

# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

*Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος  
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας*

**« ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ - ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ &  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ »**

**ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΚΑΤΣΗ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**« ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ  
ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΜΕΛΙΟΥ »**



**ΛΑΡΙΣΑ 2014**

« Διερεύνηση της ανθεκτικότητας βακτηρίων κλινικής σημασίας  
έναντι του μελιού »

« Investigating the resistance of bacterial pathogens against honey »

### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

**Μόσιαλος Δημήτριος (επιβλέπων) :** 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 & Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Με το πέρας της εργασίας αυτής και τη συγγραφή της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι υποχρέωση μου να ευχαριστήσω τους ανθρώπους εκείνους, οι οποίοι με βοήθησαν και συνέβαλαν, με οποιονδήποτε τρόπο, στην πραγματοποίησή της.

Πρωτίστως, ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Μόσιαλο Δημήτρη, Επίκουρο καθηγητή Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας τόσο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθοδήγηση και την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής, όσο και για τις επιστημονικές γνώσεις και εμπειρίες που μου μετέδωσε καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης μου.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη, Καθηγητή Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία όπως και τον κ. Καρπούζα Δημήτριο, Επίκουρο Καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Νικολούλη Κατερίνα για την συνεργασία και την καθοδήγηση της καθώς και για την σημαντική βοήθεια που μου παρείχε, όπως και τους συναδέλφους μου και την ομάδα του εργαστηρίου κοντά στους οποίους εργάστηκα, για τη φιλική ατμόσφαιρα, ηθική συμπαράσταση και τη συνεργασία τους.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, Αντώνη και Μαρία, τα αδέρφια μου και γενικά όλους τους δικούς μου ανθρώπους, για την άνευ όρων βοήθεια και αμέριστη κατανόηση που επέδειξαν όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς αυτούς, αρωγούς και συνοδοιπόρους, δεν θα μπορούσα να πετύχω τους στόχους μου και τα όνειρα μου.

## Περίληψη

Φυσικά προϊόντα όπως το μέλι συγκεντρώνουν την προσοχή του ιατρικού κόσμου, καθώς η εμφάνιση και η εξάπλωση βακτηριακών στελεχών ανθεκτικών σε πολλά αντιβιοτικά οδηγεί σε μη αποτελεσματική θεραπεία πολλών λοιμώξεων και αυτό έχει οδηγήσει στην επανεξέταση παλαιότερων εναλλακτικών θεραπειών. Η χρήση του μελιού αποτελεί μια τέτοια θεραπεία, καθώς βοηθά στην επούλωση πληγών, εγκαυμάτων και έχει γίνει ιδιαίτερα γνωστό για την αντιμικροβιακή του δράση (Alandejani et al., 2009, Wang et al., 2012). Αναστέλλει την βακτηριακή ανάπτυξη κυρίως λόγω του υπεροξειδίου του υδρογόνου και αντιμικροβιακών πρωτεϊνών και πεπτιδίων που υπάρχουν σε αυτό και εν μέρει λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων (Kwakman et al., 2010, Molan, 1999). Επίσης, διάφορα συστατικά του μελιού, όπως αρωματικά οξέα ή φαινολικές ενώσεις και πρωτεΐνες συνεισφέρουν στην συνολική αντιμικροβιακή δραστηριότητα (Weston, 2000).

Στη συγκεκριμένη μελέτη έγινε διερεύνηση πιθανής ανθεκτικότητας κάποιων παθογόνων βακτηρίων και συγκεκριμένα ανθεκτικών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* έναντι της αντιβακτηριακής δράσης Ελληνικών μελιών συγκρινόμενα με το μέλι *Manuka*. Με τη μέθοδο προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*minimum inhibitory concentration*) έγινε διερεύνηση της ανθεκτικότητας βακτηρίων κλινικής σημασίας έναντι δειγμάτων μελιού, με βραχυπρόθεσμη έκθεση υπό σταθερές συγκεντρώσεις μελιού και με σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού για 12 συνεχείς μέρες και στις δύο περιπτώσεις. Έπειτα έγινε διερεύνηση της παροδικής ή μόνιμης φύσης της ανθεκτικότητας των κλινικών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* έναντι συγκεκριμένων μελιών μετά το τέλος της έκθεσης τους για 12 συνεχείς μέρες, χρησιμοποιώντας τα βακτήρια που εκτέθηκαν στο μέλι για ανακαλλιέργεια 10 ημερών απουσία μελιού. Οι μέθοδοι αυτοί στηρίζονται στην ικανότητα των μελιών να αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων και αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι η έκθεση των βακτηρίων στο μέλι συγκεντρώσεις στο μέλι οδήγησε σε τρεις κατηγορίες αποτελεσμάτων. Στην πρώτη κατηγορία δεν υπήρξε κάποια ένδειξη ανθεκτικότητας των βακτηρίων ως προς το μέλι από αγριοβότανα και θυμάρι (No 10), το μέλι από πορτοκάλι (No 20), το μέλι από καστανιά με λίγο πεύκο (No 23) και το μέλι *Manuka* και στα δύο βακτήρια. Στη δεύτερη κατηγορία παρατηρήθηκε μόνιμη ή παροδική ανθεκτικότητα των βακτηρίων στο μέλι ανθέων (No 14) και στο

μέλι ανθέων από άγρια ρίγανη και άγριο τριφύλλι (No 26), λόγω αυξομείωσης της τιμής MIC σε σχέση με την αρχική χωρίς κάποιος είδος έκθεσης στο μέλι και η οποία διατηρήθηκε ή χάθηκε μετά το πέρας της ανακαλλιέργειας των 10 ημερών απουσία μελιού. Τέλος στη τρίτη κατηγορία παρατηρήθηκε με αρκετό ενδιαφέρον ότι η εκτεταμένη χρήση του μελιού από ηλίανθο (No 19) και του μελιού από βελανιδιά (No 30) σε συγκεντρώσεις κάτω από τη τιμή MIC οδήγησε στην ευαισθητοποίηση της *Pseudomonas aeruginosa*, καθώς παρατηρήθηκε μείωση της τιμής MIC σε σχέση με την αρχική χωρίς κάποιος είδος έκθεσης στο μέλι. Η ευαισθητοποίηση αυτή, φαίνεται όμως να είναι παροδική καθώς η τιμή MIC, επανήλθε στα αρχικά επίπεδα μετά το τέλος της ανακαλλιέργειας των 10 ημερών απουσία μελιού.

## Abstract

Natural products like honey gather the attention of the medical world, the emergence and spread of bacterial strains that are resistant to many antibiotics leads to non-effective treatment of many infections and this has led to a review of older alternative therapies. The use of honey is such a treat, as it helps in healing wounds, burns and has become particularly known for its antimicrobial action (Alandejani et al., 2009, Wang et al., 2012). Inhibits bacterial growth mainly due to hydrogen peroxide and antimicrobial proteins and peptides that are on it and partly because of the high concentration of sugars (Kwakman et al. 2010, Molan, 1999). Also, various ingredients of honey, such as aromatic acids or phenolic compounds and proteins contribute to the total antimicrobial activity (Weston, 2000).

This particular study has investigated possible resistance of certain pathogenic bacteria and specific resistant of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* against the anti-bacterial action of Greek honeys and in particular in comparison to Manuka honey. The method for determining the minimum inhibitory concentration (inhibitory minimum concentration) has explored the bacterial resistance of clinical importance compared to samples of honey, with short-term exposure in stable concentrations of honey and gradually increasing concentrations in honey for 12 consecutive days on both occasions. Then there was investigation of transient or permanent nature of resistance of clinical *Pseudomonas aeruginosa* and strains *Staphylococcus aureus* against specific in both cases. The results of the experiments are summarized into three categories of resistance. In the first category, there was no indication of resistance of bacteria to the honey made out of herbs and thyme (No 10), honey made out of orange (No 20), honey made out of chestnut and a little pine (No 23) and Manuka honey. In the second category there was a permanent or transient resistance of the bacterium in honey flowers (No 14) and the flower honey from wild oregano and wild clover (No 26), due to price fluctuation of MIC in relation to the original without someone kind of exposure to honey and which was retained or lost after the end of reculture 10 days absence of honey.

Finally in the third category was observed with enough interest that the extensive use of honey from sunflower (No 19) and honey from oak (No 30) at concentrations below the MIC value led to awareness of *Pseudomonas aeruginosa*, as

observed price reduction MIC in relation to the original without any kind of exposure to honey. This awareness, however, seems to be transient as the MIC value, returned to initial levels after the end of reculture 10 days absence of honey.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	5
Abstract.....	7
<b>1. Εισαγωγή .....</b>	<b>11</b>
1.1. Ιστορική αναδρομή – Ορισμός .....	11
1.1.1 Συστατικά και διατροφική αξία του μελιού .....	13
1.1.2 Ευεργετικές δράσεις του μελιού .....	14
1.2. Τα είδη του μελιού .....	15
1.3 Τύποι ελληνικού μελιού .....	16
1.3.1. Πεύκο – <i>Pinus halepensis</i> (κοινό πεύκο), (μελίτωμα) .....	16
1.3.2. Έλατο – <i>Abies sp.</i> , (μελίτωμα) .....	18
1.3.3. Βελανιδιά – <i>Quercus macrolepis</i> , (μελίτωμα) .....	18
1.3.4. Καστανιά – <i>Castanea sativa</i> .....	19
1.3.5. Θυμάρι – <i>Thymus sp.</i> , (νέκταρ) .....	20
1.3.6. Μέλι άνθεων, (νέκταρ) .....	21
1.3.7. Μέλι εσπεριδοειδών, (νέκταρ) .....	21
1.3.8. Ερείκη – <i>Erica</i> (νέκταρ) .....	21
1.3.9. Κουμαριά – <i>Arbutus unedo</i> , (νέκταρ) .....	22
1.3.10. Ακακία - <i>Robinia pseudoacacia</i> , (νέκταρ) .....	23
1.3.11. Βαμβάκι – <i>Gossypium hirsutum</i> , (νέκταρ) .....	23
1.3.12 Πολύκομβος – <i>Polygonum spp.</i> , (νέκταρ) .....	24
1.3.13. Ευκάλυπτος – <i>Eucalyptus spp.</i> , (νέκταρ) .....	24
1.3.14. Σιδηρίτης ή τσάι του βουνού – <i>Sideritis spp.</i> , (νέκταρ) .....	25
1.3.15. Ηλιάνθος – <i>Helianthus annuus</i> (νέκταρ) .....	25
1.3.16 Μέλι κρόκου – <i>Crocus sativus</i> (νέκταρ) .....	26
1.3.17 Ρίγανη – <i>Origanum vulgare</i> , (νέκταρ) .....	26
1.4 Μέλι <i>Manuka</i> .....	27
1.5 Το μέλι ως αντιμικροβιακός παράγοντας .....	28
1.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	31
1.7 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	34
<b>2. Σκοπός της παρούσας μελέτης .....</b>	<b>37</b>
<b>3. Πειραματικό μέρος .....</b>	<b>38</b>
3.1 Υλικά .....	38

3.1.1 Δείγματα μελιών .....	38
3.2 Μέθοδοι .....	40
3.2.1 Υγρές καλλιέργειες των <i>Pseudomonas aeruginosa</i> και <i>Staphylococcus aureus</i> .....	40
3.2.2 Μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης .....	40
3.2.2.1 Αρχή της μεθόδου .....	40
3.2.2.2 Πειραματική διαδικασία .....	41
3.2.3 Διερεύνηση της ανθεκτικότητας βακτηρίων κλινικής σημασίας έναντι δειγμάτων μελιού, με βραχυπρόθεσμη έκθεση υπό σταθερές συγκεντρώσεις μελιού .....	43
3.2.3.1 Αρχή της μεθόδου .....	43
3.2.3.2 Πειραματική διαδικασία .....	43
3.2.4 Διερεύνηση της ανθεκτικότητας βακτηρίων κλινικής σημασίας έναντι δειγμάτων μελιού, με βραχυπρόθεσμη έκθεση σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού .....	45
3.2.4.1 Αρχή της μεθόδου .....	45
3.2.4.2 Πειραματική διαδικασία .....	45
<b>4. Αποτελέσματα</b> .....	47
4.1 Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης ( <i>minimum inhibitory concentration</i> ) .....	47
4.2 Προσδιορισμός της ανθεκτικότητας βακτηρίων κλινικής σημασίας έναντι δειγμάτων μελιού, με βραχυπρόθεσμη έκθεση υπό σταθερές συγκεντρώσεις μελιού .....	48
4.3 Προσδιορισμός της ανθεκτικότητας βακτηρίων κλινικής σημασίας έναντι δειγμάτων μελιού, με βραχυπρόθεσμη έκθεση σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού .....	50
<b>5. Συζήτηση</b> .....	53
<b>6. Βιβλιογραφία</b> .....	56

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Ιστορική αναδρομή - Ορισμός

Η ιστορία του μελιού ξεκινά από τους αρχαίους χρόνους, οπότε και κατείχε ξεχωριστή θέση. Αντιμετωπιζόταν ως φυσικό και υγιεινό προϊόν, απαραίτητο στοιχείο της διατροφής και όχι συμπλήρωμα. Από αποσπασματικές πληροφορίες για τη σύνθεση των γευμάτων των αρχαίων Ελλήνων βλέπουμε ότι το μέλι περιλαμβάνεται στο καθημερινό διαιτολόγιο τους είτε μόνο του, είτε ως υλικό παρασκευής σε σάλτσες και άλλα edésματα (Larson, 2001).

Σύμφωνα με τον ορισμό του Διεθνούς Οργανισμού Γεωργίας και Τροφίμων ( F.A.O.) « μέλι είναι το γλυκό προϊόν το οποίο παράγουν οι μέλισσες ( του γένους *Apis*), αφού συλλέξουν, μετατρέψουν και αποθηκεύσουν στις κηρήθρες τους το νέκταρ και άλλους φυτικούς χυμούς από διάφορα ζωντανά μέρη του φυτού».



**Εικόνα 1.** Μέλι (<http://biohoneyquality.wordpress.com/>)

Η πρώτη ύλη λοιπόν 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 όπου και σχηματίζεται το μελίτωμα, το οποίο χρησιμοποιούν για τις ανάγκες τους. Αυτό που περισσεύει βγαίνει με τη 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. Η διαδικασία της μετατροπής του νέκταρος σε μέλι αρχίζει μέσα στον *πρόλοβο* της μέλισσας, 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*, τροφή πλούσια σε βιταμίνες και πρωτεΐνες για την εκτροφή του γόνου και της βασίλισσας. Στις μεγαλύτερης ηλικίας εργάτριες συρρικνώνονται και παράγουν το *ένζυμο οξειδάση* της γλυκόζης, που μετατρέπει τη γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ (Θρασυβούλου, 2001).

Η κυρίαρχη χημική μετατροπή (μεταβολισμός) του φυτικού χυμού, όταν αυτός γίνεται μέλι είναι η αποδόμηση του δισακχαρίτη *σουκρόζη* (της κοινής ζάχαρης) στα άμεσα αφομοιώσιμα μονοσάκχαρα της γλυκόζης και φρουκτόζης. Η ανασύνθεση δισακχαριτών και τρισακχαριτών είναι ποσοτικά πολύ περιορισμένη. Οι αρωματικές (διάφορα *τερπένια*) και οι χρωστικές ουσίες του φυτικού χυμού δε μεταβολίζονται. Το μέλι απλά εμπλουτίζεται με ένζυμα από τους αδένες της εργάτριας μέλισσας, τα οποία μεταβολίζουν τα σάκχαρα. Τέλος, τα διάφορα μεταλλικά στοιχεία του μελιού είναι ακριβώς τα ίδια με αυτά τα οποία περιέχονται και στον πρωτογενή φυτικό χυμό (Zanber & Maurizio 1984, White 1993).

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 των κοινωνικών μελισσών ως ειδών εντόμων να μετατρέπουν το ευαίσθητο σε ζυμώσεις (αλλοιώσεις) νέκταρ και αντίστοιχα μελίτωμα στο εξαιρετικά συντηρήσιμο μέλι αποτελεί για αυτές έναν από τους βασικούς μηχανισμούς προσαρμογής τους στη φύση, ο οποίος διασφαλίζει την επιβίωση τους (Υφαντίδης, 2005).

Τέλος, η σύνθεση του μελιού εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως:

- Τα είδη των φυτών από όπου συλλέγουν το νέκταρ και το μελίτωμα
- Τη φύση του εδάφους
- Το είδος των μελισσών
- Τη φυσική κατάσταση του μελισσιού (Υφαντίδης, 1983).

