιτίας μιας φυσιολογικής διαταραχής, τοξικές ουσίες συγκεντρώνονται στο νέκταρ ή τη γύρη κάποιων φυτών και έτσι συλλέγονται από τις μέλισσες. Στις περισσότερες περιπτώσεις αυτό οδηγεί στη δηλητηρίαση των μελισσών με συνηθέστερο επακόλουθο το θάνατό τους. Σε ελάχιστες περιπτώσεις το τοξικό αυτό νέκταρ ή γύρη δεν σκοτώνει τις μέλισσες και έτσι συγκεντρώνεται στο μέλι το οποίο παράγουν. Μία τέτοια περίπτωση αναφέρεται σε είδη της οικογένειας *Rhododendron*, στην οποία ανήκουν

οι αζαλέες και τα Ροδόδεντρα. Η τοξική ουσία στην περίπτωση αυτή είναι η ανδρομεδοτοξίνη, η οποία προκαλεί στον άνθρωπο αίσθημα δυσφορίας, ναυτίας και γενικά, χαρακτηριστικά δηλητηρίασης (Olszowy, 1977).

### 1.11 Σκοπός της εργασίας

Όπως φάνηκε από τα παραπάνω, το μέλι είναι μία από τις τροφές με ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον, αφού εμφανίζει μία σειρά από εκπληκτικά χαρακτηριστικά. Είναι μια τροφή πλούσια σε θρεπτικά συστατικά, είναι φυσικό γλυκαντικό, με έντονη αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν στα 9 δείγματα ελληνικών μελιών να ελεγχθεί η παρουσία βακτηρίων τα οποία να εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση, έναντι ενός Gram θετικού βακτηρίου (*Staphylococcus aureus*) και δύο Gram αρνητικών βακτηρίων (*Pseudomonas aeruginosa* και *Acinetobacter baumannii*). Ο *St.aureus* εμφανίζει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό μεθικιλίνη και τα *Ps.aeruginosa* και *Ac.baumannii* εμφανίζουν ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες. Η ταυτοποίηση των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα μέλια αυτά, βασίστηκε στο 16S rRNA γονίδιο.

Η ανακάλυψη βακτηρίων στα μέλια της χώρας μας, που έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες, είναι πολύ πιθανόν να ανοίξει ένα νέο κεφάλαιο τόσο στην επιστημονική κοινότητα όσο και στην οικονομία.

## 2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Δείγματα μελιών

Η μελέτη αφορά 9 δείγματα ελληνικών μελιών. Η παραγωγή των μελιών έγινε κατά τα έτη 2010 και 2012. Η προμήθεια αυτών των μελιών έγινε απευθείας από τους ίδιους τους παραγωγούς.

Πρόκειται για μέλια ανθέων και 1 μέλι μελιτώματος. Στα μέλια ανθέων συγκαταλέγονται : μέλι από ρείκι, από κουμαριά, από ρίγανη-τσάι, από αγριοβότανα-θυμάρι, από άγρια ρίγανη-άγριο τριφύλλι, από ηλίανθο και από βαμβάκι . Το μέλι μελιτώματος αφορά τη βελανιδιά.

Τα 9 δείγματα μελιών τα οποία ερέυνησα επιλέχθηκαν από ένα σύνολο 32 μελιών ως εκείνα με το μεγαλύτερο βακτηριακό φορτίο όπως διαπιστώθηκε σε προηγούμενη μεταπτυχιακή εργασία της Φωτεινής Παπαευαγγέλου.

Τα 32 δείγματα μελιών αριθμήθηκαν με τυχαία σειρά. Τα δείγματα μελιών που ερέυνησα κατά τη διάρκεια της εργασίας μου ήταν τα εξής:5,19,10,21,22,25,26,30,32. Η αρίθμηση και τα στοιχεία του κάθε δείγματος παραθέτονται στο παράρτημα, στο τελευταίο τμήμα της εργασίας.

## 2.2 Απομόνωση βακτηρίων από θρεπτικό υπόστρωμα *Bacillus cereus* medium και από θρεπτικό υπόστρωμα PCA (plate count agar)

### ◆ *Bacillus cereus* medium

Αποτελεί ένα θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται για την απομόνωση και την καταμέτρηση αποικιών *Bacillus cereus* στα τρόφιμα.

Η ζύμωση της μαννιτόλης σε αυτό το θρεπτικό μέσο παράγει ένα ροζ-υπόλευκο χρώμα με το οποίο χρωματίζονται οι αποικίες. Η παρουσία λεκιθινάσης υποδεικνύεται από ένα λευκό ίζημα γύρω από τις αποικίες που έχουν αναπτυχθεί στο τρυβλίο. Τέλος, προστίθεται πολυμυξίνη (Polymyxin B) για να καταστείλει τυχόν κολοβακτηρίδια αλλά και μερικά *Proteus spp* και Gram θετικά βακτήρια που μπορούν να αυξηθούν μέσω αυτής (labm.com).

Για την παρασκευή 1000 ml θρεπτικού μέσου, ζυγίστηκαν 46 gr *Bacillus cereus* medium και προστέθηκαν σε 900 ml απιονισμένο νερό. Έπειτα, αφού έγινε καλή ανάδευση για κάποια λεπτά, πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στους 120 °C για 23 λεπτά. Μετά την αποστείρωση παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να φτάσει περίπου τους 47 °C. Στη συνέχεια, υπό ασηπτικές συνθήκες, προστέθηκαν 100 ml από το X037 egg yolk emulsion (κρόκος αυγού) και 2 vials από το αντιβιοτικό Polymyxin B (πολυμυξίνη). Έγινε καλή ανακίνηση του θρεπτικού και μοιράστηκε σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri.

### ◆ *Plate Count Agar (PCA)*

Για την ανάπτυξη βακτηρίων το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το PCA (plate count agar). Πρόκειται για ένα θρεπτικό μέσο που υποστηρίζει την ανάπτυξη ευρέους φάσματος βακτηρίων (labm.com).

Για την παρασκευή 1000 ml PCA (της εταιρίας LAB M), ζυγίστηκαν 23, 5 gr θρεπτικού μέσου και προστέθηκαν σε 1 λίτρο απιονισμένο νερό. Έπειτα, αφού ανακινήθηκε για λίγα λεπτά ώστε να ομογενοποιηθεί καλά, αποστειρώθηκε στους 120 °C για 23 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να πιάσει τη θερμοκρασία των 47 °C περίπου και έπειτα πριν στερεοποιηθεί, μοιράστηκε σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri.

## 2.3 **Θρεπτικά υποστρώματα άλλα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν**

### ◆ *Phosphate buffer saline (PBS)*

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

Το PBS έχει πολλές χρήσεις επειδή είναι ισοτονικό και μη τοξικό

για τα κύτταρα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αραίωση των ουσιών. Χρησιμοποιείται για την έκπλυση δοχείων που περιέχουν κύτταρα. Το PBS μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως διαλύτης για να στεγνώσει βιομόρια. Ο απλούστερος τρόπος για να προετοιμαστεί ένα διάλυμα PBS είναι να χρησιμοποιηθούν PBS δισκία buffer. Είναι σχεδιασμένα για να δίνουν ένα έτοιμο προς χρήση διάλυμα PBS μετά τη διάλυση σε συγκεκριμένη ποσότητα απιονισμένου νερού.

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

### ◆ *Nutrient Broth*

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

Για την παρασκευή 1000 ml θρεπτικού μέσου, ζυγίστηκαν 13 gr Nutrient Broth και προστέθηκαν σε 1 λίτρο απιονισμένο νερό. Έπειτα, αφού έγινε καλή ανάδευση για μερικά λεπτά, μοιράστηκαν 2 ml του θρεπτικού μέσου σε κάθε ένα από τα μικρότερα μπουκαλάκια (vials) και πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στους 120 °C για 23 λεπτά. Τα vials τοποθετήθηκαν στο ψυγείο στους 4 °C.

### ◆ *Γλυκερόλη*

Η γλυκερόλη ή γλυκερίνη είναι μία απλή πολυολική ένωση. Πρόκειται για ένα άχρωμο, άοσμο, παχύρρευστο υγρό με χαμηλή τοξικότητα, που χρησιμοποιείται ευρέως σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Η γλυκερόλη έχει τρεις ομάδες υδροξυλίου που είναι υπεύθυνες για την διαλυτότητά της στο νερό και την υγροσκοπική της φύση. Η ραχοκοκαλιά της γλυκερίνης είναι το επίκεντρο όλων των λιπιδίων, γνωστών ως τριγλυκερίδια (Christophe Ralf, 2006).

### ◆ *Nutrient Agar*

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

Για την παρασκευή 1000ml θρεπτικού μέσου, ζυγίστηκαν 21,5gr Nutrient Agar και προστέθηκαν σε 1 λίτρο απιονισμένο νερό. Έπειτα αφού έγινε καλή ανάδευση για μερικά λεπτά, πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στους 120 οC για 23λεπτά. Το διάλυμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου μετά την αποστείρωση έτσι ώστε να φτάσει στους 47οC περίπου και στη συνέχεια μοιράστηκε σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri, υπό άσηπτες συνθήκες, πριν στερεοποιηθεί.