### 1.1.1 Συστατικά και διατροφική αξία του μελιού

Το μέλι είναι το προϊόν που παράγουν οι μέλισσες από το νέκταρ ή τα διάφορα μελιτώματα φυτών και αποτελεί μια πολύτιμη φυσική θρεπτική τροφή, αναπόσπαστο στοιχείο της μεσογειακής διαίτας. Αποτελείται κυρίως από απλά σάκχαρα αλλά και από πλήθος άλλων στοιχείων. Ανιχνεύτηκαν και πιστοποιήθηκαν 182 διαφορετικές ουσίες (Winston,1987). Το προϊόν αυτό αποτελείται 70-80% από *σάκχαρα*, κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη και έχει μεγάλη θρεπτική αξία, και απορροφάται άμεσα από τον ανθρώπινο οργανισμό (1 κουταλιά της σούπας μέλι αποδίδει στον οργανισμό 64 Kcal). Περιέχει *νερό* σε ποσοστό 16% , *οργανικά οξέα* (18), *πρωτεΐνες* και *αμινοξέα*, *μεταλλικά στοιχεία* σε μικρές ποσότητες (κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο, σίδηρος κ.ά.), *ένζυμα* (τα οποία σχεδόν στο σύνολο τους από τους αδένες των μελισσών και είναι αυτά που μετατρέπουν το νέκταρ και το μελίτωμα των φυτών σε μέλι (Σταθόπουλος, 1993)), *συμπλέγματα πρωτεϊνών*, *βιταμίνες* (B2, B6, C, D, E, παντοθενικό οξύ, φολικό οξύ κ.ά.), *φυσικές αρωματικές ουσίες* κ.ά.. Επιπλέον, το μέλι έχει υψηλή ενεργειακή και θρεπτική αξία. Τα ανόργανα στοιχεία του μελιού συμμετέχουν σε διάφορα ενζυμικά συστήματα και παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό. Αυτό που προκαλεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι η συνύπαρξη όλων των θρεπτικών στοιχείων και ο τρόπος με τον οποίο δρουν στον ανθρώπινο οργανισμό.



**Εικόνα 2.** Μέλι (<http://melissomania.blogspot.gr/>)

Το μέλι αποτελεί ένα φυσικό γλυκαντικό με μεγάλη γλυκαντική δύναμη χάρη στη φρουκτόζη και μετατρέπεται αμέσως σε ενέργεια λόγω της γλυκόζης (σε 15 λεπτά περνά στο αίμα). Δυναμώνει και τονώνει τον οργανισμό σε περίπτωση κόπωσης σωματικής ή πνευματικής, ανάπτυξης και ανάρρωσης γιατί εμπλουτίζει άμεσα το αίμα με γλυκόζη και έτσι αποτελεί ένα φυσικό τονωτικό του οργανισμού. Είναι μια πλούσια και που δίνει άμεση ενέργεια σε τροφή για παιδιά, εγκύους, αθλητές, άτομα που βρίσκονται σε ανάρρωση καθώς και για ανθρώπους που ασκούν υψηλή σωματική ή πνευματική εργασία (National Honey Board, 2010).

Επιπροσθέτως, αποδείχθηκε ως ένα πολύ ωφέλιμο προϊόν για τη δίαιτα του παιδικού οργανισμού. Σε έρευνες διαπιστώθηκε ότι η διατροφή με μέλι αύξησε την αιμοσφαιρίνη του αίματος των παιδιών και αύξησε το βάρος τους χωρίς να παρατηρηθεί παράλληλα αύξηση του σακχάρου στο αίμα ή της οξύτητας στο ουρικό οξύ. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι φάρμακα σε συνδυασμό με μέλι είχαν καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα. Τα υπάρχοντα στοιχεία στο μέλι όπως κάλιο, φώσφορος, φολικό οξύ και παντοθενικό οξύ βοηθούν στην ανάπτυξη του οργανισμού. Η πληθώρα των ιχνοστοιχείων του μελιού πιθανώς συμπληρώνει ελλείψεις της διαίτας σε άτομα που δεν τρέφονται καλά καθώς και σε ηλικιωμένα άτομα (εκατό γραμμάρια μέλι παρέχουν στον άνθρωπο 315θερμιδες) . Τέλος πολλοί αποδίδουν τη μακροζωία τους στη συστηματική διατροφή τους με μέλι (Μπίκος, 1991).

### **1.1.2 Ευεργετικές δράσεις του μελιού**

Το μέλι έχει ευεργετικές δράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό (Herold, 1970) και κάποιες από αυτές είναι:

- Το μέλι ως δυναμωτικό
- Επιδράσεις στην καρδιά
- Επιδράσεις στο ήπαρ
- Επιδράσεις στο πεπτικό σύστημα
- Επούλωση τραυμάτων
- Αντιφλεγμονώδης δράση
- Αντιοξειδωτική δράση
- Υποβοήθηση του ανοσοποιητικού συστήματος

## 1.2 Τα είδη του μελιού

Ταξινομούμε 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. Η χημική σύνθεση του μελιού ποικίλλει από είδος σε είδος.

- *Μέλια ανθέων*: πορτοκαλιάς, θυμαριού, ευκάλυπτου, δεντρολίβανου, 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 τα αντίστοιχα φυτά ( Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990).

Οι εδαφοκλιματικές συνθήκες της Ελλάδας ευνοούν την ανάπτυξη του εντόμου *Marchalina hellenica* (κοινώς εργάτης ή βαμβακάδα) το οποίο παρασιτεί στα πεύκα και εκκρίνει μελίτωμα. Οι μελιτώδεις εκκρίσεις συλλέγονται από τις μέλισσες, μεταποιούνται και αποθηκεύονται ως μέλι. Η μεγαλύτερη παραγωγή μελιού στην Ελλάδα (60-65%) προέρχεται από τις μελιτώδεις εκκρίσεις του «εργάτη» και το μέλι που παράγεται είναι γνωστό ως πευκόμελο. Η παραγωγή των μελιτωμάτων επηρεάζεται από το μέγεθος (ή ηλικία) του εντόμου, τη ζωτικότητα του δέντρου, τις κλιματολογικές συνθήκες και το είδος του πεύκου στο οποίο παρασιτεί το έντομο (Καϊλίδης, 1965). Στην περίοδο των αλλαγών του δέρματος (εκδύσεων) καθώς και όταν ενηλικιωθεί, το έντομο δεν τρέφεται και δεν παράγει μελίτωμα. Οι μέτριες θερμοκρασίες με δροσερό καιρό ευνοούν την κυκλοφορία των χυμών του πεύκου και την άφθονη παραγωγή μελιτοεκκρίσεων σε αντίθεση με τις υψηλές θερμοκρασίες και τη μεγάλη ξηρασία.

Ο εργάτης αποβάλλει περισσότερες μελιτοεκκρίσεις όταν παρασιτεί στην τραχεία (*Pinus brutia* Ten.) παρά στη χαλέπιο (*Pinus halepensis* Miller) (Τυπάλδος-Ευδιάς, 1979).

Θεωρητικά, οι μέλισσες παράγουν τόσα μέλια όσα είναι και τα φυτά που δίνουν νέκταρ και μελίτωμα. Πρακτικά 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 σε μια περιοχή δεν υπάρχει μια επικρατούσα ανθοφορία, το μέλι που θα παραχθεί θα είναι μέλι ποικίλης ανθοφορίας

ενώ όταν υπάρχει μια επικρατούσα ανθοφορία τότε το μέλι θα πάρει τα χαρακτηριστικά της (γεύση, άρωμα, χρώμα) και θα ονομαστεί ανάλογα π.χ. μέλι θυμαριού (Θρασυβούλου, 2001). Το χρώμα του μελιού ποικίλλει από σχεδόν άχρωμο έως καφέ σκούρο. Ως προς τη σύσταση, μπορεί να είναι ρευστό, παχύρρευστο ή μη, μερικώς ή ολικώς κρυσταλλωμένο.

Η κρυστάλλωση του μελιού είναι πολύπλοκο φαινόμενο. Αρχικά οφείλεται στη διαφορετική σχέση φρουκτόζης και γλυκόζης αλλά η θέρμανση σε χαμηλές θερμοκρασίες επαναφέρει το μέλι σε ρευστή του κατάσταση και έτσι εικάζεται ότι μπορεί να προκαλείται και από ένζυμα. Όταν όμως το μέλι διατηρείται για κάποιο χρονικό διάστημα τότε η κρυστάλλωση επανεμφανίζεται. Το κρυσταλλωμένο μέλι δεν έχει χάσει τίποτα από την θρεπτική αξία και πρέπει να καταναλώνεται όπως είναι διότι η θέρμανση του για να λιώσει και να αποκτήσει την αρχική του ωραία φυσική κατάσταση οπωσδήποτε μετουσιώνει ορισμένα από τα θρεπτικά του συστατικά (Ζερφυρίδης, 1998).

### 1.3 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 των μελιών των κωνοφόρων δέντρων. Το ανθόμελο είναι ανοιχτόχρωμο, λεπτόρρευστο και αρωματικό και με την πάροδο του χρόνου σε χαμηλές θερμοκρασίες γίνεται παχύρρευστο, κρυσταλλώνει και με τον καιρό στερεοποιείται. Ακόμη, περιέχει μεγαλύτερο ποσοστό γλυκόζης και φρουκτόζης (μεγαλύτερο του 65%) και μπορεί να περιέχει υπολείμματα γύρης. Από την άλλη, το πευκόμελο είναι σκουρόχρωμο, παχύρρευστο και κρυσταλλώνεται λιγότερο. Έχει μικρότερο ποσοστό σακχάρων (38%) αλλά είναι πλούσιο σε μεταλλικά άλατα (Υφαντίδης, 1983).

Κάθε κατηγορία έχει τις δικές της ιδιομορφίες που την κάνει να ξεχωρίζει από όλες τις άλλες:

#### 1.3.1 *Πεύκο* – *Pinus halepensis* (κοινό πεύκο), (παραγωγή μελιού από μελίτωμα)

Το 65% περίπου της συνολικής παραγωγής μελιού στην Ελλάδα προέρχεται από το πεύκο. Θεωρείται ως το σημαντικότερο μελισσοκομικό φυτό της χώρας. Πευκοδάση εμβολιασμένα από τον «εργάτη» και με μεγάλη παραγωγή μελιτωμάτων



βρίσκονται σε αρκετές περιοχές της χώρας και κυρίως στην Εύβοια, Σκόπελο, Σκιάθο, Θάσο, Ζάκυνθο, Ρέθυμνο, Ρόδο, Χαλκιδική και αλλού. Λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης σακχάρων που περιέχει δεν είναι ιδιαίτερα γλυκό στη γεύση. Το χρώμα του είναι πιο σκούρο από το θυμαρίσιο. Εκείνο μάλιστα που παράγεται την άνοιξη, είναι πιο ανοιχτόχρωμο και πιο διαυγές από εκείνο που παράγεται το φθινόπωρο. Είναι πλουσιότερο από το ανθόμελο σε ιχνοστοιχεία, σε πρωτεΐνες και αμινοξέα και έχει τις λιγότερες θερμίδες. Το πευκόμελο σακχαρώνει σχετικά αργά αφού η φυσική περιεκτικότητά του σε γλυκόζη είναι χαμηλή. Συγκεκριμένα, τα αμιγή πευκόμελα παραμένουν ρευστά (δηλαδή χωρίς να κρυσταλλώσουν) για περισσότερο από ενάμιση χρόνο. Επιπλέον, θεωρείται μέλι υψηλής θρεπτικής αξίας και αυτό κυρίως οφείλεται στο μεγάλο αριθμό διαφορετικών ουσιών που υπάρχουν στη σύστασή του. Από τις ουσίες αυτές επικρατούν τα μέταλλα και τα ιχνοστοιχεία (ασβέστιο, μαγνήσιο, σίδηρος, χαλκός), τα οποία βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα ελληνικά πευκόμελα (Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990).



**Εικόνα 3.** Πεύκο (<http://igiortitoudentrou.blogspot.gr>)

Το πευκόμελο το οποίο μελετήθηκε στην παρούσα έρευνα παράγεται στη Θάσο όπου το κυρίαρχο είδος πεύκου είναι το Θασίτικο ή αλλιώς Τραχεία πεύκη (*Pinus brutia*) και βρίσκεται στις χαμηλότερες περιοχές του νησιού. Ένα άλλο είδος πεύκου που υπάρχει στο νησί είναι το Μαυρόπευκο (*Pinus nigra*) και συναντάται στις υψηλότερες περιοχές μέχρι την κορυφή του.

### 1.3.2 Έλατο – *Abies sp.*, (παραγωγή μελιού από μελίτωμα)

Μία από τις καλύτερες και ακριβότερες κατηγορίες μελιού. Δίνει μέλι εξαιρετικής ποιότητας από μελιτοεκκρίσεις εντόμων τον Ιούνιο. Είναι ιδιαίτερα πυκνόρρευστο. Υπολογίζεται ότι το 5-10% περίπου του μελιού που παράγεται στην Ελλάδα είναι από έλατα. Το συγκεκριμένο είδος διακρίνεται για την ιδιαίτερα καλή του γεύση, δεν παρουσιάζει έντονο άρωμα και λόγω του χαμηλού ποσοστού γλυκόζης, δεν κρυσταλλώνει. Είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία (κάλιο, μαγνήσιο, σίδηρος κλπ.) και περιέχει βιταμίνες σε πολύ μικρές ποσότητες, αλλά ακόμα και αυτή η μικρή ποσότητα βοηθάει στην καλύτερη αφομοίωση των σακχάρων από τον ανθρώπινο οργανισμό (Μπίκος, 1991).

Το ελληνικό έλατο, γνωστό ως ελάτη η Κεφαλληνική (*Abies cephalonica*), συναντιέται μόνο στην Ελλάδα και συγκεκριμένα στην Ευρυτανία, τον Ταΰγετο, το Περούλι, την Πάρνηθα και άλλες περιοχές. Το μέλι που παράγεται είναι δυο ειδών. Το ένα, γνωστό ως *βανίλια*, είναι εξαιρετικά πυκνόρρευστο, δεν κρυσταλλώνει, παρουσιάζει αναλαμπές χρωμάτων και έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα. Παράγεται στο Μαίναλο ή στον Πάρνωνα της Πελοποννήσου και ιδιαίτερα αυτό του Μαινάλου είναι το μοναδικό ελληνικό μέλι που έχει χαρακτηριστεί στην Ευρωπαϊκή Ένωση ως Π.Ο.Π.. Το δεύτερο είδος μοιάζει με το συνηθισμένο μέλι που παράγεται από την ευρωπαϊκή ελάτη (*Abies alba*), γνωστό ως *δασόμελο*.

Στα διάφορα είδη ελάτης έχουν αναφερθεί ορισμένα παράσιτα όπως τα κοκκοειδή *Physokermes hemictyphus*, *Eulecanium* και οι αφίδες *Mindarus abietinus*, *Cinara confinis*, *C. pectinatae* τα οποία παράγουν μελιτώδεις εκκρίσεις εκμεταλλεύσιμες από τις μέλισσες.

### 1.3.3 Βελανιδιά – *Quercus macrolepis*, (παραγωγή μελιού από μελίτωμα)

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

#### 1.3.4 Καστανιά – *Castanea sativa*

Το μέλι καστανιάς παράγεται από το νέκταρ και τις μελιτώδεις εκκρίσεις της καστανιάς που είναι ένα αξιόλογο μελισσοκομικό δέντρο. Οι μελιτώδεις εκκρίσεις παράγονται από την αφίδα *Myzocallis castanicola*, που συναντάται στην κάτω επιφάνεια των φύλλων αλλά και πάνω στα εχινόμορφα κύπελλα που περιβάλλουν τους καρπούς. Οι εκκρίσεις αυτές αρχίζουν το Μάιο και συνεχίζονται μέχρι τον Ιούλιο (Σάντας, 1983).

Είναι αρκετά διαδεδομένο στα ορεινά μέρη της Ελλάδας και κυρίως παράγεται στη χερσόνησο του Αγίου Όρους. Η γεύση του είναι αρκετά δυνατή και ελαφρώς πικρή και σε προσμίξεις με άλλα μέλια υπερκαλύπτει τη γεύση των άλλων μελιών. Έχει έντονο άρωμα και το χρώμα του ποικίλλει ανάλογα με την προέλευση του, από ανοιχτό καφετί μέχρι σκούρο. Κρυσταλλώνει πολύ αργά, είναι ανθεκτικό στη θέρμανση και είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία (κάλιο, μαγνήσιο, μαγγάνιο, βάριο). Θεωρείται ότι ευνοεί την κυκλοφορία του αίματος (Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990).



Εικόνα 4. Καστανιά ([www.protypafytoria.gr](http://www.protypafytoria.gr))

Όλα τα μέλια καστανιάς χαρακτηρίζονται από υψηλό pH, υψηλή συγκέντρωση τέφρας, χαμηλά ανάγοντα σάκχαρα τα οποία είναι αριστερόμορφα και για αυτό κυρίως το λόγο το μέλι καστανιάς παρόλο που έχει χαρακτηριστικά μελιτώματος, κατατάσσεται στα ανθόμελα. Έτσι θεωρείται απαραίτητη η αναγραφή στην ετικέτα της συσκευασίας η βοτανική προέλευση του μελιού είτε αυτό διατίθεται αμιγές είτε σε ανάμιξη.

Εφαρμόστηκε το τεστ *Bonrehi & Gomez* (1988) από τους Θρασυβούλου και Μανίκη (1993) και βρέθηκε ότι το είδος της καστανιάς προτιμήθηκε και κατατάχθηκε στην τρίτη (3<sup>η</sup>) θέση στην Ελλάδα, με πρώτο της ελάτης, δεύτερο του πεύκου και

ακολουθούν της καστανιάς, του θυμαριού, της πορτοκαλιάς, του ηλίανθου, της ερείκης και του βαμβακιού.

### 1.3.5 **Θυμάρι** – *Thymus sp.*, (παραγωγή μελιού από νέκταρ).

Το θυμαρίσιο μέλι παράγεται κυρίως στα νησιά και σε όλη την ηπειρωτική Ελλάδα και όπου φυτρώνουν τα διάφορα είδη θυμαριού. Στη Μεσόγειο υπάρχουν 120 είδη θυμαριού, τα 12 εκ των οποίων ζουν στην Ελλάδα. Η παραγωγή του ανέρχεται περίπου στο 10% της συνολικής παραγωγής μελιού της Ελλάδας (Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990).



**Εικόνα 5.** Θυμάρι ([www.bioathens.com](http://www.bioathens.com))

Το μέλι που παράγεται στην Ελλάδα προέρχεται κυρίως από τα είδη *Corynodothymus capitatus*, *Thymus serpyllum* και *Satureja sp.*. Φρύγανο πολύκλαδο, πυκνό, αρωματικό, μικρό, με άνθη σε πυκνές κεφαλόμορφες ταξιαρχίες. Κοινό σε ημιορεινή ζώνη και σε πετρώδεις θέσεις. Η άνθηση του φυτού γίνεται κυρίως Μάιο με Ιούνιο.

Το μέλι αυτό χαρακτηρίζεται ως ένα μέλι αρίστης ποιότητας λόγω του εξαιρετικού του αρώματος και της ευχάριστης γεύσης του. Η χαρακτηριστική του όμως αυτή γεύση 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 & Μανίκης, 1990).

### 1.3.6 *Μέλι ανθέων*, (παραγωγή μελιού από νέκταρ)

Μέλι που παράγεται την άνοιξη με την ανθοφορία της ελληνικής φύσης. Είναι ανάμεικτο και οι ιδιότητες του διαφέρουν ανάλογα με το νέκταρ των ελληνικών φυτών που προσκομίζουν στην κυψέλη οι μέλισσες. Παράγεται σε μεγάλες ποσότητες και είναι μέλι που μπορεί να παράγει ακόμη και ένας άπειρος μελισσοκόμος. Θεωρείται ως ένα κλασσικό ελληνικό μέλι που μαζί με το πευκόμελο υπερβαίνουν το 80% του ποσοστού της συνολικής ελληνικής παραγωγής. Δυστυχώς, το μέλι ανθέων δεν έχει διακριτά στοιχεία ενώ πολλοί μελισσοκόμοι και τυποποιητές το αναμειγνύουν με διάφορα μέλια τα οποία είναι ταυτοποιημένα (π.χ. βαμβακιού) χωρίς να το αναφέρουν στην συσκευασία. Το χρώμα του συνήθως είναι ανοιχτόχρωμο και η κρυστάλλωση του αν και είναι δύσκολο να προβλεφθεί, γίνεται συνήθως 4-6 μήνες μετά τη συλλογή του.

### 1.3.7 *Μέλι εσπεριδοειδών*, (παραγωγή μελιού από νέκταρ)

Τα εσπεριδοειδή (πορτοκαλιά, λεμονιά) αποτελούν μια σημαντική πηγή νέκταρος για την παραγωγή μελιού. Η πορτοκαλιά (*Citrus aurantium*) είναι ο κύριος αντιπρόσωπος των εσπεριδοειδών και αποτελεί μια σημαντική πηγή νέκταρος για την παραγωγή μελιού. Παράγεται κυρίως στην Κρήτη, στον Πόρο, στην Πελοπόννησο και στην Ήπειρο, Έχει ντελικάτη και ελαφρώς όξινη γεύση, αναδίδει το άρωμα του πορτοκαλιού και το χρώμα του είναι ανοιχτό κίτρινο, κεχριμπαρένιο. Σαν μέλι είναι αραιό, κρυσταλλώνει πολύ γρήγορα (μέσα σε 1-2 μήνες) και δεν αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες (Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990).

Όλα τα μέλια εσπεριδοειδών χαρακτηρίζονται από χαμηλή συγκέντρωση προλίνης, χαμηλή διασάση (ένζυμο που διασπά το άμυλο και χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό της νοθείας του μελιού) και από υψηλή συγκέντρωση ασβεστίου 2-7,2 mg/kg και γενικά πλούσια σε μεταλλικά στοιχεία (Δημητριάδης, 2005).

### 1.3.8 *Ερείκη* – *Erica* (παραγωγή μελιού από νέκταρ)

Στην Ελλάδα επικρατούν κυρίως τα είδη ερείκης: *Erica arborea*, *Erica multipolyflora*, *Erica herbacea*.

Υπάρχουν δύο τύποι ερεικόμελου: το μέλι *φθινοπωρινής ερείκης* (*Erica multipolyflora*) γνωστό και ως σουσούρα και το μέλι *ανοιζιάτικης ερείκης* (*Erica arborea* L.). Θεωρείται ως μία από τις σημαντικότερες ποικιλίες μελιού στην Ελλάδα

και παράγεται σχεδόν σε όλη τη χώρα. Το φθινοπωρινό ερεικόμελο είναι αρκετά γευστικό, με δυνατή γεύση. Έχει χαρακτηριστικό, λεπτό άρωμα, το χρώμα του είναι κοκκινωπό και κρυσταλλώνει πολύ γρήγορα (1-3 μήνες). Το μέλι αυτό ξινίζει πιο εύκολα από άλλα είδη μελιού εξαιτίας της υψηλής υγρασίας του και της μεγάλης περιεκτικότητας του σε σακχαρομύκητες. Όμως, θεωρείται ως ένα πολύ θρεπτικό είδος μελιού, ιδιαίτερα τονωτικό για τον ανθρώπινο οργανισμό, για αυτό και πωλείται κυρίως σε καταστήματα υγιεινής διατροφής. Το ανοιξιάτικο μέλι, συγκριτικά με το φθινοπωρινό, είναι πιο ανοιχτόχρωμο και έχει διαφορετική γεύση. Χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης (Seeley, 1985). Χαρακτηριστικό είναι ότι σε in vitro μέθοδο που πραγματοποιήθηκε σε βιολογικό μέλι από *Erica sp.* Προέκυψε αντιμυκητιασική δράση (Feas X, Estevinho ML., 2011).

### 1.3.9 Κουμαριά – *Arbutus unedo*, (παραγωγή μελιού από νέκταρ)

Η κουμαριά είναι ένας θάμνος που βρίσκεται σχεδόν σε όλη τη χώρα. Η ανθοφορία του θάμνου παρατηρείται από τον Οκτώβριο μέχρι τις αρχές του Δεκέμβρη. Στο δέντρο της κουμαριάς έχει απομονωθεί η κουμαρίνη, η οποία είναι το πιο διαδεδομένο αντιπηκτικό.



Εικόνα 6. Κουμαριά (<http://epikuros-epikuros.blogspot.gr>)

Το μέλι κουμαριάς έχει υψηλά ποσοστά υγρασίας και μεγάλη περιεκτικότητα σε ζύμες, για αυτό το λόγο πολλές φορές ξινίζει εύκολα. Έχει έντονο άρωμα αλλά πικρή γεύση και το χρώμα του είναι πολύ σκούρο, σχεδόν μαύρο. Μερικές από τις ιδιότητες του είναι να καθαρίζει το αίμα και να ρυθμίζει τα επίπεδα της χοληστερόλης εξαιτίας της ουσίας αρβουτίνη που περιέχει. Επιπλέον, τονώνει το ανοσοποιητικό σύστημα, χαρίζει μακροζωία και θεωρείται μέλι που ενδείκνυται για τους



διαβητικούς. Περιέχει και φυσικές αντιβιοτικές ουσίες σε μεγαλύτερο ποσοστό από τα υπόλοιπα μέλια με αποτέλεσμα να αποτελεί ασπίδα για τον οργανισμό από διάφορες ασθένειες. Το μέλι αυτό επίσης περιέχει τον πολυσακχαρίτη τυρανόζη, ο οποίος όπως αποδείχθηκε πειραματικά αυξάνει τη ζωή των κυττάρων και το ένζυμο διαστάση ή αμυλάση, το οποίο διασπά το άμυλο. Στην Ελλάδα παράγεται σχεδόν κάθε χρόνο στην Πελοπόννησο, στη Χαλκιδική και σε άλλα μέρη (Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990).

#### 1.3.10 **Ακακία** – *Robinia pseudoacacia*, (παραγωγή μελιού από νέκταρ)

Η ακακία είναι ένα πολύ διαδεδομένο δέντρο, αυτοφυές σε χέρσα εδάφη και σε ρεματιές, αλλά και καλλωπιστικό. Το μέλι ακακίας είναι ιδιαίτερα γνωστό στην Κεντρική Ευρώπη λόγω των μεγάλων εκτάσεων ακακίας που έχουν εκεί. Στην Ελλάδα η παραγωγή του μελιού αυτού είναι πιο σταθερή λόγω των διαφορετικών ποικιλιών ακακίας που υπάρχουν. Το χρώμα του είναι ανοιχτόχρωμο και θεωρείται ως ένα μέλι ιδιαίτερα διαυγές το οποίο δύσκολα κρυσταλλώνεται.

#### 1.3.11 **Βαμβάκι** – *Gossypium hirsutum*, (παραγωγή μελιού από νέκταρ)

Το είδος αυτό καλλιεργείται στην Ελλάδα και παρά το γεγονός ότι είναι πολυετές, στη χώρα μας καλλιεργείται ως ετήσιο. Οι μελισσοπαραγωγοί αποφεύγουν τις βαμβακοφυτείες γιατί στη βαμβακοκαλλιέργεια πραγματοποιούνται πολλοί ψεκασμοί, οι οποίοι είναι ιδιαίτερα επώδυνοι για τη μέλισσα καθώς επίσης του γεγονότος ότι το τελευταίο χρονικό διάστημα έχουν εισαχθεί υβρίδια με περιορισμένη νεκταροέκκριση.



Εικόνα 7. Βαμβάκι (<http://grypasbees.blogspot.gr>)

Η έκκριση νέκταρος από το άνθος του βαμβακιού ξεκινά μερικές ώρες μέχρι και ημέρες πριν ανοίξει το άνθος και ολοκληρώνεται όταν τα πέταλα αλλάξουν χρώμα και από άσπρα γίνουν ροδοκόκκινα. Το νέκταρ από τα άνθη του βαμβακιού είναι πλούσιο σε σάκχαρα (70%) αλλά δεν προσελκύει ιδιαίτερα τις μέλισσες, λόγω των χαμηλών ποσοστών σουκρόζης που περιέχει. Αντίθετα, οι μέλισσες προσελκύνονται περισσότερο από το νέκταρ που εκκρίνεται από εξωανθικά νεκτάρια που βρίσκονται στην εξωτερική πλευρά των βράκτιων φύλλων καθώς επίσης στη βάση και τους νεύρωνες των φύλλων. Το νέκταρ που παράγεται από τους αδένες αυτούς, είναι πλούσιο σε σάκχαρα και γίνεται ακόμη πιο πλούσιο με την παθητική εξάτμιση του νέκταρος. Το μέλι βαμβακιού είναι ανοιχτόχρωμο και μετά την κρυστάλλωση του, η οποία γίνεται μέσα σε 1-2 μήνες από τη παραγωγή του, μετατρέπεται σε άσπρο (Τσέλλιος & Θρασυβούλου, 1989). Ένα θέμα που προκύπτει το τελευταίο χρονικό διάστημα είναι με τα εντομοκτόνα τα οποία ανιχνεύονται στο μέλι καθώς περνάνε από τη μέλισσα στο μέλι με αποτέλεσμα την επίδραση στην υγεία του ανθρώπου. Παρ' όλα αυτά όμως το βαμβάκι αποτελεί μία από τις κύριες πηγές νέκταρος για τον Έλληνα μελισσοκόμο.

#### **1.3.12 Πολύκομβος – *Polygonum spp.*, (παραγωγή μελιού από νέκταρ)**

Το μέλι πολύκομβου χαρακτηρίζεται ως ένα σκοτεινόχρωμο μέλι με χαρακτηριστική μυρωδιά αλλά όχι με ωραία γεύση. Είναι πλούσιο σε ένζυμα, περιέχει υψηλά ποσοστά σε μεταλλικά στοιχεία που του προσδίδουν υψηλή θρεπτική αξία και είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό στη θέρμανση (Τσέλλιος & Θρασυβούλου, 1989).

#### **1.3.13 Ευκάλυπτος – *Eucalyptus spp.*, (παραγωγή μελιού από νέκταρ)**

Υπάρχουν πολλά μελισσοκομικά είδη ευκάλυπτου που ανθίζουν σχεδόν όλες τις εποχές (Χαριζάνης, 1989, 1996β). Στην Ελλάδα συναντάμε πολύ συχνά το είδος *E.globules*, γνωστό ως ο ευκάλυπτος ο σφαιρικός. Το μέλι ευκάλυπτου είναι συνήθως ανοιχτόχρωμο και κρυσταλλώνεται γρήγορα.



**1.3.14 Σιδηρίτης ή τσάι του βουνού – *Sideritis spp.*, (παραγωγή μελιού από νέκταρ)**

Το μέλι σιδηρίτη θεωρείται ως ένα από τα καλύτερα μέλια που παράγεται όμως σε μικρές ποσότητες. Στην Ελλάδα το συναντάμε στις περιοχές του Ταΰγετου, της Εύβοιας, του Ολύμπου, του Παρνασσού, της Κρήτης και του Αγίου Όρους. Το χρώμα του είναι σκούρο, με πολύ έντονο άρωμα, γεύση του τσαγιού και είναι παχύρρευστο (Τσέλλιος & Θρασυβούλου, 1989).

**1.3.15 Ηλίανθος – *Helianthus annuus*, (παραγωγή μελιού από νέκταρ)**



**Εικόνα 8.** Ηλίανθος (<http://el.wikipedia.org>)

Το μέλι ηλίανθου συλλέγεται κατά κύριο λόγο στον Έβρο, όπου υπάρχουν εκτάσεις όπου καλλιεργείται το συγκεκριμένο φυτό. Χαρακτηρίζεται ως ένα ανοιχτόχρωμο μέλι που κρυσταλλώνει σε 1-2 μήνες και το οποίο είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ποιότητα της διατροφής μας (Τσέλλιος & Θρασυβούλου, 1989).

### 1.3.16 *Μέλι κρόκου* – *Crocus sativus*, (παραγωγή μελιού από νέκταρ)



Εικόνα 9. Κρόκος (<http://www.greek-islands.us>)

Το μέλι αυτό προέρχεται από το φυτό κρόκος, το οποίο στη χώρα μας καλλιεργείται στην περιοχή της Κοζάνης. Το φυτό αυτό φυτεύεται το καλοκαίρι και ανθίζει το φθινόπωρο. Το μέλι κρόκου είναι ανοιχτόχρωμο, κρυσταλλοποιείται σε 8-10 μήνες. Θεωρείται σπάνιο και περιζήτητο μέλι και ιδιαίτερα ακριβό και σχεδόν το 90% από το μέλι που παράγεται εξάγεται κυρίως στο εξωτερικό (Wilkins & Yinrong, 1993). Τα άνθη του κρόκου έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε φαινόλες και άλλα αντιοξειδωτικά, που θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στην εφαρμογή τους, ως λειτουργικά συστατικά (Serrano-Diaz J, Sanchez AM et al., 2012).

### 1.3.17 *Ρίγανη* – *Origanum vulgare*, (παραγωγή μελιού από νέκταρ)

Το μέλι ρίγανης παραγείται τον Ιούλιο και θεωρείται αρκετά σπάνιο μέλι. Η παραγωγή του γίνεται κυρίως στις περιοχές της Μακεδονίας, της Θράκης και της Θεσσαλίας. Το φυτό της ρίγανης αξιοποιεί τις ορεινές και μειονεκτικές περιοχές με ικανοποιητικές στρεμματικές αποδόσεις. Το αιθέριο έλαιο του *Origanum vulgare* είναι αποτελεσματικό στους μύκητες *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger* (dos Santos NS, Athayde Aguiar AJ et al., 2012).