### ◆ *Luria Bertani Broth (LB)*

Το LB Broth είναι ένα διατροφικά πλούσιο μέσο που χρησιμοποιείται για υγρές καλλιέργειες. Είναι ένα από τα πιο συνηθισμένα μέσα καλλιέργειας στο εργαστήριο, κυρίως για στελέχη του

βακτηρίου *Escherichia coli*. Υπάρχουν πολλά διαφορετικά σκευάσματα αυτού του θρεπτικού μέσου, όμως γενικά, μοιράζονται πολλά κοινά συστατικά όπως πεπτόνες της καζεΐνης, βιταμίνες (συμπεριλαμβανομένου αυτών του συμπλέγματος B), ιχνοστοιχεία (άζωτο, θείο, μαγνήσιο) και μεταλλικά στοιχεία (Nikaido H., 2009).

Για την παρασκευή 1000 ml θρεπτικού μέσου, ζυγίστηκαν 25 gr LB Broth και προστέθηκαν σε 1 λίτρο απιονισμένο νερό. Έπειτα, αφού έγινε καλή ανάδευση για μερικά λεπτά, μοιράστηκαν 5 ml του θρεπτικού μέσου σε κάθε ένα από τα μικρότερα μπουκαλάκια (vials) και πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στους 120 °C για 23 λεπτά. Τα vials τοποθετήθηκαν στο ψυγείο στους 4 °C.

#### ✓ *Soft Agar*

Το συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο αποτελεί ένα μίγμα μεταξύ Nutrient Broth και Nutrient Agar. Η σύσταση του μέσου σε Nutrient Agar είναι 0,75%.

Για την παρασκευή 100 ml αυτού του διαλύματος, ζυγίστηκαν 1,3 gr Nutrient Broth και 0,75 gr Nutrient Agar. Μετά από καλή ανάδευση λίγων λεπτών, πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στους 120 °C για 23 λεπτά. Το θρεπτικό μέσο παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για να φτάσει τη θερμοκρασία των 47 °C και έπειτα, αφού προστέθηκε ο μικροοργανισμός-στόχος, μοιράστηκε σε τρυβλία πριν στερεοποιηθεί, έτσι ώστε να καλύψει τις υπάρχουσες αποικίες, σε μία διαδικασία που θα αναλυθεί παρακάτω.



*Για κάθε ένα από τα δείγματα μελιού, ακολουθήθηκαν οι εξής διαδικασίες απομόνωσης βακτηρίων:*

- ***Πρώτη διαδικασία απομόνωσης βακτηρίων***

- ✓ Σε ένα αποστειρωμένο πλαστικό φιαλίδιο τύπου falcon τοποθετήθηκαν 5 ml από το δείγμα μελιού και 5 ml PBS (buffer)
  - ✓ Το μίγμα ομογενοποιήθηκε με τη χρήση vortex
  - ✓ Φυγοκεντρήθηκε στις 4000rpm για 45 min
  - ✓ Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, κρατώντας το ίζημα και 2 ml περίπου του υπερκειμένου για να γίνει η επίστρωση
  - ✓ Ομογενοποιήθηκε το μίγμα με τη χρήση vortex
  - ✓ Τοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο στους 80 °C για 10 min ώστε να σκοτωθούν όλες οι βλαστικές μορφές και να παραμείνουν τα ενδοσπόρια. Με τη χρήση πιπέτας, 150 μl από το falcon τοποθετήθηκαν σε ένα τρυβλίο Petri με *B. cereus* medium
  - ✓ Με τη βοήθεια μιας πιπέτας Pasteur, έγινε επίστρωση στα τρυβλία με το παραπάνω θρεπτικό υπόστρωμα
  - ✓ Τοποθετήθηκαν τα τρυβλία στον επωαστήρα στους 30 °C για 24-48 ώρες
- Για κάθε ένα από τα μέλια έγιναν 3 επαναλήψεις από το *Bacillus cereus* medium

- *Δεύτερη διαδικασία απομόνωσης βακτηρίων*

- ✓ Σε ένα αποστειρωμένο πλαστικό φιαλίδιο τύπου falcon τοποθετήθηκαν 0,5 ml από το δείγμα μελιού και 0,5 ml PBS (buffer)
- ✓ Το μίγμα ομογενοποιήθηκε με τη χρήση vortex
- ✓ Φυγοκεντρήθηκε στις 4000rpm για 45 min
- ✓ Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, κρατώντας το ίζημα και 0,5 ml περίπου του υπερκειμένου για να γίνει η επίστρωση
- ✓ Ομογενοποιήθηκε το μίγμα με τη χρήση vortex
- ✓ Με τη χρήση πιπέτας, 150 μl από το falcon τοποθετήθηκαν σε ένα τρυβλίο Petri με PCA
- ✓ Με τη βοήθεια μιας πιπέτας Pasteur, έγινε επίστρωση στα τρυβλία με το παραπάνω θρεπτικό υπόστρωμα
- ✓ Τοποθετήθηκαν τα τρυβλία στον επωαστήρα στους 30 °C για 24-48 ώρες
- ✓ Για κάθε ένα από τα μέλια έγιναν 3 επαναλήψεις από το Bacillus cereus medium

## 2.4 Διαδικασία καλλιέργειας βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα μέλια

### 2.4.1. Αποθήκευση βακτηρίων σε stock γλυκερόλης 25%

Από τα τρυβλία με τις αποικίες των Gram θετικών αλλά και άλλων βακτηρίων που αναπτύχθηκαν, έγινε επιλογή κάποιων από αυτών με σκοπό να αποθηκευτούν και στη συνέχεια να καλλιεργηθούν και να γίνει απομόνωση βακτηριακού DNA.

Προκειμένου να απομονωθούν και να διατηρηθούν όσο το δυνατόν περισσότερα βακτήρια ζωντανά, έγινε stock γλυκερόλης 25% αυτών των αποικιών και στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε microtiter plate το οποίο αποθηκεύτηκε στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### *Η διαδικασία έγινε ως εξής:*

- ◆ Παρασκευάστηκε διάλυμα 75 ml Nutrient Broth και 25 ml γλυκερόλης σε τελικό όγκο 100 ml
- ◆ Το διάλυμα τοποθετήθηκε στον αναδευτήρα για να διαλυθεί καλά η παχύρρευστη γλυκερόλη, μαζί με ένα μαγνητάκι για καλύτερη ανάδευση
- ◆ Πραγματοποιήθηκε αποστείρωση του διαλύματος στους  $120^{\circ}\text{C}$  για 23 λεπτά
- ◆ Με τη βοήθεια μιας πιπέτας, υπό ασηπτικές συνθήκες, τοποθετήθηκαν 200 μl του διαλύματος γλυκερόλης σε κάθε ένα από τα πηγαδάκια του microtiter plate
- ◆ Στη συνέχεια, πάντα υπό ασηπτικές συνθήκες, με αποστειρωμένες

οδοντογλυφίδες, ξύθηκε κάθε επιλεγμένη αποικία από το τρυβλίο και τοποθετήθηκε σε κάθε ένα από τα πηγαδάκια του plate (1 αποικία σε κάθε πηγαδάκι)

- ◆ Έγινε επώαση του plate στους 30 °C για 24 ώρες
- ◆ Το microtiter plate αποθηκεύτηκε στους -80 °C
- Το microtiter plate περιέχει 96 πηγαδάκια τα οποία είναι αριθμημένα ως εξής: κάθετα με γράμματα του αγγλικού αλφάβητου από το Α-Η και οριζόντια με αριθμούς από το 1-12. Η ίδια αρίθμηση χρησιμοποιήθηκε και για τις αντίστοιχες αποικίες.

#### 2.4.2 Ανακαλλιέργεια των αποθηκευμένων βακτηρίων

Η ανακαλλιέργεια των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα μέλια, έγινε με σκοπό να ανιχνευθούν ζώνες αναστολής αυτών των βακτηρίων έναντι 3 βακτηριακών στελεχών που εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, δηλαδή των *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Acinetobacter baumannii* όπως προαναφέρθηκε στο τμήμα 1.11. Σε αυτήν την πειραματική διαδικασία, έγινε προσπάθεια να βρεθούν ποιες βακτηριακές αποικίες που απομονώθηκαν από το μέλι εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση, έγινε δηλαδή διαλογή (screening) των αποικιών του microtiter plate.