## 1.4 Μέλι Manuka

Το μέλι *Manuka* παράγεται από το νέκταρ του φυτού *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 μέλι αυτό το χρησιμοποιούσαν και για τις θεραπευτικές, αντιβιοτικές και αντιβακτηριδιακές του ιδιότητες (Adams CJ, 2009), με αποτέλεσμα να οδηγήσει τα μεγαλύτερα ιατρικά κέντρα του κόσμου να το προτείνουν σαν επικουρική θεραπεία σε πολλές περιπτώσεις αναπνευστικών λοιμώξεων, πονόλαιμου, αμυγδαλίτιδας, φαρυγγίτιδας, γρίπης και ιώσεων. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και εξωτερικά, σαν θεραπευτικό, επουλωτικό και αντιμολυσματικό σε περιπτώσεις δερματικών μολύνσεων και ερεθισμών (Allen et al., 1991).



**Εικόνα 10.** Μέλι Manuka (<http://www.greek-islands.us>)

Το πανεπιστήμιο του Waikato στο Χάμιλτον της Ν. Ζηλανδίας μελέτησε πρώτο τη σύνθεση του μελιού αυτού και την αντιμικροβιακή του δράση. Αναπτύχθηκε μια μέθοδος για να μετράτε η αντιμικροβιακή δράση αυτού, 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 υψηλό 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 μεθυλγλυοξάλη (MGO), η οποία ανιχνεύεται σε υψηλά επίπεδα (Adams CJ, 2009). Η μεθυλγλυοξάλη σχηματίζεται από τη μετατροπή της δι-υδροξυακετόνης (DHA) που βρίσκεται σε εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις στο νέκταρ των λουλουδιών του μελιού Manuka (Adams CJ, 2009). Είναι άγνωστο πως η DHA σχηματίζεται στο νέκταρ και γιατί είναι παρόν σε τόσο μεγάλες ποσότητες στο φυτό *Leptospermum scoparium*. Επίσημα πλέον η μεθυλγλυοξάλη αναγράφεται στη συσκευασία κάθε μελιού Manuka. Για παράδειγμα, MGO +100 σημαίνει ότι 100mg μεθυλγλυοξάλης περιέχονται σε 1 κιλό μελιού Manuka.

## 1.5 Το μέλι ως αντιμικροβιακός παράγοντας

Οι επιδράσεις του μελιού στην υγεία κινούσαν ανέκαθεν το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Για πολλές εκατοντάδες χρόνια, το μέλι χρησιμοποιούνταν για θεραπεία πληγών καθώς και για θεραπεία παθήσεων του γαστρεντερικού συστήματος (Zumla & Luat, 1989, Olaitan et al., 2007). Με την έλευση όμως των αντιβιοτικών, η κλινική εφαρμογή του μελιού μειώθηκε στη δυτική ιατρική (Kwakman et al., 2010). Η ισχυρή *in vitro* δράση του μελιού έναντι βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά (Cooper et al., 2002) και η επιτυχής εφαρμογή του στη θεραπεία μολυσμένων πληγών που δεν ανταποκρίνονται στην αντιβιοτική θεραπεία (Efem, 1988), προσέδωκε εκ νέου το ενδιαφέρον της μοντέρνας ιατρικής ως εναλλακτική θεραπεία.

Το μέλι έχει ευρύ φάσμα δράσης κατά των παθογόνων μικροοργανισμών και των βακτηρίων που προσβάλλουν τον άνθρωπο και τα τρόφιμα (Cooper et al., 2002, Kwakman et al., 2008, Mundo et al., 2004, Taormina et al., 2001). Η δραστικότητα του διαφέρει έναντι σε κάθε βακτήριο και αυτό ίσως οφείλεται στις διαφορές των φυτικών πηγών του. Χωρίζεται σε ποικιλίες που διαφοροποιούνται λόγω του τύπου του φυτού (από το οποίο συλλέγονται το νέκταρ και η γύρη), της χώρας προέλευσης καθώς και του τρόπου παραγωγής (Carnwath et al., 2013). Το μέλι είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό σε διάφορα κλινικά στελέχη βακτηρίων και ενισχύει τη δράση των αντιβιοτικών όταν χορηγείται μαζί με αυτά (Wang et al., 2012). Συγκεκριμένα,

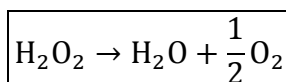
πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η χρήση του μελιού ενάντια σε κλινικά απομονωμένα στελέχη του *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa*, θανάτωσε τα κύτταρα που ήταν σε ελεύθερη διαβίωση, σε όλα τα στελέχη που δοκιμάστηκαν (Alandejani et al., 2009). Αυτό που το καθιστά ιδιαίτερα σημαντικό είναι η ικανότητα του να σκοτώνει τα βακτήρια ακόμη και στην πιο ανθεκτική κατάσταση των βιοϋμένων τους, με αποτέλεσμα να αποδεικνύεται πιο αποτελεσματικό από οποιοδήποτε μεμονωμένο, χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό (Wang et al. 2012). Σε μεγάλο μέρος των ερευνών που έχουν γίνει για τη χρήση του μελιού σε μικροβιακές λοιμώξεις και επούλωση τραυμάτων, δεν αναφέρεται ο τύπος του μελιού που έχει χρησιμοποιηθεί (Al-Waili et al., 2013).

Προσπάθειες για τον εντοπισμό της πηγής της βακτηριοκτόνου δράσεως του μελιού έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη μορίων όπως η μεθυλγλυοξάλη (Kwakman et al., 2010), ο ακριβής όμως χαρακτηρισμός των αποτελεσμάτων τους είναι δύσκολος λόγω του μεγάλου αριθμού των συστατικών και της δυνατότητας συνδυαστικών επιδράσεων (Wang et al, 2012).

Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού οφείλεται κυρίως στην ενζυμική παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου μέσω του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης (Dustmann, 1979, Molan, 1992a) της οξύτητας του, της ώσμωσης του και σε άλλα συστατικά του μελιού (Anthimidou & Mossialos, 2012), όπως αρωματικά οξέα ή φαινολικές ενώσεις και πρωτεΐνες (Weston, 2000). Συγκεκριμένα:

- **Ωσμωση**: Το μέλι περιέχει στη σύσταση του μεγάλη ποσότητα σακχάρων με αποτέλεσμα να θεωρείται ως ένα υπέρκορο υδατικό διάλυμα σακχάρων, στο οποίο οι συγκεντρώσεις είναι μεγαλύτερες από εκείνες που κανονικά μπορούν να ανευρίσκονται μέσα στην υγρή φάση του. Η υψηλή αυτή περιεκτικότητα δημιουργεί ένα υψηλό ωσμωτικό δυναμικό (με πολύ μικρή ποσότητα νερού) με αποτέλεσμα τα βακτήρια κυριολεκτικά να αφυδατώνονται και να πεθαίνουν μέσα στη μάζα του (Joerisch, 1970).
- **Οξύτητα**: Το pH του μελιού κυμαίνεται μεταξύ 3 και 4. Τα βακτήρια δεν μπορούν να επιβιώσουν σε ένα τόσο όξινο περιβάλλον όπως αυτό. Ωστόσο, αν το μέλι αραιωθεί τότε μπορεί να μειωθεί σε ένα βαθμό η οξύτητα του (White JW et al., 1963).
- **Ένζυμα**: Δύο ένζυμα η οξειδάση της γλυκόζης και η καταλάση παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιμικροβιακή δράση του μελιού.

- Η οξειδάση της γλυκόζης είναι ένα ένζυμο που προσθέτει η συλλέκτρια μέλισσα από τους υποφαρυγγικούς αδένες της. Το ένζυμο αυτό είναι υπεύθυνο για την παρασκευή του γλυκονικού οξέος από τη γλυκόζη και κατά τη βιοχημική αυτή αντίδραση σχηματίζεται ως παραπροϊόν το υπεροξειδίο του υδρογόνου  $H_2O_2$ . Τα περισσότερα βακτήρια δεν μπορούν να αναπτυχθούν μέσα στη μάζα του μελιού, εξαιτίας αυτών των δύο συστατικών. Το  $H_2O_2$  έχει την ικανότητα να αναχαιτίζει την ανάπτυξη των βακτηρίων αλλά και να τα θανατώνει. Επιπλέον, βρέθηκε ότι σε μικρές συγκεντρώσεις το  $H_2O_2$  συμμετέχει ως ένας από τους παράγοντες επούλωσης πληγών, όταν σε αυτές εφαρμόζονται επιθέματα με μέλι (Herold, 1970).
- Η καταλάση είναι ένζυμο το οποίο επιταχύνει την αντίδραση διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου:



Η μετατροπή αυτή είναι αναγκαία για τη ζωή του κυττάρου, γιατί το  $H_2O_2$  που παράγεται κατά τις αντιδράσεις μεταβολισμού είναι ιδιαίτερα τοξικό. Συνήθως, η καταλάση βρίσκεται στα κύτταρα του ήπατος και των νεφρών στα θηλαστικά και στα φυτικά κύτταρα της γύρης και του νέκταρος, με συνέπεια να ανιχνεύεται και στο μέλι.

Έτσι, τα δυο αυτά ένζυμα, η οξειδάση της γλυκόζης (η οποία παράγει το  $H_2O_2$ ) και η καταλάση (η οποία διασπά το  $H_2O_2$ ) καθορίζουν τα επίπεδα του  $H_2O_2$  στο μέλι (Weston, 2000). Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις του  $H_2O_2$  σε διαφορετικά μέλια (από διαφορετικές φυτικές πηγές) έχουν ως αποτέλεσμα τις διαφορές στην αντιμικροβιακή δράση των μελιών (White JW et al., 1963, Molan PC, 1992).

- **Φυτοχημικά συστατικά:** Τέτοια συστατικά είναι τα φαινολικά οξέα, η λυσοζύμη, τα φλαβονοειδή (Cooper et al., 1999), οι πρωτεΐνες, τα ολιγοπεπτίδια (Mundo et al., 2004) και η μεθυλγλυοξάλη MGO (Mavric E et al., 2008), τα οποία φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην

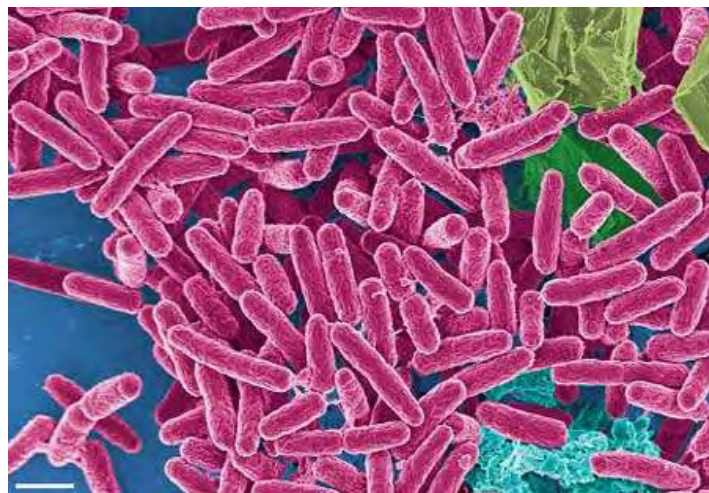
αντιβακτηριδιακή δράση του μελιού. Υπάρχει μια πρωτεΐνη, η bee-defensin-1, η οποία εκκρίνεται στο μέλι από τους υποφαρυγγικούς αδένες της εργάτριας μέλισσας. Μετά από μελέτη παρατηρήθηκε ότι η έκφραση της bee-defensin-1 από τους υποφαρυγγικούς αδένες και/ή η ποσότητα των εκκρίσεων που προστίθεται, μπορεί να ποικίλλει έντονα λόγω της διαφοράς των επιπέδων της στα διάφορα μέλια (Kwakman PH et al., 2010).

## 1.6 *Pseudomonas aeruginosa*

Η *Ps. aeruginosa* περιγράφηκε για πρώτη φορά ως ένα ξεχωριστό βακτηριακό είδος, στο τέλος του 19<sup>ου</sup> αιώνα μετά την ανάπτυξη των αποστειρωμένων μέσων καλλιέργειας από τον Παστέρ. Ο Carle Gessard το 1882 ανακάλυψε τη *Ps. aeruginosa* κατά τη διάρκεια ενός πειράματος, στο οποίο το βακτήριο αυτό ταυτοποιήθηκε μέσω των υδατοδιαλυτών χρωστικών ουσιών του και οι οποίες έδωσαν κυανοπράσινη χρώση μετά από την έκθεση τους σε υπεριώδη ακτινοβολία. Μετέπειτα, η χρώση αυτή αποδόθηκε στην πυοκυανίνη, μια χρωστική της *Ps. aeruginosa* και μαζί με τα πειραματικά του ευρήματα ανέπτυξε τη θεωρία για την παθογόνο φύση της και τις μολυσματικές ομοιότητες που έχει με παρόμοιους μικροοργανισμούς. Ο Charrin το 1890 χαρακτήρισε τη *Ps. aeruginosa* ως ένα ευκαιριακά παθογόνο αερόβιο βακτήριο, το οποίο έχει μια αξιοσημείωτη ικανότητα να προσαρμόζεται και να ευδοκίμει σε μία ποικιλία περιβαλλόντων: ύδατος (Pellett et al., 1983), (Kimata et al., 2004), εδάφους (Cavalca et al., 2000), κλινικών (Wolfgang et al., 2003), νοσοκομείων, αστικών λυμάτων (Schwartz et al., 2006) και βιομηχανικών αποβλήτων ( Karadzic et al., 2006).

Η *Ps. aeruginosa* είναι Gram(-) αρνητικό, μη σπορογόνο βακτήριο με ραβδοειδές σχήμα. Αν και ταξινομείται στα αερόβια βακτήρια θεωρείται από πολλούς ως προαιρετικά αναερόβιο, διότι προσαρμόζεται καλά σε συνθήκες μερικής ή και ολικής έλλειψης οξυγόνου. Ο κυτταρικός φάκελος της είναι όμοιας μορφολογίας με αυτόν των Gram(-) αρνητικών βακτηρίων και αποτελείται από την εσωτερική μεμβράνη, το στρώμα της πεπτιδογλυκάνης και την εξωτερική μεμβράνη. Τα πιο σημαντικά δομικά στοιχεία του βακτηριακού αυτού κυττάρου είναι η πρωτεΐνη F (OprF), το έλυτρο και τα τριχίδια διότι παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της λοιμογόνου δράσης της *Pseudomonas aeruginosa*. Η πρωτεΐνη F βρίσκεται στην

εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου και λειτουργεί ως πορίνη, επιτρέποντας σε ορισμένα μόρια και ιόντα να εισέλθουν στα κύτταρα, αλλά και ως δομική πρωτεΐνη, διατηρώντας το βακτηριακό κυτταρικό σχήμα.



**Εικόνα 11.** *Pseudomonas aeruginosa* (www.waterscan.rs)

Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι η μόνη που έχει την ιδιότητα να παράγει τη χρωστική πράσινη πυοκυανίνη. Η χρωστική αυτή θεωρείται ως ένας δευτερογενής μεταβολίτης με την ικανότητα να οξειδώνει και μπορεί να σκοτώνει τα μικρόβια που ανταγωνίζονται τη *Ps. aeruginosa*, καθώς και κύτταρα των πνευμόνων θηλαστικών τα οποία η *Ps. aeruginosa* έχει μολύνει κατά τη διάρκεια της κυστικής ίνωσης.

Ο σίδηρος είναι ένα απαραίτητο στοιχείο σχεδόν για όλα τα βακτήρια που υπό αερόβιες συνθήκες σχηματίζει αδιάλυτο σίδηρο (III), με αποτέλεσμα να μην είναι εύκολα διαθέσιμος. Έτσι πολλά βακτήρια για να ξεπεράσουν αυτό το πρόβλημα της προσβασιμότητας του σιδήρου παράγουν χημικά παράγοντα σιδήρου που ονομάζονται σιδηροφόρα (Yeterian et al., 2010). Οι φθορίζουσες ψευδομονάδες παράγουν την πυοβερδίνη (Manwar et al., 2004, Mossialos & Amoutzias, 2009), η οποία αντιπροσωπεύει το κύριο σύστημα πρόσληψης σιδήρου των φθορίζουσων ψευδομονάδων και θεωρείται απαραίτητη για τη μόλυνση σε πολλά διαφορετικά μοντέλα νόσου (Mossialos & Amoutzias, 2007).