Παρασκευάστηκε διάλυμα Nutrient Broth 60 ml και στη συνέχεια, μοιράστηκε σε 30 μικρότερα φιαλίδια (vials), 2 ml διαλύματος σε κάθε vial. Τα vials τοποθετήθηκαν στην αποστείρωση στους 120 °C για 23 λεπτά. Αφού αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να κρυώσουν, σε κάθε vial, προστέθηκε με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας

και υπό ασηπτικές συνθήκες, μικρή ποσότητα των αποθηκευμένων αποικιών από το microtitter plate. Έγινε επώαση των vials στους 30 °C για 24 ώρες. Έπειτα, με τη χρήση πιπέτας, τοποθετήθηκαν 0,5 μl από κάθε υγρή καλλιέργεια, σε ένα τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar. Σε ένα τρυβλίο τοποθετήθηκαν 0,5 μl από 5 διαφορετικά vials, σε αρκετή μεταξύ τους απόσταση, έτσι ώστε να διακρίνονται ξεκάθαρα οι διαφορετικές αποικίες. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 6 τρυβλία. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 30 °C για 16-18 ώρες. Ταυτόχρονα, έγινε καλλιέργεια των μικροοργανισμών-στόχων, δηλαδή του *S. aureus*, *P. Aeruginosa* και *Ac.baumannii*. Παρασκευάστηκε διάλυμα LB Broth 15 ml και μοιράστηκε σε 3 vials, 5 ml διαλύματος σε κάθε vial. Τα vials τοποθετήθηκαν στην αποστείρωση στους 120 °C για 23 λεπτά. Με τη βοήθεια του μικροβιολογικού κρίκου και πάντα υπό ασηπτικές συνθήκες, τοποθετήθηκε μικρή ποσότητα αυτών των μικροοργανισμών σε κάθε vial (οι μικροοργανισμοί ήταν αποθηκευμένοι σε stock γλυκερόλης στους -80 °C). Οι υγρές καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37 °C για 16-18 ώρες και στη συνέχεια, διατηρήθηκαν στο ψυγείο στους 4 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

***Η διαδικασία διαλογής-εύρεσης βακτηριακών στελεχών με αντιμικροβιακή δράση ήταν η εξής:***

✓ Μετά την επώαση των τρυβλίων και των μικροοργανισμών-στόχων, παρασκευάστηκαν 100 ml από το soft agar και τοποθετήθηκαν για αποστείρωση στους 120 °C για 23 λεπτά

✓ Το διάλυμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να φτάσει τους 47 °C περίπου

- ✓ Σε ένα vial τοποθετήσαμε 5ml LB broth και εκεί προσθέσαμε 750μl από την αρχική καλλιέργεια του μικροοργανισμού-στόχου με σκοπό να τον αραιώσουμε, έπειτα ρίξαμε 1ml από το διάλυμα αυτό στο παραπάνω διάλυμα του soft agar
  - ✓ Έγινε καλή ανάδευση ώστε τα κύτταρα να οργανισμού-στόχου να επεκταθούν σε όλη τη μάζα του διαλύματος
  - ✓ Τέλος, πριν το διάλυμα στερεοποιηθεί, τοποθετήθηκε πολύ προσεκτικά μέσα στα τρυβλία με τις ανεπτυγμένες αποικίες μέχρι να τις καλύψει όλες
  - ✓ Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν για επώαση στους 37 °C για 16-18 ώρες
- Για κάθε ένα τρυβλίο που περιείχε τις 5 διαφορετικές αποικίες, έγιναν 3 επαναλήψεις με το soft agar, μία για τον σταφυλόκοκκο, μία για την ψευδομονάδα και μία για το ακινετοβακτηρίδιο
  - Με τον ίδιο τρόπο, έγινε διαλογή (screening), όλων των αποικιών του microtitter plate

#### 2.4.3. Επανάληψη των αποτελεσμάτων

Οι βακτηριακές αποικίες που φάνηκε να εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση κατά την πρώτη φάση του screening, υποβλήθηκαν σε επανάληψη, με σκοπό να αυξηθεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια με αυτή του τμήματος 2.4.2, αυτή τη φορά μόνο με τις αποικίες που έδωσαν ζώνες αναστολής κατά την πρώτη φάση του screening. Για κάθε μία αποικία, έγιναν 3 επαναλήψεις.

#### 2.4.4. Stock γλυκερόλης

Οι βακτηριακές αποικίες που απομονώθηκαν απ' το μέλι και έδωσαν ζώνες αναστολής οι οποίες επιβεβαιώθηκαν και από τις επαναλήψεις, διατηρήθηκαν σε stock γλυκερόλης για να διασωθούν όσο το δυνατόν περισσότερα βακτήρια ζωντανά.

#### *Η διαδικασία έγινε ως εξής:*

- ✓ Υγρό θρεπτικό μέσο Nutrient Broth τοποθετήθηκε σε μικρά φιαλίδια (vials). Μοιράστηκε η ποσότητα των 5 ml στο κάθε vial όπου αποστειρώθηκε και έπειτα μεταφέρθηκαν με αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες οι πρόσφατα ανεπτυγμένες αποικίες των βακτηρίων
- ✓ Οι υγρές καλλιέργειες επώαστηκαν στους 30 °C για 24 ώρες
- ✓ Έπειτα, σε αποστειρωμένα erpendorf μεταφέρθηκε η ποσότητα των 1,5 ml από το κάθε γυάλινο φιαλίδιο και έγινε φυγοκέντρωση στις 12000rpm για 3 λεπτά
- ✓ Στη συνέχεια, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε 1 ml από φρέσκο LB Broth και έγινε vortex
- ✓ Έγινε μεταφορά σε cryovials και έπειτα προσθήκη γλυκερόλης 300-350 ml (τελική συγκέντρωση γλυκερόλης 15-20%) και πραγματοποιήθηκε πολύ καλό vortex
- ✓ Τα cryovials παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και στη συνέχεια διατηρήθηκαν στους -80 °C, όπου και παρέμειναν σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

## 2.5 Απομόνωση του DNA από τα βακτηριακά στελέχη

Από το κάθε δείγμα που έχουμε σε stock γλυκερόλης στη διάθεσή μας, παίρνουμε μικρή ποσότητα κυττάρων με μια αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα και την τοποθετούμε σε erpendorf που περιέχει 20μl SDS-NaOH. Επιάζουμε για 15 λεπτά στους 95°C και μετά προσθέτουμε 180μL αποστειρωμένου H<sub>2</sub>O και πραγματοποιούμε ανάμειξη με πιπετάρισμα. Τέλος φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στις 4000rpm και διατηρούμε τα δείγματα στους -20°C.

### 2.5.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης DNA ανά δείγμα

Μετά την απομόνωση των προϊόντων ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός με τη διαδικασία της φασματοφωτομέτρησης, προκειμένου να διαπιστωθεί η συγκέντρωση DNA (ngr/μl DNA) που περιεχόταν σε κάθε δείγμα.

Η φασματοφωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε μετά από αραίωση 2 μl PCR προϊόντος σε 198 μl ddH<sub>2</sub>O (αραίωση 1/100), στα 260nm. Οι τιμές της απορρόφησης ανάγονται σε συγκέντρωση DNA, η οποία στην προκειμένη περίπτωση έπρεπε να είναι τουλάχιστον 100 ngr/μl για τις ανάγκες της αλληλούχισης.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων προέκυψαν σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$C \text{ (mg/ml)} = OD_{260\text{nm}} \times \text{συντελεστής αραίωσης} \times 50$$

όπου: συγκέντρωση DNA = οπτική απορρόφηση στα 260nm × συντελεστής αραίωσης (100) × 50



## 2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

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

Η PCR είναι μια *in vitro* μέθοδος και μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς περιορισμούς στη μορφή του χρησιμοποιούμενου DNA. Μπορεί ακόμα να διαφοροποιηθεί εκτενώς για την πραγματοποίηση ποικίλων μεθόδων γενετικής επέμβασης. Με τη χρήση της, συγκεκριμένα θραύσματα DNA μπορούν να κλωνοποιηθούν σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα απουσία ζωντανών κυττάρων (Bartlett & Stirling, 2003).

Με την PCR, μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι δισεκατομμύρια φορές, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του ακολουθία. Η αλληλουχία του γονιδίου ή του θραύσματος DNA είναι απαραίτητη για τον σχεδιασμό των συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων, το καθένα συμπληρωματικό με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Τα ολιγονουκλεοτίδια που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινήτρες πρέπει να δεσμεύονται σε θέσεις αντίθετες από την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί, με άλλα λόγια καθορίζουν τα άκρα του θραύσματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί (Bustin, 2000).

Με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση του γενετικού τόπου 16S rRNA. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ο συγκεκριμένος γενετικός τόπος επιλέχθηκε, γιατί είναι ο πιο συντηρημένος μεταξύ των βακτηριακών στελεχών, άρα και ο πιο

εξειδικευμένος για την ταυτοποίηση βακτηρίων (Spilker et al, 2004). Τα δείγματα ενισχύθηκαν με τη χρήση δυο εκκινητών, ενός αριστερού (forward primer), τον 27Fa και ενός δεξιού (reverse primer), τον 1492R. Το προϊόν της ενίσχυσης είναι περίπου 1500bp.

**Πίνακας 1.** Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR.

Εκκινητές	Αλληλουχίες	Ενισχυμένο τμήμα (bp)
27Fa	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	
		1500
1492R	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	

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

Τα συστατικά της αντίδρασης φαίνονται στον *Πίνακα 2* και οι συνθήκες της αντίδρασης περιγράφονται στον *Πίνακα 3*.

**Πίνακας 2:** Τα συστατικά της αντίδρασης PCR με το ζεύγος εκκινητών 27F και 1492R

	ρχικές υγκεντρώσεις	ελικές υγκεντρώσεις	ε τελικό όγκο =25 $\mu$ L.
<b>H<sub>2</sub>O (water for injection)</b>			4,76 $\mu$ L
<b>uffer (GENEON)</b>	X	X	$\mu$ L
<b>NTPS</b>	5mM	00 $\mu$ M	2 $\mu$ L
<b>7F primer</b>	5,9 $\mu$ M	5 $\mu$ M	46 $\mu$ L
<b>492R primer</b>	2,6 $\mu$ M	5 $\mu$ M	38 $\mu$ L
<b>aq DNA pol (KapaTaq)</b>	$\mu$ / $\mu$ l	unit	2 $\mu$ L
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	0mM	mM	$\mu$ L
<b>NA</b>			$\mu$ L

Σε όλες τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιείται “Negative control” (χωρίς το DNA- μήτρα) για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη ή όχι επιμολύνσεων, καθώς επίσης και “Positive Control” για να επιβεβαιώνουμε την ορθή λειτουργία της PCR. Ως “Positive Control” χρησιμοποιήσαμε DNA του βακτηρίου *P. entomophila*.

**Πίνακας 3:** Συνθήκες αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των βακτηρίων.

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ	ΧΡΟΝΟΣ
94°C	5min
94°C	1min
57°C	30sec
72°C	1.5min
72°C	10min

**25 cycles**

## 2.7 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0.8% w/v

Όλα τα PCR προϊόντα ελέγχθησαν μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Η συγκέντρωση της αγαρόζης ήταν 0.8% και ο μάρτυρας μοριακού βάρους ήταν 2-Log DNA Ladder (0.1-10kb) (New England Biolabs Inc). Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης βασίζεται στο διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους.

## 2.8 Καθαρισμός των προϊόντων PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR έγινε με το kit “NucleoSpin Extract II” (Macherey-Nagel, Germany). Ο τελικός όγκος έκλουσης ήταν 30μl.

## 2.9 Αλληλούχιση και ανάλυση των αλληλουχιών με προγράμματα βιοπληροφορικής

Τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR αλληλουχήθηκαν από το τμήμα Ιστολογίας – Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με τη χρήση του εκκινητή 27F. Η ανάλυση των αλληλουχιών και η ταυτοποίηση των βακτηρίων έγινε με τα εργαλεία βιοπληροφορικής BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) και RDP (Ribosomal Database Project).

## 2.10 Φυλογενετική ανάλυση κλώνων με εργαλεία βιοπληροφορικής

### 2.10.1 Επεξεργασία αλληλουχιών

Για να ξεκινήσει η ανάλυση των κλώνων που έχουμε αλληλουχήσει, έπρεπε πρώτα να αφαιρέσουμε τις βάσεις που ανήκουν στο πλασμίδιο κλωνοποίησης και να κρατήσουμε την περιοχή που ανήκει στο *16S rRNA* γονίδιο. Η επεξεργασία των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα “Sequence Scanner” (<http://sequence-scanner.software.informer.com/>) και στη συνέχεια οι αλληλουχίες μετατράπηκαν σε μορφή fasta (προέκταση .fasta) με το πρόγραμμα “DNA baser” (<http://www.dnabaser.com/>). Από την παραπάνω επεξεργασία αποκλείστηκαν οι αλληλουχίες που δεν μπόρεσαν να “διαβαστούν” σωστά, καθώς και εκείνες που είχαν μόνο την αλληλουχία του πλασμιδίου (χωρίς ένθεμα).

## 2.10.2 Ribosomal Database Project (RDP)

Στη βάση δεδομένων “RDP” χρησιμοποιήθηκαν 2 εργαλεία:

α) RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>)

β) Sequence Match

([http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch\\_intro.jsp](http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp)).

Οι παράμετροι που χρησιμοποιούμε στο RDP Classifier είναι:

- Επιλέγω γονίδιο: 16S rRNA
- Εισαγωγή αλληλουχιών σε μορφή fasta
- Το μέγεθος αλληλουχιών πρέπει να είναι πάνω από 250bp

Οι παράμετροι που χρησιμοποιούμε στο Sequence Match είναι:

- Εισαγωγή αλληλουχιών σε μορφή fasta
- Strain: Both
- Source: Both
- Size: Both
- Quality: Good
- Taxonomy: Nomenclatural
- KNN matches: 20

Στα αποτελέσματα που προκύπτουν δίνεται η ταυτότητα της αλληλουχίας, το *similarity score* και το *seqmatch score*. Το *similarity score* δείχνει το ποσοστό ομοιότητας της αλληλουχίας που εξετάζουμε σε σχέση με τις αλληλουχίες που διαθέτει η βάση RDP. Το *seqmatch score* δίνει τον αριθμό των ολιγομερών 7bp που είναι κοινά μεταξύ της αλληλουχίας μας και μιας RDP αλληλουχίας διαιρεμένου με τον μικρότερο αριθμό μοναδικών ολιγομερών που υπάρχουν σε κάθε μια από τις δύο αλληλουχίες. Όσο η τιμή του τείνει στο 1, τόσο μεγαλύτερη είναι η ομοιότητα της αλληλουχίας με τον κοντινότερο συγγενή που εντόπισε.

### 2.10.3 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

Με το πρόγραμμα BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) συγκρίναμε τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες με τις αλληλουχίες που είναι καταχωρημένες στη συγκεκριμένη βάση δεδομένων μέσω τοπικής ομοπαράθεσης. Η εισαγωγή των αλληλουχιών στο blastn έγινε και πάλι σε μορφή fasta και οι παράμετροι ορίστηκαν ως εξής:

- Database: Others (nr etc) – Nucleotide collection (nr/nt)
- Optimize for: Highly similar sequences (megablast)

### 3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Καταμέτρηση βακτηριακών αποικιών

Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία, έγινε επιλογή κάποιων από αυτές, με σκοπό να απομονωθούν και να αποθηκευτούν σε microtiter plate. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, απομονώθηκαν 192 αποικίες, όσες δηλαδή χωράνε σε 2 microtiter plates. Ωστόσο, οι αποικίες που αναπτύχθηκαν ήταν πολύ περισσότερες.

Στον παρακάτω πίνακα, φαίνεται ο συνολικός αριθμός αποικιών από κάθε δείγμα που μελετήθηκε από όλες τις επαναλήψεις που χρειάστηκε να γίνουν.

**Πίνακας 4.**

Δείγμα μελιού	Σύνολο αποικιών
5-Κουμαριά και Ρεϊκι	21
19-Ηλίανθος	15
26-Μέλι ανθέων:άγρια ρίγανη και άγριο τριφύλλι	21
21-Βαμβάκι:με 20% περίπου μέλι άλλων ανθέων	27
32-Αγριοβότανα,παλιούρι,ακακία	2
10 - Αγριοβότανα και θυμάρι	92
22 - Θυμάρι:γυρεόκοκκοι 30%	20
25 --Τσάι και Ρίγανη	19
30 – Βελανιδιά	39



### 3.2 Microtiter Plate

Όπως προαναφέρθηκε, συμπληρώθηκαν με αποικίες 2 microtiter plates, οι οποίες προέρχονταν από διαφορετικά δείγματα του μελιού. Στον παρακάτω πίνακα, φαίνονται πόσες αποικίες αποθηκεύτηκαν σε κάθε plate και από ποιο δείγμα.

#### ***Πίνακας 5.***

##### **Microtiter plate No 1 (I)**

<b>Plate</b>	<b>Αριθμός αποικιών</b>	<b>Δείγμα Μελιού</b>
A1-A2	2	22
A3-C1	23	30
C2-C10	9	26
C11-D11	13	25
D12-E11	12	21
E12-H12	37	10