Η παραγωγή των μολυσματικών παραγόντων της *Ps. aeruginosa* έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζεται από την αίσθηση μεγέθους πληθυσμού (QS) (Annappoorani et al., 2013) για αυτό και η αναστολή του είναι επιθυμητή (Kohler et al., 2010). Το QS (Quorum sensing) είναι ένας όρος που περιγράφει τη βακτηριακή επικοινωνία που



χρησιμοποιείται από πολλά βακτηριακά είδη και βασίζεται στην παραγωγή και ανίχνευση διάχυτων μορίων σήματος (Atkinson & Williams, 2009). Αυτά τα μόρια ενεργοποιούν μονοπάτια με αποτέλεσμα συλλογικές αλλαγές στη συμπεριφορά. Η παρεμπόδιση του διαταράσσει τα αμυντικά μέτρα και τη ρύθμιση της παθογένειας, με αποτέλεσμα την αποδυνάμωση μιας λοίμωξης και καθιστά τα παθογόνα βακτήρια πιο εύαλωτα σε βακτηριοκτόνα στοιχεία. Έτσι, αφού το QS δεν είναι απαραίτητο για την επιβίωση, μια στρατηγική για αναστολή του θα μειώσει τη μολυσματικότητα, ελαχιστοποιώντας ταυτόχρονα την επιλογή για αντίσταση (Wang et al., 2012). Τα δύο πιο γνωστά QS συστήματα της *Ps. aeruginosa* είναι τα LasIR και RhlIR (Smith & Iglewski, 2003). Για να επιταχύνει και να διευκολύνει την παθογένεια της η *Ps. aeruginosa*, παράγει LasIR και RhlIR μολυσματικούς παράγοντες όπως η έκκριση εξωτοξίνης και εξωενζύμων (π.χ. πρωτεάσες, σερίνη, ελαστάση) και η παραγωγή βιοϋμένων (Annaroorani et al., 2013).

Η *Ps. aeruginosa* είναι το τέταρτο πιο συχνά απομονωμένο νοσοκομειακό παθογόνο αντιπροσωπεύοντας το 10,1% του συνόλου των νοσοκομειακών λοιμώξεων και συγκεκριμένα στα νοσοκομεία των Η.Π.Α. θεωρείται ότι αποτελεί κατά μέσο όρο το 0,4% των λοιμογόνων περιπτώσεων σύμφωνα με το Κέντρο Ελέγχου Λοιμώξεων. Σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή, η βακτηριακή μόλυνση μπορεί να επιφέρει μια πληθώρα ασθενειών (π.χ. πνευμονία, ενδοκαρδίτιδα, μηνιγγίτιδα). Δυστυχώς εμφανίζει αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά και μπορεί να προσαρμοστεί όταν εκτίθεται σε αντιμικροβιακούς παράγοντες και να αναπτύξει νέες αντιστάσεις. Ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες όμως που επικρατούν, προκύπτουν συχνά επιδερμικές λοιμώξεις όταν η *Ps. aeruginosa* διαπερνά τις άμυνες του ανθρώπινου ξενιστή και εισέρχεται στο εσωτερικό του δέρματος στην περιοχή μιας ανοιχτής πληγής. Ζωτικό ρόλο στη μόλυνση των εγκαυμάτων και των πληγών διαδραματίζουν οι βλεφαρίδες και τα τριχίδια της *Ps. aeruginosa* και η απουσία τους από τα στελέχη αυτού του βακτηρίου μειώνει τη λοιμογόνο δράση του. Συνήθως δεν προκαλεί ασθένειες σε υγιείς ανθρώπους γιατί θεωρείται ως ένας ευκαιριακά παθογόνος μικροοργανισμός.

Η ανθεκτικότητα της *Ps. aeruginosa* στα περισσότερα αντιβιοτικά είναι ένα γεγονός που καθιστά τη λοίμωξη από *Ps. aeruginosa* αρκετά επικίνδυνη ειδικά σε άτομα με επιβαρυνμένο ανοσοποιητικό. Αυτή η ανθεκτικότητα της οφείλεται στην ικανότητα της να αντιλαμβάνεται τότε το εξωτερικό στρώμα των βιοϋμένων καταστρέφεται, με αποτέλεσμα να ενδυναμώνει τα εσωτερικά στρώματα για να αποκαταστήσει τη βακτηριακή κοινότητα. Οι βιοϋμένες είναι πολύπλοκες κοινότητες

που προσκολλώνται σε μια ποικιλία επιφανειών και τα οποία από τη στιγμή που σχηματίζονται, είναι δύσκολο να καταστραφούν. Επιπλέον, αυτό που αυξάνει την άμυνα της *Ps. aeruginosa* έναντι πολλών αντιβιοτικών και χημειοθεραπευτικών παραγόντων είναι η ενδογενής αντίσταση, που οφείλεται στη χαμηλή διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης. Αυτό προκαλείται είτε από την απουσία της πορίνης OprF, είτε από την παραγωγή των β-λακταμασών που διασπούν τις β-λακτάμες. Επιπλέον το γονιδίωμα της *Ps. aeruginosa* έχει πολυάριθμες αντλίες εκροής, μεταξύ των οποίων οι MexAB – OprM και MexXY – OprM, οι οποίες διώχνουν προς τα έξω τα αντιβιοτικά πριν προλάβουν αυτά να δράσουν στο βακτήριο. Μια φαινοτυπική ερευνητική προσέγγιση έδειξε ότι η πορίνη OprF απαιτείται για τον έλεγχο της μολυσματικότητας της ψευδομονάδας. Η απουσία της OprF έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη προσκόλληση σε ζωικά κύτταρα, την έκκριση τοξινών και τη παραγωγή των λοιμογόνων παραγόντων της «απαρτίας ανίχνευσης» (Fito-Boncompere et al., 2011). Η ιδιότητα αυτή της πορίνης OprF είναι επιθυμητή, διότι έτσι μειώνεται η πρόσληψη επιβλαβών ουσιών εντός του κυττάρου με αποτέλεσμα η *Ps. aeruginosa* να παρουσιάζει υψηλή αντίσταση στα αντιβιοτικά.

Έχουν γίνει διάφορες έρευνες όπου έχει αποδειχθεί ότι το *Manuka honey* καθώς και πολλά Ελληνικά μέλια αναστέλλουν την ανάπτυξη και τη δράση της *Ps. aeruginosa* (Anthimidou & Mossialos, 2012, Sherlock et al., 2010).

## 1.7 *Staphylococcus aureus*

Ο *S. aureus* ανήκει στο γένος βακτηρίων που είναι Gram(+) θετικοί κόκκοι. Θεωρείται ως το πιο κοινό είδος σταφυλόκοκκου, το οποίο προκαλεί τις πιο συχνές μολύνσεις. Η σταφυλοξανθίνη, μια καροτενοειδής χρωστική ουσία, είναι υπεύθυνη για το χαρακτηριστικό χρυσό χρώμα των αποικιών του. Αναπτύσσεται στο δέρμα, στην ανώτερη αναπνευστική οδό (κυρίως στη μύτη και στο λαιμό), στη φυσιολογική χλωρίδα του ρινοφάρυγγα των υγείων ενηλίκων, οι οποίοι μπορεί να είναι φορείς του παθογόνου χωρίς ωστόσο να νοσούν. Μπορεί να επιβιώσει επίσης σε οικόσιτα ζώα (όπως σκυλιά, γάτες, άλογα). Προκαλεί πυρετογόνες μολύνσεις (εξανθήματα), λοιμώξεις του δέρματος και των πληγών, λοιμώξεις του αναπνευστικού, σύνδρομο τοξικής καταπληξίας (TTS), τοξική επιδερμική νεκρόλυση, φλύκταινες, οστεομυελίτιδα, μηνιγγίτιδα, αρθρίτιδα. Ο *S. aureus* 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 και συν, 2006). Τοπική χρήση επιθεμάτων μελιού έχουν ευεργετική επίδραση στις πληγές αυτές (Molan, 1998, 1999a, 1999b), καθώς και σε τομές εγχείρησης (Ndayisaba et al., 1993) και εγκαύματα (Adesunkanmi et al., 1994, Efem, 1988) που έχουν προσβληθεί από το βακτήριο.



**Εικόνα 12.** *Staphylococcus aureus* (www.microbeworld.org)

Ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος θεωρείται ως ένα άκρως επιτυχημένο παθογόνο βακτήριο που προκαλεί σημαντικές ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις (Fridkin S.K. et al., 2005). Η επιτυχία του οφείλεται ένα μέρος στην ταχεία αντίσταση στις περισσότερες διαθέσιμες αντιμικροβιακές θεραπείες. Συγκεκριμένα, από την εισαγωγή των αντιβιοτικών στην Ιατρική, ο *S. aureus* παρουσίαζε μια συχνή και ταχεία ανάπτυξη και εξάπλωση της ανθεκτικότητας του σε αυτά (Boucher HW, 2008). Αντιβιοτικά ευρέου φάσματος όπως τα αμινογλυκοσίδια χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλα αντιβιοτικά, όπως οι β-λακτάμες (Ramirez MS et al., 2010). Η αδρανοποίηση των αμινογλυκοσιδών κατά των τροποποιητικών ενζύμων της αμινογλυκοσίδης (AME), όπως φωσφοτρανσφεράση αμινογλυκοζίτης (APH), ακετυλο-τρανσφεράσες (AAC) και νουκλεοτιδυλο-τρανσφεράση (ANT), θεωρείται ο πιο κοινός μηχανισμός αντοχής της αμινογλυκοσίδης (Ramirez MS et al., 2010, Fatholahzadeh B et al., 2009). Εκτός από την αντοχή του σε κάθε αποτελεσματικό αντιβιοτικό, η αντοχή του *S. aureus* (όπως ενός παθογόνου) μπορεί να αποδοθεί στους λοιμογόνους παράγοντες, οι οποίοι έχουν σχεδιαστεί για να αποφύγουν τις

άμυνες του ξενιστή ή την επίθεση σε κάθε επίπεδο (Otto M., 2010, Bartlett A.H. et al., 2010). Ο *Staphylococcus aureus* παράγει μια σειρά τοξινών που είναι ικανές να στοχεύουν στο θάνατο του βακτηρίου δημιουργώντας κανάλια στη κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η προκύπτουσα οσμωτική ρύθμιση οδηγεί στην κυτταρική λύση.

Η επικράτηση των στελεχών του *Staphylococcus aureus* που είναι ανθεκτικά στη μεθικιλίνη (*MRSA*) έχει φτάσει σε υψηλά επίπεδα παγκοσμίως (Styers D et al., 2006). Συγκριμένα έχει αυξηθεί σε ποσοστό 40% τα τελευταία 10 χρόνια. Ο *MRSA* είναι ένα είδος του *S. aureus*, ο οποίος έγινε ιδιαίτερα ανθεκτικός σε αντιβιοτικά β-λακτάμης με την απόκτηση του γονιδίου *mecA* στο χρωμοσωμικό του DNA (Hiramatsu K, 1995). Απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1960 στην Αγγλία (Jevons MP, 1961) και προκάλεσε μια παγκόσμια επιδημία το 1970. Τουλάχιστον τρία διαφορετικά είδη γενοτύπων του *MRSA* ήταν παρών στη δεκαετία του 1980 (Hiramatsu K, 1995) και δύο από αυτά εξακολουθούν να κυριαρχούν στον κόσμο, όπως ο *HA-MRSA* που κυριαρχεί στη υγειονομική περίθαλψη και θεωρείται πολύ-ανθεκτικός στα αντιβιοτικά (Enright MC, 2002). Σύμφωνα με μια μελέτη των Η.Π.Α. το 2007, 880.000 άνθρωποι μολύνονταν από τον *MRSA* κάθε χρόνο. Δυστυχώς, το 5% των ατόμων με λοίμωξη από *MRSA* πεθαίνουν και ο αριθμός αυτός αντιστοιχεί σε 20.000 – 40.000 θανάτους το χρόνο (Klebens RM et al., 2007). Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι ο *MRSA* απέκτησε αντοχή σε όλα σχεδόν τα αντιβιοτικά και κατέκτησε ακόμη και την «τελευταία λύση» αντιβιοτικού, τη βανκομυκίνη (Hiramatsu K et al., 1997, Chang S et al., 2003). Το πιο ανησυχητικό είναι ότι πρόσφατα *S. aureus* έχει αρχίσει να προκαλεί θανατηφόρες λοιμώξεις εκτός του νοσοκομειακού περιβάλλοντος, σε σχετικά υγιή και νεαρά άτομα (Naimi T.S. et al., 2003, Herold B.C. et al., 1998).

## 2. Σκοπός της παρούσας μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί η πιθανή *in vitro* ανθεκτικότητα κάποιων παθογόνων βακτηρίων και συγκεκριμένα ανθεκτικών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* έναντι της αντιβακτηριακής δράσης Ελληνικών μελιών συγκρινόμενα με το μέλι *Manuka*.

## 3. Πειραματικό μέρος

### 3.1 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήσαμε κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας ήταν:

- Τρυβλία Petri (100mm)
- Μικροπλάκες 96 θέσεων (microplates)
- Αποστειρωμένα πλαστικά φιαλίδια τύπου falcon των 50ml
- Θρεπτικό υλικό *Nutrient Agar* (Χρησιμοποιείται για στερεό θρεπτικό υπόστρωμα σε τρυβλία και για καλλιέργεια μη απαιτητικών σε διατροφικά στοιχεία οργανισμών)
- Θρεπτικό υλικό *Nutrient Broth* (Χρησιμοποιείται για υγρές καλλιέργειες και για μη απαιτητικούς οργανισμούς σε διατροφικά στοιχεία)
- Θρεπτικό υλικό *Mueller Hinton Broth*
- Πιπέτες
- Eppendorfs
- Γυάλινα φιαλίδια (vials)

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήσαμε σε αυτή τη πειραματική διαδικασία είναι:

- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*

#### 3.1.1 Δείγματα μελιών

Τα μέλια που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Εξετάστηκαν τα παρακάτω 7 δείγματα μελιών (Πίνακας 1). Κάθε δείγμα κατείχε ένα νούμερο κωδικό και λεπτομέρειες για τη φυτική πηγή του. Τα δείγματα μελιού ήταν αποθηκευμένα σε γυάλινα ή πλαστικά δοχεία σε θερμοκρασία δωματίου σε κλειστό χώρο.

Κωδικός δείγματος	Τύπος Μελιού	Περιοχή	Παραγωγός	Ημερομηνία παραγωγής
10	Αγριοβότανα και θυμάρι	Α. Όλυμπος	Αρβανίτης Μελίχρυσος	2010
14	Ανθόμελο	Βούρικας	Λαμπάδας Βάιος	2010
19	Ηλιάνθος	Κομοτηνή	Αγροτικός Μελισσοκομικός Συνεταιρισμός Νικήτης Χαλκιδικής	2010
20	Πορτοκάλι: σχεδόν 80% από άνθη πορτοκαλιάς	Άργος	Αγροτικός Μελισσοκομικός Συνεταιρισμός Νικήτης Χαλκιδικής	2010
23	Καστανιά με λίγο Πεύκο	Άγιο Όρος	Αγροτικός Μελισσοκομικός Συνεταιρισμός Νικήτης Χαλκιδικής	2010
26	Μέλι άνθεων: Άγρια ρίγανη και Άγριο τριφύλλι	Ορεινά λιβάδια και δάση του Ολύμπου	Σαμαράς Γιώργος Κέντρο Μελισσοκομίας Θεσσαλίας (Βόλος)	2010
30	Βελανιδιά	Πήλιο	Αρβανίτης Μελίχρυσος	2010

**Πίνακας 1.** Δείγματα μελιών

**Μέλι Manuka:** Το μέλι Manuka που χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση με τα Ελληνικά μέλια είναι της εταιρείας Manuka Health New Zealand με UMF 25+ και MGO 550.

## 3.2 Μέθοδοι

### 3.2.1 Υγρές καλλιέργειες των *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus*

Αρχικά προετοιμάζονται οι καλλιέργειες των βακτηρίων χρησιμοποιώντας καλλιέργειες (glycerol stock) που διατηρούνται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Με μικροβιολογικό κρίκο και σε αποστειρωμένο περιβάλλον, παίρνεται μια μικρή ποσότητα βακτηρίων από την καλλιέργεια stock και τοποθετείται σε τρυβλία Petri με θρεπτικό μέσο *Nutrient Agar*. Για την παρασκευή 1000ml θρεπτικού μέσου, ζυγίστηκαν 21,5gr *Nutrient Agar* και προστέθηκαν σε 1L απιονισμένο νερό. Πραγματοποιήθηκε καλή ανάδευση για μερικά λεπτά και έγινε αποστείρωση στους  $120^{\circ}\text{C}$  για 23 λεπτά. Το διάλυμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου μετά την αποστείρωση, έτσι ώστε να φτάσει τους  $47^{\circ}\text{C}$  περίπου και στη συνέχεια μοιράστηκε σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri, υπό ασηπτικές συνθήκες, πριν στερεοποιηθεί. Στη συνέχεια, έγινε επίστρωση των βακτηρίων στα τρυβλία και τοποθετήθηκαν για επώαση σε κλίβανο στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 24 ώρες.

Από τη στερεή καλλιέργεια πάρθηκε, από τα τρυβλία που αναπτύχθηκαν τα βακτήρια με μικροβιολογικό κρίκο και σε ασηπτικό περιβάλλον, ένα κομμάτι από τις αποικίες τους και τοποθετήθηκαν σε vials με θρεπτικό υπόστρωμα *Nutrient broth*. Για τη παρασκευή 1000ml θρεπτικού μέσου, ζυγίστηκαν 13gr *Nutrient broth* και προστέθηκαν σε 1L απιονισμένο νερό. Αφού πραγματοποιήθηκε καλή ανάδευση για μερικά λεπτά, μοιράστηκαν 5ml του θρεπτικού μέσου σε κάθε ένα από τα μικρότερα μπουκαλάκια (vial) και έπειτα έγινε αποστείρωση στους  $120^{\circ}\text{C}$  για 23 λεπτά. Τα vials διατηρήθηκαν στο ψυγείο στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Έτσι το vial με τη μικρή ποσότητα βακτηρίων (υγρή καλλιέργεια), τοποθετήθηκε σε επωαστήρα υπό ανάδευση (incubator shaker) για 24 ώρες στους  $37^{\circ}\text{C}$  στις 210 στροφές.

### 3.2.2 Μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης

#### 3.2.2.1 Αρχή της μεθόδου

Η *in vitro* μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC πραγματοποιήθηκε σε αποστειρωμένες



μικροπλάκες (*microplates*) πολυστερίνης 96 θέσεων (*96 wells*) η καθεμία. Για τη δοκιμασία της μεθόδου ακολουθήθηκε η διαδικασία που αναγράφεται στη βιβλιογραφία (Thomas Patton et al., 2005, Sherlock et al., 2010). Το MIC, για τις υγρές καλλιέργειες, ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα, στην οποία δεν ανιχνεύεται καμία αύξηση, δηλαδή έχουμε 100% αναστολή της ανάπτυξης του υπό εξέταση οργανισμού (Sherlock et al., 2010).

Οι μικροπλάκες τοποθετήθηκαν σε *microplate reader* (*ELx808 Absorbance Microplate Reader, BioTek*), το οποίο είναι συνδεδεμένο με έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή, για τη μέτρηση της βακτηριακής ανάπτυξης. Η ανάλυση των οπτικών απορροφήσεων των καλλιεργειών έγινε με το λογισμικό *Gen5™ Data Analysis Software* (Biotek)



**Εικόνα 13.** *ELx808 Absorbance Microplate Reader* (<http://scientiis.com>)

### 3.2.2.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάστηκαν οι καλλιέργειες των βακτηρίων χρησιμοποιώντας καλλιέργειες (glycerol stock) που διατηρούνται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Με μικροβιολογικό κρίκο και σε αποστειρωμένο περιβάλλον, πήραμε μια μικρή ποσότητα βακτηρίων από το stock, που διατηρείται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  και τις τοποθετήσαμε σε vials, που περιείχε 5ml θρεπτικού υποστρώματος *Mueller Hinton Broth*. Τα vials τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα υπό ανάδευση στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 16 ώρες στις 210 στροφές/min. Έπειτα οι καλλιέργειες αραιώθηκαν, μέχρι την παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος, θολερότητας ίση με 0,5 McFarland (περίπου  $1,5 \cdot 10^8 \frac{cfu}{ml}$ ). Η μέτρηση της οπτικής

πυκνότητας (OD) στα 600nm, έγινε μέχρι να πετύχουμε τιμή 0,132 η οποία αντιστοιχεί σε 0,5 McFarland (περίπου  $1,5 \cdot 10^8 \frac{cfu}{ml}$ ).

Τα δείγματα των μελιών που χρησιμοποιήθηκαν για την *Pseudomonas aeruginosa* είναι 5 και αντίστοιχα για τον *Staphylococcus aureus* 7 και όλα δοκιμάστηκαν σε 7 διαφορετικές διαδοχικές αραιώσεις (50% v/v, 25% v/v, 12,5% v/v, 6,25% v/v, 3,125% v/v, 1,5% v/v, 0,78% v/v) για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης.

Στη πλάκα μικροτιλοποίησης, το κάθε μέλι (συμπεριλαμβανομένου και του Manuka), χρησιμοποιήθηκε εις τριπλούν, σε 7 πηγαδάκια. Στο καθένα από αυτά προστέθηκε 190μl από την αραιώση του εκάστοτε υπό εξέταση μελιού διαδοχικά και  $5 \cdot 10^4$  CFUs καλλιέργειας. Σε μία σειρά με 7 πηγαδάκια προστέθηκαν διαδοχικά 190μl *Mueller Hinton Broth* και  $5 \cdot 10^4$  CFUs καλλιέργειας (control).

Αρχικά η μικροπλακέτα τοποθετήθηκε στο φασματοφωτόμετρο *ELx808 Absorbance Microplate Reader* (εικόνα 13) και έγινε η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 630nm για χρόνο  $t=0$ . Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν και καταγράφηκαν από το λογισμικό *Gen5™ Data Analysis Software*. Έπειτα η μικροπλακέτα τοποθετήθηκε στον επωαστήρα στους 37° C για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα ακολούθησε εκ νέου ανάγνωση από το φασματοφωτόμετρο *ELx808* στα 630nm για χρόνο  $t=24$ .

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο μετρήσεων προσδιορίσαμε την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση στην οποία δεν υπήρξε βακτηριακή ανάπτυξη με βάση τα εξής:

Η οπτική πυκνότητα (OD) για το κάθε πηγαδάκι προκύπτει από την αφαίρεση της μέτρησης για  $t=24$  μείον τη μέτρηση για  $t=0$ . Δηλαδή,

$$OD_{testwell} = T_{24_{test}} - T_{0_{test}}$$

και

$$OD_{of\ corresponding\ control\ well} = T_{24_{test}} - T_{0_{test}}.$$

Η αναστολή της ανάπτυξης για το κάθε δείγμα μελιού υπολογίζεται με τη χρήση του τύπου:

$$100\% \text{ ANΑΣΤΟΛΗ} = 1 - \left( \frac{OD_{testwell}}{OD_{of\ corresponding\ control\ well}} \right) \times 100$$

(Thomas Patton et al., 2005).

Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν για το κάθε μέλι και για κάθε συγκέντρωση.

### 3.2.3 Διερεύνηση της ανθεκτικότητας βακτηρίων κλινικής σημασίας έναντι δειγμάτων μελιού, με βραχυπρόθεσμη έκθεση υπό σταθερές συγκεντρώσεις μελιού

#### 3.2.3.1 Αρχή της μεθόδου

Έγινε προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC μετά τη βραχυπρόθεσμη έκθεση που πραγματοποιήθηκε με την παρουσία σταθερής συγκέντρωσης συγκεκριμένων δειγμάτων μελιού για 12 συνεχείς μέρες.

Έπειτα έγινε διερεύνηση της παροδικής ή μόνιμης φύσης της ανθεκτικότητας των κλινικών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* έναντι συγκεκριμένων μελιών μετά το τέλος της έκθεσης τους για 12 συνεχείς μέρες, χρησιμοποιώντας τα δείγματα για ανακαλλιέργεια 10 ημερών.

#### 3.2.3.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάστηκαν οι υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* σύμφωνα με τη πρώτη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω. Έπειτα, σε ένα αποστειρωμένο πλαστικό φιαλίδιο τύπου falcon τοποθετήθηκαν 5ml θρεπτικού μέσου *Nutrient Broth* με 5% v/v δείγμα μελιού και εμβολιάστηκαν με 50μl από την υγρή καλλιέργεια της *Pseudomonas aeruginosa* που είχαν ετοιμαστεί πριν 24 ώρες και σε ένα άλλο falcon τοποθετήθηκαν αντίστοιχα 5ml θρεπτικού μέσου *Nutrient Broth* με 3% v/v δείγμα μελιού και εμβολιάστηκαν με 50μl από την υγρή καλλιέργεια του *Staphylococcus aureus*. Στη συνέχεια, τα falcon επωάστηκαν στους 37° C για 24 ώρες στις 210 στροφές/min.

Η μέθοδος αυτή πραγματοποιήθηκε για 12 διαδοχικές μέρες, με τη προσθήκη 50μl από την καλλιέργεια που αναπτύχθηκε στο falcon της προηγούμενης μέρας σε ένα νέο, το οποίο περιείχε το θρεπτικό μέσο NB και την αντίστοιχη συγκέντρωση

δείγματος μελιού για κάθε βακτήριο. Πραγματοποιήθηκε δηλαδή ανακαλλιέργεια, με σκοπό την εκπαίδευση των βακτηρίων μας στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δείγματος μελιού.

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για την *Pseudomonas aeruginosa* σε 5 δείγματα μελιών και αντίστοιχα για τον *Staphylococcus aureus* σε 7, όπως και το μέλι Manuka και για τα δύο βακτήρια, σε δύο ανεξάρτητα πειράματα μέτρησης.

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση MIC για τα δείγματα όπως αναφέρθηκε παραπάνω ( 3.2.2.2 σελ 41 )

Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν για το κάθε μέλι και για κάθε συγκέντρωση.

Έπειτα έγινε διερεύνηση της παροδικής ή μόνιμης φύσης της ανθεκτικότητας των βακτηρίων έναντι των μελιών μετά το τέλος της έκθεσης τους για 12 συνεχείς μέρες, χρησιμοποιώντας τα δείγματα για ανακαλλιέργεια 10 διαδοχικών ημερών χωρίς την παρουσία μελιού. Δηλαδή, σε ένα αποστειρωμένο πλαστικό φιαλίδιο τύπου falcon τοποθετήθηκαν 5ml θρεπτικού μέσου *Nutrient Broth* ενοφθαλμίζοντας με 50μl τη καλλιέργεια της *Pseudomonas aeruginosa* που είχε εκτεθεί σε σταθερές συγκεντρώσεις μελιού και σε ένα άλλο falcon τοποθετήθηκαν 5ml θρεπτικού μέσου *Nutrient Broth* ενοφθαλμίζοντας με 50μl τη καλλιέργεια του *Staphylococcus aureus* που είχε εκτεθεί σε σταθερές συγκεντρώσεις μελιού. Στη συνέχεια, τα falcon επωάστηκαν στους 37° C για 24 ώρες στις 210 στροφές/min.

Η ανακαλλιέργεια πραγματοποιήθηκε για 10 διαδοχικές μέρες, με τη προσθήκη μόνο των 50μl από την καλλιέργεια που αναπτύχθηκε στο falcon της προηγούμενης μέρας σε ένα νέο και του θρεπτικού μέσου *NB*.

Στο τέλος, προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση MIC για τα δείγματα όπως αναφέρθηκε παραπάνω ( 3.2.2.2 σελ 41 )

### 3.2.4 Διερεύνηση της ανθεκτικότητας βακτηρίων κλινικής σημασίας έναντι δειγμάτων μελιού, με βραχυπρόθεσμη έκθεση σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού

#### 3.2.4.1 Αρχή της μεθόδου

Έγινε προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC μετά τη βραχυπρόθεσμη έκθεση που πραγματοποιήθηκε με την παρουσία σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις συγκεκριμένων δειγμάτων μελιού για 12 συνεχείς μέρες.

Έπειτα έγινε διερεύνηση της παροδικής ή μόνιμης φύσης της ανθεκτικότητας των κλινικών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* έναντι των συγκεκριμένων μελιών μετά το τέλος της έκθεσης τους για 12 συνεχείς μέρες, χρησιμοποιώντας τα δείγματα για ανακαλλιέργεια 10 ημερών.

#### 3.2.4.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάστηκαν οι υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* σύμφωνα με τη πρώτη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω. Έπειτα, σε ένα αποστειρωμένο πλαστικό φιαλίδιο τύπου falcon τοποθετήθηκαν 5ml θρεπτικού μέσου *Nutrient Broth* με 2% v/v δείγμα μελιού και εμβολιάστηκαν με 50μl από την υγρή καλλιέργεια της *Pseudomonas aeruginosa* που είχαν ετοιμαστεί πριν 24 ώρες και σε ένα άλλο falcon τοποθετήθηκαν αντίστοιχα 5ml θρεπτικού μέσου *Nutrient Broth* με 1% v/v δείγμα μελιού και εμβολιάστηκαν με 50μl από την υγρή καλλιέργεια του *Staphylococcus aureus*. Στη συνέχεια, τα falcon επώαστηκαν στους 37° C για 24 ώρες στις 210 στροφές/min.

Η μέθοδος αυτή πραγματοποιήθηκε για 12 διαδοχικές μέρες, με τη προσθήκη 50μl από την καλλιέργεια που αναπτύχθηκε στο falcon της προηγούμενης μέρας σε ένα νέο, το οποίο περιείχε το θρεπτικό μέσο NB και την αντίστοιχη συγκέντρωση δείγματος μελιού για κάθε βακτήριο αυξάνοντας τη συγκέντρωση κάθε μέρα κατά 0,5% v/v και για τα δύο βακτήρια.

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για την *Pseudomonas aeruginosa* σε 5 δείγματα μελιών και αντίστοιχα για τον *Staphylococcus aureus* σε 7, όπως και το μέλι Manuka και για τα δύο βακτήρια, σε δύο ανεξάρτητα πειράματα μέτρησης.

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση MIC για τα δείγματα όπως αναφέρθηκε παραπάνω ( 3.2.2.2 σελ 41)

Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν για το κάθε μέλι και για κάθε συγκέντρωση.

Έπειτα έγινε διερεύνηση της παροδικής ή μόνιμης φύσης της ανθεκτικότητας των βακτηρίων έναντι των μελιών μετά το τέλος της έκθεσης τους για 12 συνεχείς μέρες, χρησιμοποιώντας τα δείγματα για ανακαλλιέργεια 10 διαδοχικών ημερών χωρίς την παρουσία μελιού. Δηλαδή, σε ένα αποστειρωμένο πλαστικό φιαλίδιο τύπου falcon τοποθετήθηκαν 5ml θρεπτικού μέσου *Nutrient Broth* ενοφθαλμίζοντας με 50μl τη καλλιέργεια της *Pseudomonas aeruginosa* που είχε εκτεθεί σε σταθερές συγκεντρώσεις μελιού και σε ένα άλλο falcon τοποθετήθηκαν 5ml θρεπτικού μέσου *Nutrient Broth* ενοφθαλμίζοντας με 50μl τη καλλιέργεια του *Staphylococcus aureus* που είχε εκτεθεί σε σταθερές συγκεντρώσεις μελιού. Στη συνέχεια, τα falcon επωάστηκαν στους 37° C για 24 ώρες στις 210 στροφές/min.

Η ανακαλλιέργεια πραγματοποιήθηκε για 10 διαδοχικές μέρες, με τη προσθήκη μόνο των 50μl από την καλλιέργεια που αναπτύχθηκε στο falcon της προηγούμενης μέρας σε ένα νέο και του θρεπτικού μέσου *NB*.

Στο τέλος, προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση MIC για τα δείγματα όπως αναφέρθηκε παραπάνω ( 3.2.2.2 σελ 41)

## 4. Αποτελέσματα

### 4.1 Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*minimum inhibitory concentration*).

Προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση των μελιών, η οποία αναστέλλει πλήρως την ανάπτυξη των *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus*. Όπως παρατηρείται στον πίνακα 2 για την *Pseudomonas aeruginosa*, τα μέλια με Νο **19, 23, 30** έδωσαν την ίδια τιμή MIC με αυτή του Manuka 25+ (control) δηλαδή 25% v/v. Τα μέλια με Νο **14, 26** έδωσαν μικρότερη τιμή MIC από αυτή του Manuka, ίση με 12,5% v/v. Αντίστοιχα, για το *Staphylococcus aureus* τα μέλια με Νο **14, 19, 23, 26** έδωσαν την ίδια τιμή MIC με αυτή του Manuka 25+ δηλαδή 6,25% v/v, τα μέλια με Νο **10, 20, 30** έδωσαν μεγαλύτερη τιμή MIC οι οποίες είναι 25% v/v για τα δύο πρώτα και 12,5% v/v για το τελευταίο.

No Μέλι	Τύπος Μελιού	MIC Ps. aeruginosa	MIC S. aureus
10	Αγριοβότανα και θυμάρι	-	25% v/v
14	Ανθόμελο από Βούρικα	12,5% v/v	6,25% v/v
19	Ηλιάνθος	25% v/v	6,25% v/v
20	Πορτοκάλι: σχεδόν 80% από άνθη πορτοκαλιάς	-	25% v/v
23	Καστανιά με λίγο Πεύκο	25% v/v	6,25% v/v
26	Μέλι άνθεων: Άγρια ρίγανη και Άγριο τριφύλλι	12,5% v/v	6,25% v/v
30	Βελανιδιά	25% v/v	12,5% v/v
Manuka		25% v/v	6,25% v/v

**Πίνακας 2.** Αποτελέσματα μετρήσεων MIC έναντι της *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus*.

#### **4.2 Προσδιορισμός της ανθεκτικότητας βακτηρίων κλινικής σημασίας έναντι δειγμάτων μελιού, με βραχυπρόθεσμη έκθεση υπό σταθερές συγκεντρώσεις μελιού**

Προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση των μελιών μετά τη βραχυπρόθεσμη έκθεση των *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* σε σταθερές συγκεντρώσεις δειγμάτων μελιών.

Όπως παρατηρείται στον πίνακα 3, τα μέλια με Νο **23** και **Manuka** μετά τη βραχυπρόθεσμη έκθεση της *Pseudomonas aeruginosa* σε σταθερή συγκέντρωση μελιού, δεν έδωσαν διαφορετική τιμή MIC από αυτή που μετρήσαμε αρχικά (χωρίς κάποιος είδος έκθεσης στο μέλι). Άρα δεν υπάρχει ένδειξη ανθεκτικότητας της *Pseudomonas aeruginosa* ως προς αυτά τα μέλια.

Η έκθεση της *Pseudomonas aeruginosa* σε σταθερή συγκέντρωση των μελιών με Νο **14, 26** οδήγησε στη μόνιμη ανθεκτικότητα του βακτηρίου, καθώς αυξήθηκε η τιμή MIC και η οποία διατηρήθηκε και μετά το πέρας της ανακαλλιέργειας των 10 ημερών απουσία μελιού ενώ στα μέλια με Νο **19, 30** οδήγησε στην ευαισθητοποίηση της, καθώς παρατηρήθηκε μείωση της τιμής MIC σε σχέση με την αρχική. Η ευαισθητοποίηση αυτή, φαίνεται όμως να χάνεται καθώς η τιμή MIC, επανήλθε στα αρχικά επίπεδα μετά το τέλος της ανακαλλιέργειας των 10 ημερών απουσία μελιού.



No Μέλια	MIC <i>Ps. aeruginosa</i>	MIC με σταθερές συγκεντρώσεις μελιού	
		Έκθεση σε μέλι	Απουσία μελιού
<b>14</b>	12,5% v/v	25% v/v	25% v/v
<b>19</b>	25% v/v	12,5% v/v	25% v/v
<b>23</b>	25% v/v	25% v/v	25% v/v
<b>26</b>	12,5% v/v	12,5% v/v	25% v/v
<b>30</b>	25% v/v	12,5% v/v	25% v/v
<b>Manuka</b>	25% v/v	25% v/v	25% v/v

**Πίνακας 3.** Αποτελέσματα μετρήσεων MIC της *Pseudomonas aeruginosa* μετά τη βραχυπρόθεσμη έκθεση της σε σταθερές συγκεντρώσεις δειγμάτων μελιού και της παροδικής ή μόνιμης φύσης της ανθεκτικότητας της.

Αντίστοιχα για τον *Staphylococcus aureus* όπως παρατηρείται στον πίνακα 4, τα μέλια με No **10**, **20**, **23**, **30** και **Manuka** μετά τη βραχυπρόθεσμη έκθεση του σε σταθερή συγκέντρωση μελιού, δεν έδωσαν διαφορετική τιμή MIC από αυτή που μετρήσαμε αρχικά (χωρίς κάποιος είδος έκθεσης στο μέλι). Άρα δεν υπάρχει ένδειξη ανθεκτικότητας του *Staphylococcus aureus* ως προς αυτά τα μέλια.

Η έκθεση του *Staphylococcus aureus* σε σταθερή συγκέντρωση του μελιού με No **19** οδήγησε στην παροδική ανθεκτικότητα του, καθώς παρατηρήθηκε αύξηση της τιμής MIC σε σχέση με την αρχική η οποία φαίνεται όμως να χάνεται, καθώς η τιμή MIC, επανήλθε στα αρχικά επίπεδα μετά το τέλος της ανακαλλιέργειας των 10 ημερών απουσία μελιού ενώ παρατηρείται ότι το μέλι με No **14** οδήγησε στη μόνιμη ανθεκτικότητα του βακτηρίου, καθώς αυξήθηκε η τιμή MIC και η οποία διατηρήθηκε και μετά το πέρας της ανακαλλιέργειας των 10 ημερών απουσία μελιού.

No Μέλια	MIC <i>S. aureus</i>	MIC με σταθερές συγκεντρώσεις μελιού	
		Έκθεση σε μέλι	Απουσία μελιού
10	25% v/v	25% v/v	25% v/v
14	6,25% v/v	12,5% v/v	12,5% v/v
19	6,25% v/v	12,5% v/v	6,25% v/v
20	25% v/v	25% v/v	25% v/v
23	6,25% v/v	6,25% v/v	6,25% v/v
26	6,25% v/v	6,25% v/v	12,5% v/v
30	12,5% v/v	12,5% v/v	12,5% v/v
Manuka	6,25% v/v	6,25% v/v	6,25% v/v

**Πίνακας 4.** Αποτελέσματα μετρήσεων MIC του *Staphylococcus aureus* μετά τη βραχυπρόθεσμη έκθεση του σε σταθερές συγκεντρώσεις δειγμάτων μελιού και της παροδικής ή μόνιμης φύσης της ανθεκτικότητας του.

#### 4.3 Προσδιορισμός της ανθεκτικότητας βακτηρίων κλινικής σημασίας έναντι δειγμάτων μελιού, με βραχυπρόθεσμη έκθεση σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού

Προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση των μελιών μετά τη βραχυπρόθεσμη έκθεση των *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις δειγμάτων μελιών.

Όπως παρατηρείται στον πίνακα 5, τα μέλια με No **23** και **Manuka** μετά τη βραχυπρόθεσμη έκθεση της *Pseudomonas aeruginosa* σε σταδιακά αυξανόμενες

συγκεντρώσεις μελιού, δεν έδωσαν διαφορετική τιμή MIC από αυτή που μετρήσαμε αρχικά (χωρίς κάποιος είδος έκθεσης στο μέλι). Άρα δεν υπάρχει ένδειξη ανθεκτικότητας της *Pseudomonas aeruginosa* ως προς αυτά τα μέλια.

Η έκθεση της *Pseudomonas aeruginosa* σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις των μελιών με Νο **19, 30** οδήγησε στην ευαισθητοποίηση της, καθώς παρατηρήθηκε μείωση της τιμής MIC σε σχέση με την αρχική. Η ευαισθητοποίηση αυτή, φαίνεται όμως να χάνεται καθώς η τιμή MIC επανήλθε στα αρχικά επίπεδα μετά το τέλος της ανακαλλιέργειας των 10 ημερών απουσία μελιού.

No Μέλια	MIC Ps. aeruginosa	MIC με σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού	
		Έκθεση σε μέλι	Απουσία μελιού
<b>14</b>	12,5% v/v	12,5% v/v	25% v/v
<b>19</b>	25% v/v	12,5% v/v	25% v/v
<b>23</b>	25% v/v	25% v/v	25% v/v
<b>26</b>	12,5% v/v	12,5% v/v	25% v/v
<b>30</b>	25% v/v	12,5% v/v	25% v/v
<b>Manuka</b>	25% v/v	25% v/v	25% v/v

**Πίνακας 5.** Αποτελέσματα μετρήσεων MIC της *Pseudomonas aeruginosa* μετά τη βραχυπρόθεσμη έκθεση της σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού και της παροδικής ή μόνιμης φύσης της ανθεκτικότητας της.

Αντίστοιχα για τον *Staphylococcus aureus* όπως παρατηρείται στον πίνακα 6, τα μέλια με Νο **10, 20, 23, 30** και **Manuka** σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού, δεν έδωσαν διαφορετική τιμή MIC από αυτή που μετρήσαμε αρχικά (χωρίς κάποιος είδος έκθεσης σε μέλι). Άρα δεν υπάρχει ένδειξη ανθεκτικότητας του *Staphylococcus aureus* ως προς αυτά τα μέλια.

Η έκθεση του *Staphylococcus aureus* σε σταθερά αυξανόμενες συγκεντρώσεις του μελιού με Νο **14** οδήγησε στη παροδική ανθεκτικότητα του βακτηρίου, καθώς αυξήθηκε η τιμή MIC και η οποία φαίνεται όμως να χάνεται, καθώς η τιμή MIC επανήλθε στα αρχικά επίπεδα μετά το τέλος της ανακαλλιέργειας των 10 ημερών απουσία μελιού.

No Μέλια	MIC S. aureus	MIC με σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού	
		Έκθεση σε μέλι	Απουσία μελιού
<b>10</b>	25% v/v	25% v/v	25% v/v
<b>14</b>	6,25% v/v	12,5% v/v	6,25% v/v
<b>19</b>	6,25% v/v	6,25% v/v	12,5% v/v
<b>20</b>	25% v/v	25% v/v	25% v/v
<b>23</b>	6,25% v/v	6,25% v/v	6,25% v/v
<b>26</b>	6,25% v/v	12,5% v/v	25% v/v
<b>30</b>	12,5% v/v	12,5% v/v	12,5% v/v
<b>Manuka</b>	6,25% v/v	6,25% v/v	6,25% v/v

**Πίνακας 6.** Αποτελέσματα μετρήσεων MIC του *Staphylococcus aureus* μετά τη βραχυπρόθεσμη έκθεση της σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού και της παροδικής ή μόνιμης φύσης της ανθεκτικότητας της.

## 5. Συζήτηση

Η χρήση των αντιβιοτικών για την αντιμετώπιση λοιμώξεων οδήγησε στην εξάπλωση ανθεκτικών βακτηρίων με αποτέλεσμα να είναι αναγκαία όσο ποτέ η εύρεση εναλλακτικών θεραπειών. Η χρήση του μελιού αποτελεί μια τέτοια θεραπεία, καθώς βοηθά στην επούλωση πληγών, εγκαυμάτων και έχει γίνει ιδιαίτερα γνωστό για την αντιμικροβιακή του δράση (Alandejani et al., 2009, Wang et al., 2012). Συγκεκριμένα, πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η χρήση του μελιού ενάντια σε κλινικά απομονωμένα στελέχη του *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa*, θανάτωσε τα κύτταρα που ήταν σε ελεύθερη διαβίωση, σε όλα τα στελέχη που δοκιμάστηκαν (Alandejani et al., 2009). Αυτό που το καθιστά ιδιαίτερα σημαντικό είναι η ικανότητα του να σκοτώνει τα βακτήρια ακόμη και στην πιο ανθεκτική κατάσταση των βιοϋμένων τους, με αποτέλεσμα να αποδεικνύεται εξαιρετικά αποτελεσματικό στην αντιμετώπιση λοιμώξεων (Wang et al. 2012).

Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού οφείλεται κυρίως στο υπεροξείδιο του υδρογόνου (Kwakman et al., 2010, Molan, 1999), σε αντικροβιακές πρωτεΐνες ή ολιγοπεπτίδια και στη συγκέντρωση των σακχάρων του. Επιπλέον εξαρτάται από την φυτική πηγή από την οποία προέρχεται, από την γεωγραφική περιοχή της φυτικής πηγής, τις περιβαλλοντικές συνθήκες, οι οποίες επηρεάζουν τη φυτική πηγή ενώ συστατικά του μελιού, όπως αρωματικά οξέα ή φαινολικές ενώσεις και πρωτεΐνες συνεισφέρουν στην συνολική αντιμικροβιακή δραστηριότητα (Weston, 2000). Το μέλι Manuka έχει εγκριθεί για ιατρική χρήση σε επουλώσεις πληγών και έλκων λόγω της ισχυρής αντιμικροβιακής του δράσης. Η μονάδα μέτρησης UMF (Unique Manuka Factor) κατηγοριοποιεί το μέλι με βάση την αντιμικροβιακή του δύναμη, όσο πιο υψηλότερο επίπεδο, τόσο πιο αποδοτική είναι η αντισηπτική δράση του Manuka. Ο εντοπισμός της πηγής της βακτηριοκτόνου δράσεως του μελιού έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη μορίων όπως η μεθυλγλυοξάλη (Kwakman et al., 2010).

Ο προβληματισμός όμως που δημιουργείται είναι εάν η χρήση του μελιού ως εναλλακτική θεραπεία στην αντιμετώπιση ανθεκτικών βακτηρίων, οδηγήσει τελικά στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας ανάλογης με αυτή που παρουσιάζουν τα βακτήρια ενάντια στα αντιβιοτικά.

Στη συγκεκριμένη μελέτη έγινε διερεύνηση πιθανής ανθεκτικότητας κάποιων παθογόνων βακτηρίων και συγκεκριμένα ανθεκτικών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* έναντι της αντιβακτηριακής δράσης

Ελληνικών μελιών συγκρινόμενα με το μέλι *Manuka*. Με τη μέθοδο προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*minimum inhibitory concentration*) έγινε διερεύνηση της ανθεκτικότητας βακτηρίων κλινικής σημασίας έναντι δειγμάτων μελιού, με βραχυπρόθεσμη έκθεση υπό σταθερές συγκεντρώσεις μελιού και με σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μελιού για 12 συνεχείς μέρες και εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης των μελιών χωρίς κάποιος είδος έκθεσης των βακτηρίων στο μέλι. Έπειτα έγινε διερεύνηση της παροδικής ή μόνιμης φύσης της ανθεκτικότητας των κλινικών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* έναντι συγκεκριμένων μελιών μετά το τέλος της έκθεσης τους για 12 συνεχείς μέρες, χρησιμοποιώντας τα βακτήρια που εκτέθηκαν στο μέλι για ανακαλλιέργεια 10 ημερών απουσία μελιού. Οι μέθοδοι αυτοί στηρίζονται στην ικανότητα των μελιών να αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων και αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι η έκθεση των βακτηρίων στο μέλι συγκεντρώσεις στο μέλι οδήγησε σε τρεις κατηγορίες αποτελεσμάτων. Στην πρώτη κατηγορία δεν υπήρξε κάποια ένδειξη ανθεκτικότητας των βακτηρίων ως προς το μέλι από αγριοβότανα και θυμάρι (No 10), το μέλι από πορτοκάλι (No 20), το μέλι από καστανιά με λίγο πεύκο (No 23) και το μέλι *Manuka* και στα δύο βακτήρια. Στη δεύτερη κατηγορία παρατηρήθηκε μόνιμη ή παροδική ανθεκτικότητα των βακτηρίων στο μέλι ανθέων (No 14) και στο μέλι ανθέων από άγρια ρίγανη και άγριο τριφύλλι (No 26), λόγω αυξομείωσης της τιμής MIC σε σχέση με την αρχική χωρίς κάποιος είδος έκθεσης στο μέλι και η οποία διατηρήθηκε ή χάθηκε μετά το πέρας της ανακαλλιέργειας των 10 ημερών απουσία μελιού. Τέλος στη τρίτη κατηγορία παρατηρήθηκε με αρκετό ενδιαφέρον ότι η εκτεταμένη χρήση του μελιού από ηλιάνθο (No 19) και του μελιού από βελανιδιά (No 30) σε συγκεντρώσεις κάτω από τη τιμή MIC οδήγησε στην ευαισθητοποίηση της *Pseudomonas aeruginosa*, καθώς παρατηρήθηκε μείωση της τιμής MIC σε σχέση με την αρχική χωρίς κάποιος είδος έκθεσης στο μέλι. Η ευαισθητοποίηση αυτή, φαίνεται όμως να είναι παροδική καθώς η τιμή MIC, επανήλθε στα αρχικά επίπεδα μετά το τέλος της ανακαλλιέργειας των 10 ημερών απουσία μελιού.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη αποδεικνύει τα εξής: Α) Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι του μελιού είναι πιο πιθανή για την *Pseudomonas aeruginosa* και όχι τόσο για τον *Staphylococcus aureus*. Β) Είναι πολύ σημαντικό στην κλινική πρακτική η χρήση του μελιού να γίνεται στην σωστή συγκέντρωση (ίση ή και μεγαλύτερη της MIC) ώστε να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα ανθεκτικότητας. Γ) Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας βακτηριακών στελεχών είναι πιο πιθανή έναντι μελιών με

ισχυρή αντιβακτηριακή δράση (π.χ. μέλια No 14 και No 26) σε σχέση με μέλια μέτριας αντιμικροβιακής δράσης (π.χ. No 30). Εξαιρέση αποτελεί το μέλι Manuka για το οποίο δεν διαπιστώθηκε ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Δ) Τέλος με ενδιαφέρον παρατηρήθηκε ότι στο μέλι βελανιδιάς (No 30) και ηλίανθου (No 19) σε συγκεντρώσεις μικρότερες του MIC η *Pseudomonas aeruginosa* ανέπτυξε μια ευαισθησία.

## 6. Βιβλιογραφία

### Ελληνική

1. Δερματόπουλος Β.(1949) Βασικές γνώσεις σύγχρονης μελισσοκομίας. Έκδοση Μελισσοκομικού Συνεταιρισμού Θεσσαλονίκης. σελ. 40-41.
2. Δημητριάδης Κ. (2005). Μελίαμα. Περιοδική έκδοση επιστημονικού κέντρου μελισσοθεραπείας. Τεύχος 3. Φθινόπωρο-Χειμώνας 2005-2006. Σελ 14.
3. Ζερφυρίδης, Γ. (1998). Διατροφή του Ανθρώπου. Τέταρτη Έκδοση. Εκδόσεις Γιαχούδη. Θεσσαλονίκη, Ελλάδα.
4. Θρασυβούλου Α. και Μανίκης Ι.( 1990) Κατηγορίες Ελληνικού μελιού Μελισσοκομική Επιθεώρηση 4 (6): 158-160.
5. Θρασυβούλου Α. και Μανίκης Ι.( 1993) Η ταυτότητα του ελληνικού μελιού. Πρακτικά ημερίδας: Το μέλι. Δυνατότητες Πληρέστερης Εκμετάλλευσης της μέλισσας. Γερακινή Χαλκιδικής, 2 Οκτωβρίου, 1992. Γεωτεχνικό Επιμελητήριο Ελλάδας. Σελ 121-132.
6. Θρασυβούλου Ανδρέας, 2001 Πρακτική μελισσοκομία Θεσσαλονίκη pg.11-12, 25-26, 149-195.
7. Καϊλίδης Σ.Δ. (1965) *Monophlebus hellenicus* (Marchalina hellenica) Genn, Το μελισσοτροφικό έντομο της πεύκης, Δασικά χρονικά 81/82 (7-8): 1-16
8. Μπίκος Θ. (1991) Όλα για το μέλι. Έκδοση του ιδίου. σελ. 263-270.
9. Νικολόπουλος Α., Τεντολούρης Ν., Κωστάκη Μ., Κατσιλάμπρος Ν., 2006 Λοιμώξεις στο διαβητικό πόδι Archives of Hellenic Medicine 23(3):222-232
10. Σταθόπουλος Κ. (1993) Υγιεινή και διατροφική αξία του μελιού. Πρακτικά εκδήλωσης της επιτροπής προώθησης του Ελληνικού μελιού. Αθήνα
11. Τσέλλιος Δ. και Θρασυβούλου Α. (1989) Μελισσοκομικοί χειρισμοί και μελισσοκομικά φυτά 2(7-8): 208-210
12. Τυπάλδος – Ξυδιάς Α, 1979 Θάσος και Κασσάνδρα: οι μεγαλύτερες μελισσοκομικές περιφέρειες της Ελλάδας, Μελισσοκομική Ελλάς (29): 105-111
13. Υφαντίδης Μ. (1983) Μελισσοκομία, επιστήμη και εφαρμογή. Εκδόσεις Τσολακοπούλου, Θεσσαλονίκη. σελ. 56-67.



14. Υφαντίδης Δ. Μιχαήλ (2005) Η σύγχρονη μελισσοκομεία ως επιστήμη και πράξη pg.505-515
15. Χαριζάνης Π. (1989) Ευκάλυπτος, το δέντρο που υπόσχεται πολλά στη μελισσοκομεία, Μελισσοκομική Επιθεώρηση 3(3) 69-71
16. Χαριζάνης Π. (1996β) Ευκάλυπτος: ένα δέντρο με πολλά πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα, Μελισσοκομική Επιθεώρηση 10 (12) 487-489

### Ξενόγλωσση

1. Adams CJ, Manley-Harris M, Molan PC (2009). The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr Res* 344:1050-1053.
2. Adesunkanmi, K.; Oyelami, O. A. (1994) The pattern and outcome of burn injuries at Wesley Guild Hospital, Ilesha, Nigeria: a review of 156 cases. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 97(2): 108-112
3. Alandejani, T., Marsan, J., Ferris, W., Slinger, R. and Chan, F. (2009). Effectiveness of honey on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 141,114-118.
4. Allen KL, Molan PC, Reid GM (1991) A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *J Pharm Pharmacol* 43: 817–822
5. Al-Waili, N., Al Ghamdi, A., Javed Ansari, M., Al-Attal, Y., Al-Mubarak, A. and Salom, K. (2013). Differences in composition of honey samples and their impact on the antimicrobial activities against drug multiresistant bacteria and pathogenic fungi. *Archives of Medical Research* 44 (4), 307-316.
6. Annapoorani, A., Kalpana, B., Syed Musthafa, K., Karutha Pandian, S. and Veera Ravi, A. (2013). Antipathogenic potential of *Rhizophora* spp. against the quorum sensing mediated virulence factors production in drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Phytomedicine* 20 (11), 956-963.
7. Anthimidou, E. and Mossialos, D. (2012). Antibacterial Activity of Greek and Cypriot Honeys against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in Comparison to Manuka Honey. *Journal of Medicinal Food* 16 (1), 42-47.

8. Atkinson, S. and Williams, P. (2009). Quorum sensing and social networking in the microbial world. *Journal of the Royal Society Interface* 6 (40), 959-978.
9. Bartlett A.H. , K.G. Hulten (2010), *Staphylococcus aureus* pathogenesis: secretion systems, adhesins, and invasions *Pediatr Infect Dis J*, 29 pp. 860–861
10. Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 2008;46:344–9.
11. Carnwath, R., Graham, E., Reynolds, K. and Pollock, P. (2013). The antimicrobial activity of honey against common equine wound bacterial isolates.
12. Cavalca L., Di Gennaro P., Colombo M., Andreoni V., Bernasconi S., Ronco I. and Bestetti G. (2000). Distribution of catabolic pathways in some hydrocarbon-degrading bacteria from a subsurface polluted soil. *Res. Microbiol.*, 151: 877 – 887.
13. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D, Fridkin SK. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Investigative Team. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *N Engl J Med*.2003;348:1342–1347.
14. Cooper RA and Molan PC , 1999 The use of honey as an antiseptic in managing *Pseudomonas* infection. *J. Wound Care* 8 (4) 161-164
15. Cooper, R., Molan, P. and Harding, K. (2002). The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *Journal of Applied Microbiology* 93, 857-863.
16. dos Santos NS, Athayde Aguiar AJ, de Oliveira CE, Verissimo de Sales C, de Melo E Silva S, Sousa da Silva R, Stamford TC, de Souza EL. *Food Microbiol*. 2012 Dec;32(2):345-53. doi: 10.1016/j.fm.2012.07.014. Epub 2012 Aug 7. Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.).
17. Dustmann J.H, 1979 Antibacterial effect of honey. *Apiacta* 14
18. Efem, S. (1988). Clinical observations on the wound healing dressing with pure natural honey. *British Journal of Surgery* 75, 679-681.

19. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG (2002), The evolutionary history of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Proc Natl Acad Sci USA;99:7687-7692
20. Fatholahzadeh B, Emaneini M, Feizabadi MM, et al. Characterisation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from two hospitals in Tehran, Iran. Int J Antimicrob Agents. 2009;33:264–5.
21. Feás X, Estevinho ML. (2011) J Med Food. A survey of the in vitro antifungal activity of heather (*Erica* sp.) organic honey, Oct;14(10):1284-8. doi: 10.1089/jmf.2010.0211. Epub 2011 Jun 11.
22. Fito-Boncompte Laurene, Chapalain Annelise, Bouffartigues Emeline, Chaker Hichem, Lesouhaitier Olivier, Gicquel Gwendoline, Bazire Alexis, Madi Amar, Connil Nathalie, Veron Wilfried, Taupin Laure, Toussaint Bertrand, Cornelis Pierre, Wei Qing, Shioya Koki, Deziel Eric, Feuilloley Marc G. J., Orange Nicole, Dufour Alain, Chevalier Sylvie (2011). Full Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Requires OprF. Infect. Immun., 79(3): 1176
23. Fridkin S.K., J.C. Hageman, M. Morrison, L.T. Sanza, K. Como-Sabetti, J.A. Jernigan, K. Harriman, L.H. Harrison, R. Lynfield, M.M. Farley (2005), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities N Engl J Med, 352 pp. 1436–1444
24. Herold B.C. (1970), Heilwerte aus dem Bienenvolk, Θεραπευτικές αξίες από το μέλισσι Munchen
25. Herold B.C. , L.C. Immergluck, M.C. Maranan, D.S. Lauderdale, R.E. Gaskin, S. Boyle-Vavra, C.D. Leitch, R.S. Daum (1998), Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk JAMA, 279 pp. 593–598
26. Hiramitsu K. (1995), Molecular evolution of MRSA. Microbiol Immunol; 39:531-543
27. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother. 1997;40:135–136.
28. Jevons MP (1961), 'Celbenin'-resistant staphylococci. BMJ. ;1:124–125.

29. Joirisch N.P. (1970) Curative properties of honey and bee renom. Foreign languages Publishing House. Μετάφραση στα ελληνικά Ν. Τοπαλίδης (Μελισσοκομική Ελλάς) (20) : 42-43, (231) : 84-86, (232) : 115-117, 146-148.
30. Karadzic I., Masui A., Zivkovic L.I., Fujiwara N. (2006). Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil as component of metalworking fluid. J. Biosc. Bioeng. 102: 82 – 89.
31. Kimata N., Nishino T., Suzuki S., Kogure K. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* isolated from marine environments in Tokyo Bay. Microb. Ecol. 47: 41 – 47.
32. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, et al. (2007) Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA. ;298(15):1763–1771. French
33. Kwakman, P., Van Den Akker, J., Güçlü, A., Aslami, H., Binnekade, J., De Boer, L., Boszhard, L. et al. (2008). Medical-grade honey kills antibiotic-resistant bacteria in vitro and eradicates skin colonization. Clinical Infectious Diseases 46 (11), 1677-1682.
34. Kwakman, P., te Velde, A., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, C. and Zaat, S. (2010). How honey kills bacteria. The FASEB Journal 24 (7), 2576-2582.
35. Larson, Jennifer (2001) Greek Nymphs : Myth, Cult, Lore. Oxford University Press pp. 88.
36. Manwar, A., Khandelwal, S., Chaudhari, B., Meyer, J. and Chincholkar, S. (2004). Siderophore production by a Marine *Pseudomonas aeruginosa* and its antagonistic action against phytopathogenic fungi. Applied Biochemistry and Biotechnology 118 (1-3), 243-251.
37. Mavric E, Wittmann S, Barth G, Henle T. (2008), Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. Mol Nutr Food Res 52: 483–489
38. Molan P (1992), The antibacterial nature of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. Bee World, 73(1):5-28

39. Molan, P.C. (1992a), The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World* 73 (1), 5 – 28. Molan, P.C., 1992b. The antibacterial activity of honey: 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. *Bee World* 73 (2), 59– 76.
40. Molan P (1998), A brief review of the use of honey as a clinical dressing. *Australian J of Management*; 6:148–158
41. Molan, P.C. (1999a), The role of honey in the management of wounds. *Journal of Wound Care* 8 (8): 423-426
42. Molan, P.C. (1999b), Why honey is effective as a medicine. 1. Its use in modern medicine. *Bee World* 80 (2): 80-92
43. Mossialos, D. and Amoutzias, G. (2007). Siderophores in fluorescent pseudomonas: new tricks from an old dog. *Future Microbiology* 2 (4), 387-395.
44. Mossialos, D. and Amoutzias, G. (2009). Role of siderophores in cystic fibrosis pathogenesis: Foes or friends? *International Journal of Medical Microbiology* 299 (2), 87-98.
45. Mundo, M.A., Padilla-Zakour, O.I., Worobo, R.W. (2004), Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *International Journal of Food Microbiology* 97, 1–8
46. Naimi T.S., K.H. LeDell, K. Como-Sabeti, S.M. Borchardt, D.J. Boxrud, J. Etienne, S.K. Johnson, F. Vandenesch, S. Fridkin, C. O’Boyle et al. (2003), Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection *JAMA*, 290 pp. 2976–2984
47. National Honey Board Carbohydrates and the sweetness of honey (2010).
48. Ndayisaba, G., Bazira, L., Habonimana, E., Muteganya, D. (1993), Clinical and bacteriological results in wound treated with honey. *Journal of Orthopedic Surgery* 7 (2): 202-204
49. Olaitan, P., Adeleke, O. and Ola, I. (2007). Honey: A reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences* 7 (3), 159-165.
50. Otto M. (2010), Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* *Annu Rev Microbiol*, 64 pp. 143–162.

51. Pellett S., Bigley D.V., Grimes D.J. (1983). Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in a riverine ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 328 – 332.
52. Ramirez MS, Tolmasky ME. (2010), Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates.*;13:151–71.
53. Santas L. (1983), Insects producing honeydew exploited by bees in Greece. *Apidologie* 14(2):93-103.
54. Schindler BD, Jacinto P, Kaatz GW. (2013) Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: current status of potentiating existing antibiotics. *Future Microbiol.* Apr;8(4):491-507.
55. Schwartz T., Volkmann H., Kirchen S., Kohnen W. Schon-Holz K., Jansen B., Obst U. (2006). Real-time PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical and municipal wastewater and genotyping of the ciprofloxacin-resistant isolates. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 57: 158 – 167.
56. Seeley T.D. (1985) Honeybee ecology. Princeton University Press, USA.
57. Serrano-Díaz J, Sánchez AM, Maggi L, Martínez-Tomé M, García-Diz L, Murcia MA, Alonso GL. (2012), Increasing the applications of *Crocus sativus* flowers as natural antioxidants *J Food Sci.* Nov;77(11):C1162-8. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02926.x. Epub 2012 Oct 11.
58. Sherlock, O., Dolan, A., Athman, R., Power, A., Gethin, G., Cowman, S. and Humphreys, H. (2010). Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Complementary and Alternative Medicine* 10 (47), 1-5.
59. Smith, R. and Iglewski, B. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *Journal of Clinical Investigation* 112 (10), 1460–1465.
60. Styers D, Sheehan DJ, Hogan P, Sahn DF. (2006), Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*: 2005 status in the United States. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*;5:2.
61. Taormina, P., Niemira, B. and Beuchat, L. (2001). Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen

- peroxide and level of antioxidant power. *International Journal of Food Microbiology* 69, 217-225.
62. The Veterinary Journal <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.07.003> (Article in press).
  63. Thomas Patton, John Barrett, James Brennan, Noel Moran (2005), Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey, Institute of technology Sligo, IT Sligo, Ballinode, Sligo, Ireland 64(1):84-95
  64. Wang, R., Starkey, M., Hazan, R. and Rahme, L. (2012). Honey's ability to counter bacterial infections arises from both bactericidal compounds and QS inhibition. *Frontiers in Microbiology* 3 (144), 1-8.
  65. Weston, R. (2000). The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chemistry* 71 (2), 235-239.
  66. White J.W. 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.
  67. White J.W. Jr. (1993), Honey, in the hive and the honey bee, Dadant and Sons Publication Hamilton- Illinois p.p. 869-895
  68. Wilkins A.L., Yinrong L. (1993) Extractable organic substances from New Zeland Unifloral Manuka (*Leptospermum Scoparium*) Honey *Journal of Apicultural Research* 32(1) : 3-9.
  69. Winston L Mark (1987), *The Biology of the honey bee*, Harvard University Press Cambridge Massachusetts London England p.p.281
  70. Wolfgang M.C., Kulasekara B.R., Liang X., Boyd D., Wu K., Yang Q. (2003). Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci., U S A*, 100: 8484 – 8489.
  71. Yeterian, E., Martin, L., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I. and Schalk, I. (2010). Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino Acids* 38 (5), 1447-1459.
  72. Zanber E., Maurizio A. (1984), *Der Honig ulmer Verlag Stuttgart*
  73. Zumla and Lulat (1989), Honey- a remedy rediscovered, *Journal of the Royal Society of Medicine* 82, 384-385

## Διαδίκτυο

1. [www.microbeworld.org](http://www.microbeworld.org)
2. <http://www.healthyfoodhouse.com/the-amazing-benefits-of-honey/>
3. <http://biohoneyquality.wordpress.com/>
4. [www.waterscan.rs](http://www.waterscan.rs)
5. <http://www.greek-islands.us>
6. <http://el.wikipedia.org>
7. <http://grypasbees.blogspot.gr>
8. <http://epikuros-epikuros.blogspot.gr>
9. [www.bioathens.com](http://www.bioathens.com)
10. [www.protypafytoria.gr](http://www.protypafytoria.gr)
11. <http://igiortitoudentrou.blogspot.gr>
12. <http://melissomania.blogspot.gr/>