##### **Microtiter plate No 2 (II)**

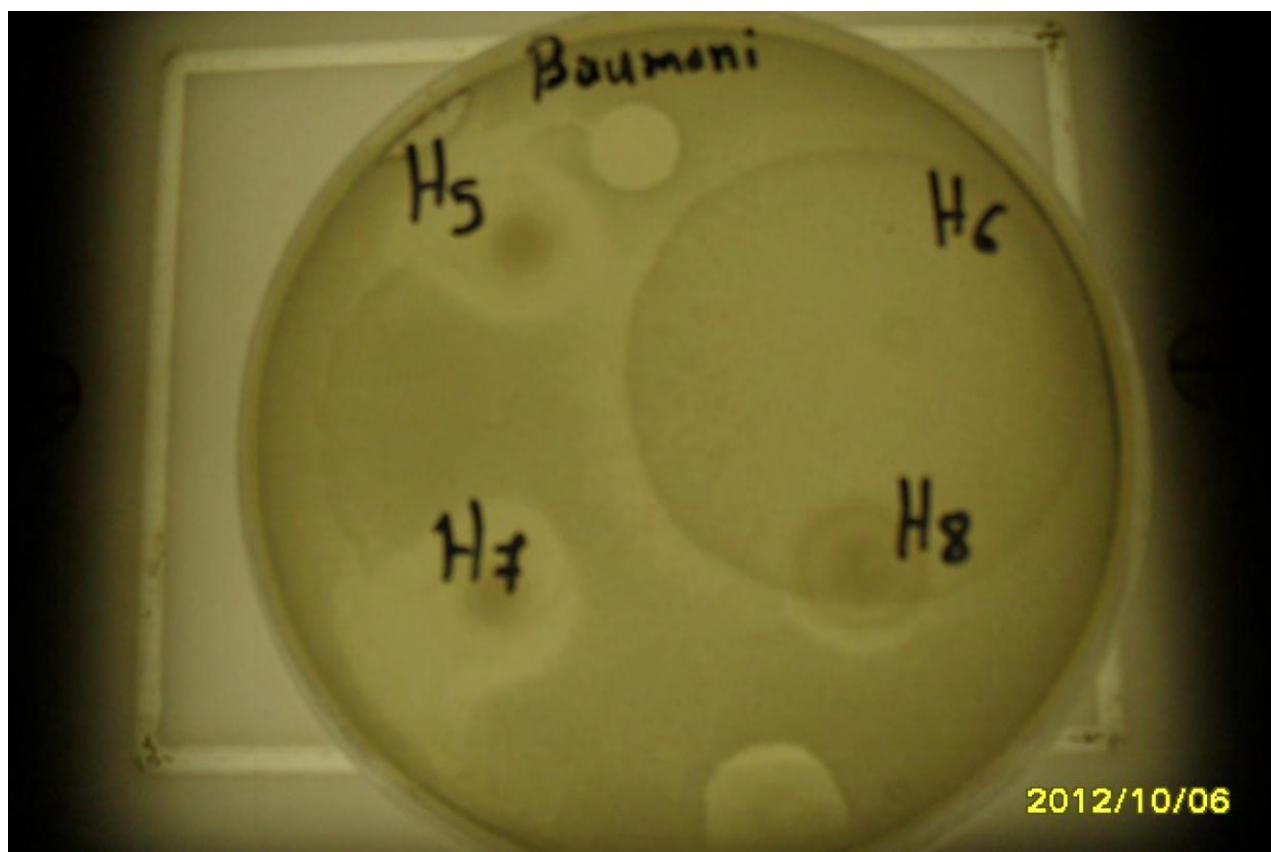
<b>Plate</b>	<b>Αριθμός αποικιών</b>	<b>Δείγμα Μελιού</b>
A1-A7,G6-G8	10	19
A8-B5,F8-F10	13	22
B6-B11	6	21
B12,C1	2	32
C1-C9,G9	10	26
C10-D10	13	5
D11-E4	6	30
E5-E7	3	25
E8-F7,F11-G5,G10-H12	34	10

### 3.3 Αναστολή

Αυτές οι 192 βακτηριακές αποικίες, ελέγχθηκαν για το αν αναστέλλουν τα βακτήρια *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* & *Acinetobacter baumannii*. Στον πίνακα που ακολουθεί, φαίνεται πόσες αποικίες έδωσαν ζώνες αναστολής έναντι των τριών αυτών βακτηρίων-στόχων και από ποια δείγματα μελιού προέρχονται.

**Πίνακας 5.**

<b>Αποικίες με αναστολή</b>	<b>Δείγμα Μελιού</b>	<b>Plate</b>
για <i>S. aureus</i>	26	No 1: C7,C8,C9,C10
για <i>S. aureus</i>	10	No 1: F8,G5
για <i>S. aureus</i>	5	No 2: C10, D9
για <i>S. aureus</i>	30	No 2: E4
για <i>S. aureus</i>	19	No 2: A1, A2, A3
για <i>S.aureus</i>	22	No 2 : B3
για <i>Ac.baumannii</i>	10	No 2 : H5, H7
για <i>S.aureus</i>	10	No 2 : G5



*Εικόνα 1 : ζώνες αναστολής για το Acinetobacter baumannii των αποικιών H5, H7 που ανήκουν στο δείγμα μελιού 10.*



**Εικόνα 2: ζώνες αναστολής για το *Staph.aureus* της αποικίας E4 που ανήκει στο δείγμα μελιού 30.**



**Εικόνα 3 : ζώνη αναστολής για το *Staph.aureus* της αποικίας D9 που ανήκει στο δείγμα μελιού 5.**

### **3.4 Αποτελέσματα επαναλήψεων**

Για να αυξηθεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, επιστρώθηκαν επαναληπτικά τρυβλία, αυτή τη φορά, μόνο με τις αποικίες που εμφάνισαν αναστολή κατά το πρώτο στάδιο του πειράματος. Από αυτά, επιβεβαιώθηκαν οι ζώνες αναστολής για 8 δείγματα βακτηριακών αποικιών έναντι του *Staphylococcus aureus*, από τα αρχικά 16 (οι υπόλοιπες 8 έδωσαν ψευδώς θετικά αποτελέσματα) και οι δύο αποικίες που εμφάνισαν ζώνη αναστολής έναντι του *Acinetobacter baumannii*, κατά το στάδιο των επαναλήψεων δεν εμφάνισαν αναστολή, υποδεικνύοντας ψευδώς θετικό αποτέλεσμα.

### 3.4.1 Διάμετρος αναστολής

Με τη βοήθεια ενός χάρακα, υπολογίστηκε η ακτίνα των αποικιών η οποία διπλασιάστηκε χωρίς να περιέχεται η διάμετρος της βακτηριακής αποικίας η οποία ποικίλλει από στέλεχος σε στέλεχος.

**Πίνακας 6.**

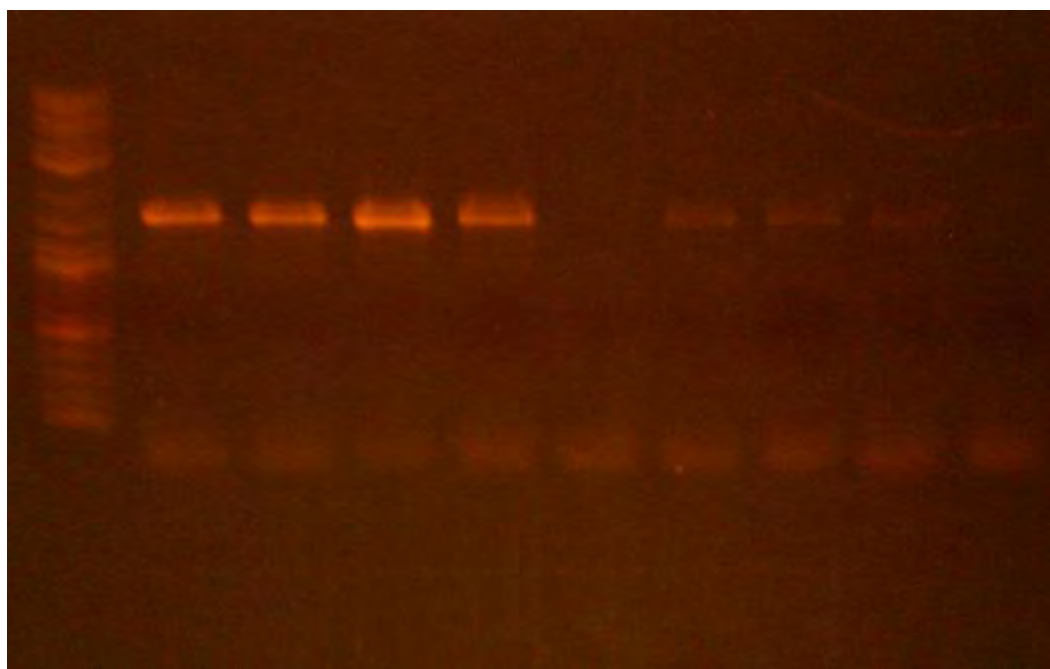
<b>Αποικίες (plate)</b>	<b>Διάμετρος Αναστολής</b>
A1(II)	0,9 cm
A2(II)	1,1 cm
A3(II)	1,2 cm
B8(II)	2,3 cm
C10(II)	1,5 cm
D9(II)	0,5 cm
E4(II)	1,2 cm
C9 (I)	1 cm

### 3.5 Μοριακή ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών

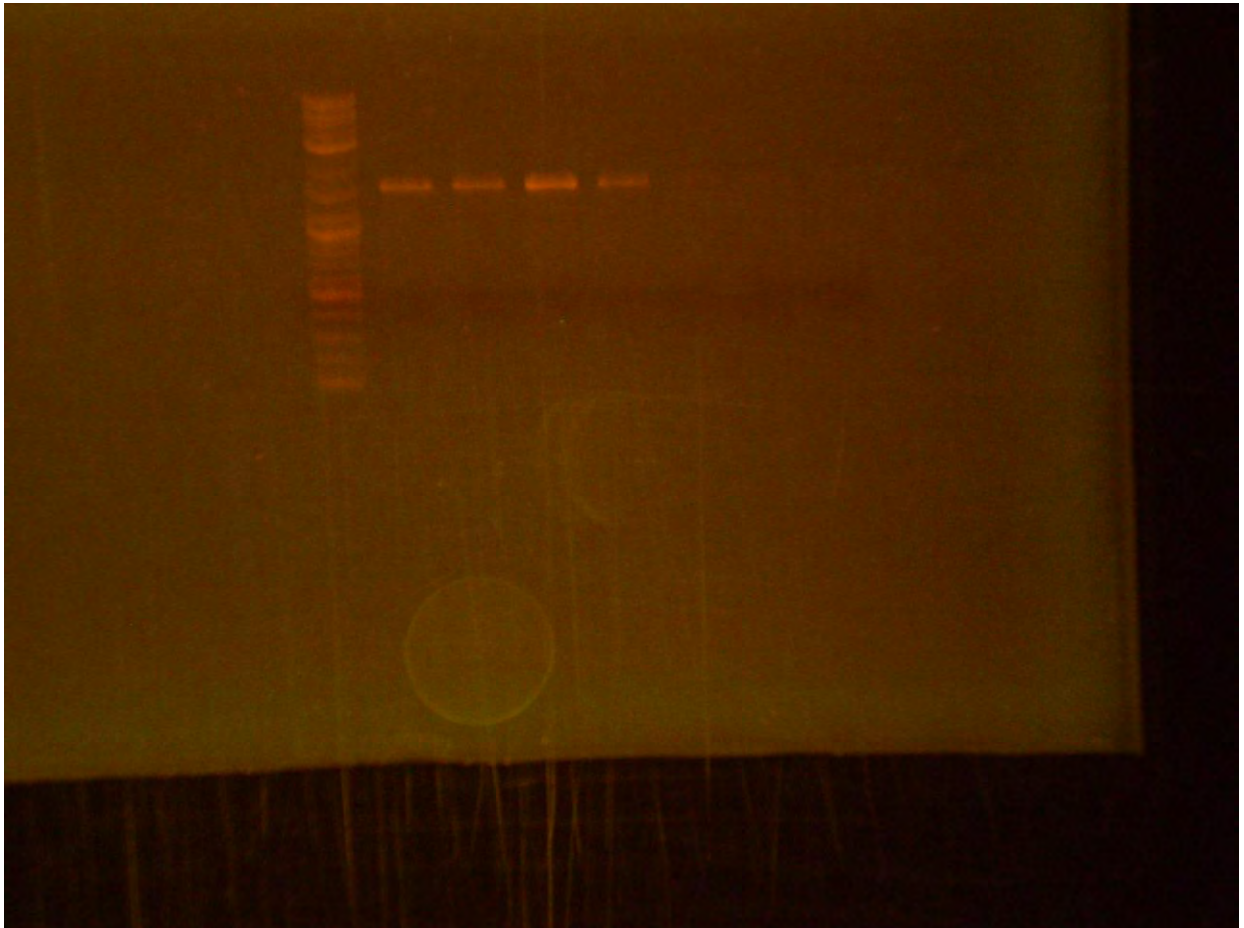
Η ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν βασίστηκε στην ενίσχυση του γενετικού τόπου 16S rRNA με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και στην αλληλούχιση αυτού για τον ακριβή προσδιορισμό της ταυτότητάς του.

Επιπλέον, προτού τα προϊόντα αναλυθούν ως προς την αλληλουχία τους, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, για να διαπιστωθεί εάν είχε ενισχυθεί το επιθυμητό τμήμα μεγέθους περίπου 1500bp. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το gel αγαρόζης παρατηρήθηκε σε λάμπα υπεριώδους φωτός και βάσει ενός μάρτυρα μοριακού βάρους που ηλεκτροφορήθηκε μαζί με τα προϊόντα PCR εξακριβώθηκε το αποτέλεσμα της αντίδρασης, η ενίσχυση δηλαδή του γενετικού τόπου 16S rRNA.

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 1) παρουσιάζονται κάποια από τα προϊόντα, τα οποία κατά την ηλεκτροφόρηση εμφανίστηκαν στο αναμενόμενο ύψος των 1500 βάσεων περίπου.



*Εικόνα 1:* Στο πηγαδάκι 1 φαίνεται ο μάρτυρας, τα πηγαδάκια 2 έως 5 ανήκουν στις αποικίες A1, A2, A3, B8 αντίστοιχα καθώς και τα πηγαδάκια 7 έως 9 ανήκουν στις αποικίες C10, D9, E4. Το κενό στο πηγαδάκι 6 οφείλεται στο ότι δεν ενισχύθηκε το 16s rRNA γονίδιο του δείγματος C9(I). Στο τελευταίο πηγαδάκι βρίσκεται το αρνητικό control.



*Εικόνα 2. Στην εικόνα 2, παρουσιάζονται συνολικά, όλα τα προϊόντα των δειγμάτων που στάλθηκαν για αλληλούχιση, μετά από καθαρισμό. Το δείγμα E4(I), στο τελευταίο πηγαδάκι μετά τον καθαρισμό ήταν τόσο αχνό που δεν ήταν ικανό για αλληλούχιση.*

### **3.6 Ταυτοποίηση βακτηρίων που απομονώθηκαν από το μέλι και εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση**

ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΜΗΚΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥ- ΧΙΑΣ	ΧΑΡΑΚΤΗ- ΡΙΣΜΟΣ	MAX IDENT
A1 (II)	872	<i>Bacillus pumilus</i>	99,00%
A2 (II)	858	<i>Bacillus safensis</i>	99,00%
A3 (II)	844	<i>Bacillus altitudinis</i>	99,00%
B8 (II)	696	<i>Bacillus pumilus</i>	100,00%
C10 (II)	578	<i>Bacillus subtilis</i>	99,00%
D9 (II)	647	<i>Bacillus pumilus</i>	99,00%

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το μέλι είναι το προϊόν που παράγουν οι μέλισσες από το νέκταρ των φυτών, το οποίο μαζεύουν και τροποποιούν για την τροφή τους σε ένα πυκνότερο υγρό, το οποίο τελικά αποθηκεύουν στις κηρήθρες τους και αποτελεί μια πολύτιμη φυσική θρεπτική τροφή. Το μέλι δεν είναι απλά μια γλυκαντική ουσία, αλλά είναι πλούσιο σε απλά σάκχαρα και ένα πλήθος άλλων στοιχείων. Ακόμη, εμφανίζει αξιοσημείωτες αντιμικροβιακές ιδιότητες.

Στην παρούσα μελέτη, έγινε απομόνωση βακτηρίων που προέρχονται από διάφορα Ελληνικά μέλια και εξετάστηκε ποια από αυτά εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση.



Πραγματοποιήθηκε έλεγχος σε 9 δείγματα μελιού (5, 10, 19, 21, 22, 25, 26, 30 και 32), από διάφορες περιοχές της Ελλάδας . Τα δείγματα αυτά, επιλέχθηκαν ανάμεσα σε 32 συνολικά δείγματα μελιών, διότι, σύμφωνα με προηγούμενη έρευνα, αυτά τα 9 δείγματα ήταν κάποια από αυτά που εμφάνισαν το μεγαλύτερο βακτηριακό φορτίο από τα υπόλοιπα 32. Ο έλεγχος αφορούσε την ύπαρξη τόσο Gram θετικών όσο και Gram αρνητικών βακτηριακών στελεχών, που απομονώθηκαν από τα θρεπτικά υποστρώματα *Bacillus cereus medium* και *Plate count agar*, στα διάφορα δείγματα μελιού. Επίσης, ελέγχθηκε ποια από αυτά τα βακτήρια εμφανίζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι των παθογόνων για τον άνθρωπο βακτηρίων *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Acinetobacter baumannii* και μετρήθηκε η διάμετρος αναστολής. Τέλος, με τη βοήθεια της PCR, πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση κάποιων από αυτά. Η ταυτοποίηση έγινε με το 16S rRNA γονίδιο.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 5 από τα δείγματα των μελιών περιέχουν βακτήρια που εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση. Συνολικά, 8 αποικίες, από τις 192 που απομονώθηκαν και ελέγχθηκαν, έδειξαν να αναστέλλουν την ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus* και καμία αποικία δεν φάνηκε να αναστέλλει την ανάπτυξη της *Pseudomonas aeruginosa* και του *Acinetobacter baumannii*. Από τους παραπάνω αριθμούς, προκύπτει ότι, περίπου το 4% του συνολικού αριθμού των βακτηριακών στελεχών που ελέγχθηκαν, εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Staphylococcus aureus*. Το εύρος των διαμέτρων αναστολής που μετρήθηκαν κυμαίνεται από 0,5 cm έως 2,3 cm. Το δείγμα B8 (II) εμφάνισε τη μεγαλύτερη ζώνη αναστολής.

Ανάλογη έρευνα πραγματοποιήθηκε και στο Cornell University της

Νέας Υόρκης, σύμφωνα με την οποία, απομονώθηκαν βακτηριακά στελέχη από διάφορα ενδημικά είδη μελιών των Ηνωμένων Πολιτειών αλλά και από 2 διαφορετικά είδη manuka honey και ελέγχθηκε η αντιμικροβιακή δράση αυτών των στελεχών έναντι κοινών ανθρωποπαθογόνων βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένου και του *S. aureus* (Lee, Churey, Worobo, 2008). Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας έδειξαν ότι στο μέλι από μαύρο βατόμουρο (blackberry), 18 αποικίες από τις 28 συνολικά που απομονώθηκαν εμφάνισαν αναστολή κατά του *S. aureus*, στο μέλι από βαμβάκι, 91 αποικίες από τις 145 εμφάνισαν αναστολή, στο μέλι από ηλίανθο, αναστολή εμφάνισαν οι 264 από τις 532, στο μέλι από ένα είδος σίκαλης αναστολή είχαν οι 369 από τις 509 ενώ, όσον αφορά τα δείγματα του manuka honey, στο ένα οι 527 αποικίες έδωσαν αναστολή από τις 561 στο σύνολο και στο άλλο έδωσαν οι 118 από τις 218. Ίδιες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν και σε άλλα δείγματα μελιών, 8 στο σύνολο. Συνολικά, από όλα τα δείγματα μελιών, απομονώθηκαν 2398 αποικίες και από αυτές, οι 1605 εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση έναντι του *S. Aureus*.

Στην παρούσα μελέτη, τα μέλια από τα οποία απομονώθηκαν αυτές οι αποικίες είναι από κουμαριά και ρεϊκι, βαμβάκι με 20% άλλων ανθέων, βελανιδιά, αγριοβότανα και θυμάρι, μέλι ανθέων: άγρια ρίγανη και άγριο τριφύλλι, ηλίανθο, θυμάρι: γυρεόκοκοι 30%, τσάι και ρίγανη. Η ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών έδειξε ότι όλα ανήκουν στο γένος *Bacillus*, και είναι ως επί το πλείστον βακτήρια του εδάφους που όμως εμφανίζουν μεγάλη αντοχή σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες (*Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus safensis*, *Bacillus altitudinis*). Σε ανάλογες μελέτες, στις οποίες μετρήθηκε το βακτηριακό φορτίο

ελληνικών μελιών, βρέθηκε ότι τα ελληνικά μέλια, περιέχουν κυρίως βακτήρια του γένους *Bacillus* αλλά και του γένους *Staphylococcus* (Παπαευαγγέλου, 2011).

Για τη συνέχιση της δουλειάς, θα πρέπει να γίνει προσπάθεια απομόνωσης και ταυτοποίησης περισσότερων βακτηρίων από το ελληνικό μέλι και να ελεγχθεί η αντιμικροβιακή τους δράση, όχι μόνο σε αυτά τα τρία παθογόνα βακτήρια-στόχους, αλλά και σε άλλα βακτήρια που προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο και εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Ακόμη, ένα σημαντικό βήμα στην πρόοδο της μελέτης, θα ήταν η ταυτοποίηση της ουσίας αυτής που εκκρίνουν τα βακτήρια και η οποία προσδίδει τις αντιμικροβιακές ιδιότητες στα βακτήρια του μελιού.

## **5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### ***ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ***

- ◆ Adams CJ, Manley-Harris M, Molan PC (2009). The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr Res* 344:1050-1053.
- ◆ Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J of Mol. Biol.* Vol 215 (3):403-410.
- ◆ Bartlett J.M., Stirling D. (2003) A short history of the Polymerase Chain Reaction 226.pp 3-6.
- ◆ Beetlestone F. (1994) Botulism spores and honey. *Am. Bee. J* 134(7): 471-473.

- ◆ Berg J.M., Tymoczko J.L. and Styer L. (2002) Biochemistry (5<sup>th</sup> ed) WH freeman.
- ◆ Berthold R. (1997) Medicinal use of honey in folk medicine. American Bee Journal 12 : 872-874.
- ◆ Bustin S.A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.
- ◆ Charles W. Bacon 1 and Dorothy M. Hinton USDA, Endophytic and Biological Control Potential of *Bacillus mojavensis* and Related Species, ARS, Russell Research Center, Toxicology & Mycotoxin Research Unit, Athens, Georgia 30613-5677, 2001
- ◆ Chinou I., Karapati C., Roussis V., Mazavuenos B.E., Chinou E., Golemati-Persidou N. (1998) Volatile constituents from 20 Greek bee-honeys and their antibacterial spectrum 46<sup>th</sup> Annual Congress, Society for Medicinal Plant Research Vienna.
- ◆ Christoph, Ralf; Schmidt, Bernd; Steinberner, Udo; Dilla, Wolfgang; Karinen, Reetta (2006). "Glycerol". *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
- ◆ Eva Crane *The Archaeology of Beekeeping*, Cornell University Press (1983) [ISBN 0-8014-1609-4](https://doi.org/10.1017/C9780801416094).
- ◆ Frank J.E. (2004) Historical notes on botulism, *Clostridium botulinum*, notulinumtoxin 19 : 22-26.
- ◆ Grogan JB, 1966 *Pseudomonas aeruginosa* carriage in patients. J Trauma, 6:639-43.
- ◆ Hepburn H.R. (1986) The nectar flow-An experimental Natural History. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Paris, London pp.199-201.
- ◆ Herold, 1970 Heilwerte aus dem Bienenvolk, Θεραπευτικές αξίες από το μελίτσι Munchen.
- ◆ Hong H.A., Khaneja R., Tam N.M., Cazzato A., Tan S., Urdaci M., Brisson A., Gasbarrini A., Barnes I., Cutting S.M., 2009. *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. Res. Microbiol.160: 134-143.
- ◆ Hyungjae Lee, John J. Churey, Randy W. Worobo, *Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey*, Department of Food Science

and Technology, New York State Agricultural Experiment Station, Cornell University, 630 W. North St., Geneva, NY 14456, USA, 2008.

◆ Japanese Government, Ministry of Health, Labour and Welfare (2009, September 30) [The Japanese Pharmacopeia 15th Edition Supplement 2](#). Ministerial Notification No. 425, p. 20

◆ Jenny M. Wilkinson and Heather M.A. Cavanagh, Antibacterial Activity of 13 Honeys Against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, *School of Biomedical Sciences, Charles Sturt University, Wagga Wagga, New South Wales, Australia*, (1) 2005, 000–000, 2005.

◆ Joirisch N.P. (1970) Curative properties of honey and bee venom. Foreign languages Publishing House. Μετάφραση στα ελληνικά Ν. Τοπαλίδης (Μελισσοκομική Ελλάς) (20) : 42-43, (231) : 84-86, (232) : 115-117, 146-148.

◆ Khan MO, Montecalvo MA, Davis I, Wormser GP, 2000 Ecthyma gangrenosum in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Cutis* 66:121-123.

◆ Krochmol C. (1999) Poison honeys. *Am. Bee. J.* 134(8) : 549-559.

◆ [Larry Gonick](#) The Cartoon History of the Universe Vol.2 (1990).

◆ Meier J, White J. (1995). *Clinical toxicology of animal venoms and poisons*. CRC Press, Inc. [ISBN 0-8493-4489-1](#).

◆ Mollan P, 1998 A brief review of the use of honey as a clinical dressing. *Australian J of Management*; 6:148-158.

◆ Nakano H. and Sakacuchi G. (1991) An unusually heavy contamination of honey products by *Clostridium botulinum* type F and *Bacillus*. *FEMS Microbiol. Lett.* (79) : 171-178.

◆ Nikaido, H. (2009). The Limitations of LB Medium. Small things considered - The Microbe Blog. ASM.

◆ Olszowy DR (1977) Of Bees Rhododendrons and Honey. *American Bee Journal* 117, 498-505.

◆ Priest FG (1993) Systematics and Ecology of *Bacillus*. In: Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R, editors. *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics*. Washington, D.C.: ASM Press.

pp. 3–16.

- ◆ Robin Dartington (2000) *New Beekeeping in a Long Deep Hive*. Bee Books New & Old.
- ◆ Roh, JY; Choi, JY; Li, MS; Jin, BR; Je, YH (2007). "[Bacillus thuringiensis as a specific, safe, and effective tool for insect pest control](#)". *Journal of microbiology and biotechnology* **17** (4): 547–59. PMID 18051264.
- ◆ [Roman Cookery by Mark Grant \(Serif, London, 2008\)](#).
- ◆ *Ronald P. Phipps Bee Culture «International Honey Market- Challenges and Opportunities», September 17, 2009.*
- ◆ Root A.I. (1983) *The ABC and XYZ of bee culture*. The A.I. Root Co., Medina, OH.
- ◆ Richlik W., Spencer W.J., Rhoads R.E.(1990) Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucl Acids Res* 18(21) : 6409-6412.
- ◆ Seeley T.D. (1985) *Honeybee ecology*. Princeton University Press, USA. Snowdon J.A. and Cliver D.O. (1995) *Microorganisms in honey*, *International Journal of food Microbiology* (31) : 1-26.
- ◆ Spilker T., Coenye T., Vandamme P. and Li Puma J.J. (2004) PCR-Based Assay for differentiation of *Pseudomonas Auruginosa* from other *Pseudomonas* Species. *J. clin. Microbial.*
- ◆ Vásquez A, Forsgren E, Fries I, Paxton RJ, Flaberg E, et al. (2012) Symbionts as Major Modulators of Insect Health: Lactic Acid Bacteria and Honeybees.
- ◆ Wadhan H. (1998) Causes of the antimicrobial activity of honey. 26(1): 26-31.
- ◆ Wells CL, Wilkins TD (1996). [Clostridia: Sporeforming Anaerobic Bacilli in: Baron's Medical Microbiology \(Baron S et al., eds.\)](#).
- ◆ White J.W. Jr, 1993 *Honey, in the hive and the honey bee*, Dadant and Sons Publication Hamilton-Illinois p. p. 869 – 895.
- ◆ *White JW Jr, Subers MH, Schepartz Al, 1963 The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. Biochim Biophys Acta, 73:57-70.*
- ◆ Wilkins A.L., Yinrong L. (1993) Extractable organic substances from New Zealand

Unifloral Mnuka (*Leptospermum Scoparium*) Honey Journal of Apicultural Research 32(1) : 3-9.

◆ Winn, *et al.*; "Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology", Sixth Edition, 2006: Lippincott, Williams, and Wilkins

◆ Zanber E., Maurizio A., 1984 Der Honig ulmer Verlag Stuttgart.

## **ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

◆ Δερματόπουλος Β., (1949) Βασικές γνώσεις σύγχρονης μελισσοκομίας. Έκδοση Μελισσοκομικού Συνεταιρισμού Θεσσαλονίκης. σελ. 40-41.

◆ Θρασυβούλου Α., (2001) Πρακτική Μελισσοκομία- Προβλήματα, αιτίες και λύσεις. Θεσσαλονίκη. σελ. 147-156, 171.

◆ Θρασυβούλου Α. και Μανίκης Ι., (1990) Κατηγορίες Ελληνικού Μελιού 4(6) : 158-163.

◆ Κατής Ι.Ν., Μαλιόγκα Ι.Β., (2000) Διαγνωστική Ιολογία, Εκδόσεις Γαρταγάνη. σελ. 25-30.

◆ Μπίκος Θ., (1991) Όλα για το μέλι. Έκδοση του ιδίου. σελ. 263-270.

◆ Νικολόπουλος Α., Τεντολούρης Ν., Κωστάκη Μ., Κατσιλάμπρος Ν., 2006 Λοιμώξεις στο διαβητικό πόδι Archives of Hellenic Medicine 23(3):222-232

◆ Παππάς Ν., (1998) Η γύρη και η συλλογή της 2(4) : 106-110.

◆ Παπαευαγγέλου Φωτεινή, Μικροβιακή ποιότητα ελληνικών τύπων μελιού: Πόσο ασφαλή είναι, Μεταπτυχιακή εργασία, Λάρισα 2011.

◆ Σταθόπουλος Κ., (1993) Υγιεινή και διατροφική αξία του μελιού. Πρακτικά εκδήλωσης της επιτροπής προώθησης του Ελληνικού μελιού. Αθήνα

◆ Τσέλλιος Δ. και Θρασυβούλου Α., (1989) Μελισσοκομικοί χειρισμοί και μελισσοκομικά φυτά 2 (7-8) : 208-220.

◆ Υφαντίδη Μ., (1983) Μελισσοκομία, επιστήμη και εφαρμογή. Εκδόσεις Τσολακοπούλου, Θεσσαλονίκη. σελ. 56-67.

◆ Χαριζάνης Π., (1996) Μέλισσα και μελισσοκομική τεχνική. Έκδοση Μελισσοκομική Επιθεώρηση, σελ. 263-267.

## **ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ**

- ◆ <http://en.wikipedia.org/wiki/Honey>
- ◆ <http://www.fresh-healthy.gr>
- ◆ <http://www.labm.com/>
- ◆ <http://www.prlog.org/>
- ◆ <http://science.howstuffworks.com/> [Tracy B. Wilson](#) (2007)
- ◆ <http://melissokomos.gr>
- ◆ <http://en.wikipedia.org/wiki/Apitoxin>
- ◆ <http://www.melissocosmos.com/>
- ◆ <https://sites.google.com/site/melisokipos/>
- ◆ <http://www.honeygreek.gr/>
- ◆ <http://www.greekhoney.gr/>
- ◆ <http://www.paseges.gr/el/>
- ◆ <http://apitherapy.blogspot.com/>
- ◆ <http://www.slu.se/en/>
- ◆ <http://www.return2health.net/>
- ◆ <http://en.wikipedia.org/wiki/Glycerol>
- ◆ <http://wiki.answers.com/>
- ◆ [http://en.wikipedia.org/wiki/Nutrient\\_agar](http://en.wikipedia.org/wiki/Nutrient_agar)



# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1. Στοιχεία μελιών που χρησιμοποιήθηκαν.

Α/Α	ΤΥΠΟΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΠΑΡΑΓΩΓΟΣ
5	ΚΟΥΜΑΡΙΑ ΚΑΙ ΡΕΙΚΙ	2010	Καλτεζές Αρκαδίας	Ρουμελιώτης Βασίλειος Αρκαδικό Μέλι
10	ΑΓΡΙΟΒΟΤΑΝΑ ΚΑΙ ΘΥΜΑΡΙ	2010	Αν. Όλυμπος	Αρβανίτης Μελίχρυσος
21	ΒΑΜΒΑΚΙ: με 20% περίπου άλλων ανθέων	2010	Σέρρες	Αγροτικός Μελισσοκομικός συναιτερισμός Νικήτης Χαλκιδικής
22	ΘΥΜΑΡΙ: γυρεόκκοκοι 30%	2010	Κρήτη	Αγροτικός Μελισσοκομικός συναιτερισμός Νικήτης Χαλκιδικής
25	ΤΣΑΙ ΚΑΙ ΡΙΓΑΝΗ	2010	Σούρπη Μαγνησίας	Σαμαράς Γιώργος Κέντρο Μελισσοκομίας Θεσσαλίας (Βόλος)
26	ΜΕΛΙ ΑΝΘΕΩΝ: ΑΓΡΙΑ ΡΙΓΑΝΗ ΚΑΙ ΑΓΡΙΟ ΤΡΙΦΥΛΛΙ	2010	Ορεινά λιβάδια και δάση του Ολύμπου	Σαμαράς Γιώργος Κέντρο Μελισσοκομίας Θεσσαλίας (Βόλος)
30	ΒΕΛΑΝΙΔΙΑ	2010	Πήλιο	Αρβανίτης Μελίχρυσος
32	ΑΓΡΙΟΒΟΤΑΝΑ, ΠΑΛΙΟΥΡΙ, ΑΚΑΚΙΑ	2012	Παναγιά Γρεβενών	Τζήκος Αθανάσιος

*Άλληλουχίες που ταυτοποιήθηκαν:*

20121231AS1P1\_2013-01-02\_A09.ab1

GCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGA  
GTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTA  
ATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTC  
ACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG  
GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG  
GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT  
GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTA  
GGGAAGAACAAGTGCAAGAGTAACTGCTTGACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAG  
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC  
GGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC  
CCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGA  
GAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTG  
GCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGC  
GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAG  
GGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA  
CGGTCGCAAGACTGAAACTCAAGGAATTGA

20121231AS2P1\_2013-01-02\_B09.ab1

GCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT  
GGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATA  
GTTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGAT  
GGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGC  
GTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC  
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAA  
CGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAAC  
AAGTGCAGAGTAAGTCTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTA  
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTG  
GGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAA  
CCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAT  
TCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG  
ACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATT  
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCG  
CCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAG  
ACTGAACTCAAAGG

20121231AS3P1\_2013-01-02\_C09.ab1

CAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGT  
AACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAAT  
ACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCAC  
TTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC  
GACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC  
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA  
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGG  
GAAGAACAAGTGCAAGAGTAACTGCTTGCGCCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC  
ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGG  
AATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC  
GGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGA  
GTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGC  
GAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGA  
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGG

GGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG

G

20121231AS4P1\_2013-01-02\_D09.ab1

TGCAGTCGAGCGAACAGAAGGGAGCTTGGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTG  
AGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCT  
AATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGT  
CACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTACCAAG  
GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG  
GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT  
GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTA  
GGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAAGTCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAA  
GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC  
CGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC  
CCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGG  
AGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGT  
GGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTG

20121231AS5P1\_2013-01-02\_E09.ab1

GCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAG  
TAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAAT  
ACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCARACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCAC  
TTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCACCAAGGC  
GACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC  
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA  
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGG  
GAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGC  
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAKGTGGCAAGCGTTGTCCG  
GAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC  
CGGCTCAACCGGGG

20121231AS6P1\_2013-01-02\_F09.ab1

AGGGAGCTTGGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCT  
GCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGA  
ACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGC  
GGCGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGA  
CCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA  
GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGT  
GAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAA  
GAGTAACTGCTTGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG  
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAA  
GGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAG  
GGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTTCCACGTG  
TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGG

