

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕΛΙΩΝ ΤΗΣ
ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΟΛΥΜΠΟΥ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΘΕΤΙΚΟΥ ΚΑΤΑ
GRAM ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *Staphylococcus aureus***

ΑΡΒΑΝΙΤΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2014

**Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης μελιών της περιοχής του Ολύμπου
έναντι του θετικού κατά Gram βακτηρίου *Staphylococcus aureus*.**

**(Studies on antimicrobial activity of honeys from Olympus area against
Gram positive bacteria *Staphylococcus aureus*)**

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Μόσιαλος Δημήτριος: Επίκουρος καθηγητής Βιοτεχνολογίας μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

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

Καρπούζας Δημήτριος: Επίκουρος καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Θερμά ευχαριστώ τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ.Μόσιαλο Δημήτριο για την ευκαιρία που μου έδωσε, συμπεριλαμβάνοντάς με στην επιστημονική του ομάδα, να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα διευρύνοντας τους επιστημονικούς μου ορίζοντες.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω και τα μέλη της επιτροπής, τον κ.Μαρκουλάτο Παναγιώτη και τον κ.Καρπούζα Δημήτριο.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στα υπόλοιπα μέλη της επιστημονικής ομάδας του εργαστηρίου για την άριστη συνεργασία που αναπτύχθηκε. Επίσης ευχαριστώ την οικογένειά μου και την κ Νικολούλη Κατερίνα για την στήριξή τους όλο αυτό τον καιρό.

Περιεχόμενα

| | |
|--|-----------|
| Περίληψη | 7 |
| Abstract | 9 |
| 1. Εισαγωγή | 10 |
| 1.1 Τι είναι μέλι | 10 |
| 1.1.1 Είδη μελιού | 12 |
| 1.1.2 Διατροφική αξία του μελιού | 18 |
| 1.1.3 Ιστορική αναδρομή της χρήσης του μελιού ως αντιμικροβιακή ουσία | 19 |
| 1.1.4 Το μέλι ως αντιμικροβιακός παράγοντας | 20 |
| 1.1.5 Ευεργετικές ιδιότητες του μελιού στον άνθρωπο | 23 |
| 1.2 <i>Staphylococcus aureus</i> | 25 |
| 1.3 Το καλύτερο αντιμικροβιακό μέλι παγκοσμίως: μέλι Manuka | 26 |
| 1.4 Σκοπός της παρούσας μελέτης | 28 |
| 2.Υλικά και μέθοδοι | 28 |
| 2.1 Υλικά | 28 |
| 2.1.1 Δείγματα μελιών ως προς εξέταση | 29 |
| 2.2 Πειραματικές μέθοδοι | 30 |
| 2.2.1 Εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης των μελιών με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια(<i>wells diffusion method</i>) | 31 |
| 2.2.1.1 Αρχή της μεθόδου/Πειραματική διαδικασία | 31 |
| 2.2.2 Εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των δειγμάτων μελιού μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης(<i>Minimum Inhibitory Concentration, MIC</i>)με τη χρήση πλακών μικροτιτλοδότησης(<i>microtiter plates</i>). | 32 |
| 2.2.2.1 Αρχή της μεθόδου | 32 |
| 2.2.2.2 Πειραματική διαδικασία | 33 |

| | |
|--|----|
| 2.2.3 Εκτίμηση των μηχανισμών της αντιμικροβιακής δράσης των μελιών μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (<i>Minimum Inhibitory Concentration M.I.C</i>) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοδότησης (<i>microtiter plates</i>) με τη προσθήκη 2 ενζύμων α) καταλάσης και β) πρωτεΐνάσης K. | 35 |
| 2.2.3.1 Αρχή της μεθόδου | 36 |
| 2.2.3.2 Πειραματική διαδικασία | 36 |
| 3. Αποτελέσματα των πειραμάτων | |
| 3.1 Εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης των μελιών με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ (<i>well diffusion method</i>) με πηγαδάκια | 38 |
| 3.2 Εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης των μελιών με τη μέθοδο προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (<i>Minimum Inhibitory Concentration, M.I.C</i>). | 40 |
| 3.3 Εκτίμηση των μηχανισμών της αντιμικροβιακής δράσης των μελιών μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (<i>Minimum Inhibitory Concentration, M.I.C</i>) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοδότησης (<i>microtiter plates</i>) με τη προσθήκη 2 ενζύμων: α) καταλάσης και β) πρωτεΐνάσης K. | 43 |
| 4. Συζήτηση | 45 |
| 5. Βιβλιογραφία | 48 |

Περίληψη

Σήμερα πολλοί αντιμικροβιακοί παράγοντες είναι ουσιαστικά σημαντικοί στο να μειώνουν πολλές επιβαρυντικές για τον ανθρώπινο οργανισμό μολυσματικές ασθένειες. Ωστόσο όσο ανθεκτικές μορφές παθογόνων αναπτύσσονται και εξαπλώνονται, η αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών είναι μειωμένη. Αυτό το είδος της βακτηριακής αντοχής στους αντιμικροβιακούς παράγοντες αποτελεί μια πολύ σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία, και για όλα τα είδη των αντιβιοτικών, οι συχνότητες αυξάνονται σε παγκόσμιο επίπεδο. Ως εκ τούτου, εναλλακτικές αντιμικροβιακές στρατηγικές απαιτούνται επείγοντως, και συνεπώς η κατάσταση αυτή έχει οδηγήσει σε μια επαναξιολόγηση της θεραπευτικής χρήσης αρχαίων θεραπειών, όπως φυτών και προϊόντων αυτών, συμπεριλαμβανομένων και το μέλι. Η χρήση της παραδοσιακής ιατρικής για τη θεραπεία των λοιμώξεων έχει ασκηθεί από την προέλευση της ανθρωπότητας, και το μέλι που παράγεται από το είδος *Apis mellifera* είναι ένα από τα παλαιότερα παραδοσιακά φάρμακα που θεωρούνται σημαντικά στην θεραπεία πολλών ανθρώπινων παθήσεων (Mandal et al 2011). Στη παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν δώδεκα δείγματα μελιού από την ευρύτερη περιοχή του Ολύμπου ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν την ανάπτυξη του θετικά κατά Gram βακτηρίου *Staphylococcus aureus*. Επιπλέον διερευνήθηκαν και οι πιθανοί μηχανισμοί που συμβάλλουν στην αντιβακτηριακή τους δράση. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν και συγκρίθηκαν με το μέλι Manuka 25+, το καλύτερο αντιμικροβιακό μέλι παγκοσμίως και ένα τεχνητό μέλι του εργαστηρίου.

Για την εκτίμηση της αντιβακτηριακής ικανότητας των μελιών έναντι του *S. aureus* χρησιμοποιήθηκαν δύο in vitro μέθοδοι: α) η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (well diffusion method) και β) η μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration, M.I.C) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοδότησης (microtiter plates). Για την διερεύνηση των πιθανών μηχανισμών της αντιβακτηριακής δράσης των μελιών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration, M.I.C) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοδότησης (microtiter plates) με τη προσθήκη δύο ενζύμων: α) καταλάσης και β) πρωτεϊνάσης. Η καταλάση διασπά το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), ενώ η πρωτεϊνάση Κ διασπά ολιγοπεπτίδια ή πρωτεΐνες που εμφανίζουν αντιβακτηριακή δράση.

Από τη πρώτη in vitro μέθοδο παρατηρήσαμε πως όλα τα μέλια εμφάνισαν αντιβακτηριακή δράση εναντίον του *S. aureus*. Συγκεκριμένα 3 από τα 12 δείγματα μελιών εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερη ζώνη αναστολής σε σχέση με το μέλι Manuka 25+. Από τη δεύτερη μέθοδο παρατηρήσαμε πως 3 από τα

12 συνολικά δείγματα μελιών εμφάνισαν μικρότερη ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση(3,125%v/v) σε σχέση με το μέλι Manuka25+(6,25%v/v).

Στη τρίτη και τελευταία μέθοδο, για τη διερεύνηση των μηχανισμών της αντιβακτηριακής δράσης των μελιών της περιοχής του Ολύμπου, παρατηρήσαμε πως με τη προσθήκη της καταλάσης όλα τα δείγματα εμφάνισαν αύξηση της ελάχιστης ανασταλτικής του συγκέντρωσης, πράγμα το οποίο σημαίνει πως η αντιβακτηριακή δράση των μελιών έναντι του *S.aureus* οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου(H_2O_2), ενώ με τη προσθήκη της πρωτεΐνης K, μόνο 2 από τα 12 δείγματα μελιού εμφάνισαν αύξηση της ελάχιστης ανασταλτικής τους συγκέντρωσης, πράγμα το οποίο σημαίνει πως η αντιβακτηριακή δράση των μελιών αυτών έναντι του *S.aureus* οφείλεται στην παραγωγή ολιγοπεπτιδίων ή αντιβακτηριακών πρωτεϊνών.

Abstract

Nowadays many antimicrobial agents are important to substantially reduce many aggravating for the human organism infectious diseases. However as resistant forms pathogens grow and spread, the effectiveness of antibiotics is reduced. This type of bacterial resistance to antimicrobial agents is a very serious threat to public health, and for all kinds of antibiotics, the frequencies increased globally. Therefore, alternative antimicrobial strategies are urgently required, and therefore the situation has led to a reassessment of the therapeutic use of ancient treatments, such as plants and their products, including honey. The use of traditional medicine for the treatment of infections brought by the origin of mankind, and the honey produced by *Apis mellifera* species is one of the oldest traditional medicines that are important in the treatment of many human diseases (Mandal et al 2011) .In present study, twelve samples of honey from the region of Olympus were tested for their ability to inhibit the growth of Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*. Moreover were investigated and possible mechanisms that contribute to the antibacterial activity. All samples were tested and compared with honey Manuka 25+, the best antimicrobial honey world and an artificial honey of the laboratory.

To evaluate the antibacterial ability of the honeys against *S.aureus* were used two in vitro methods: a) the method of diffusion in agar wells (well diffusion method) and b) the method of determining the minimum inhibitory concentration (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) using microtiter plates (microtiter plates). To investigate the possible mechanisms of the antibacterial activity of the honeys were used the method of determining the minimum inhibitory concentration (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) using microtiter plates (microtiter plates) with the addition of two enzymes: a) catalase, and b) proteinase K. The catalase breaks down the hydrogen peroxide (H_2O_2), and proteinase K breaks down oligopeptides or proteins showing antibacterial activity.

From the first in vitro method we observed that all honeys showed antibacterial activity against *S.aureus*. In particular three of the 12 samples of honey showed statistically significantly greater zone of inhibition compared with honey Manuka 25+. From the second method we observed that three of the total of 12 honey samples showed lower minimum inhibitory concentration (3,125% v/v) in relation to honey Manuka25 + (6,25%v/v).

In third and last method, for investigating the mechanisms of the antibacterial action of honeys in the region of Olympus, we observed that with the addition of catalase all samples showed an increase of the minimum inhibitory concentration, which means that the antibacterial activity of honeys against *S.aureus* is largely caused by the production of hydrogen peroxide (H_2O_2), and by the addition of proteinase K, only 2 of the 12 samples of honey showed increase of the minimum inhibitory concentration, which means that the antibacterial activity of those honeys against *S.aureus* is caused by the production of antibacterial proteins or oligopeptides.

1.Εισαγωγή

1.1 Τι είναι μέλι

Σύμφωνα με τη Νομοθεσία, μέλι είναι η φυσική γλυκιά ουσία που παράγουν οι Μέλισσες του γένους *Apis Mellifera* από το νέκταρ των φυτών ή εκκρίσεις από ζωντανά μέρη των φυτών ή εκκρίματα εντόμων που οι μέλισσες συλλέγουν, μεταποιούν και εμπλουτίζουν με δικές τους ουσίες που συντελούν στη μετατροπή του, αποθέτουν, αφυδατώνουν, αποθηκεύουν και το φυλάσσουν στις κηρήθρες της κυψέλης προκειμένου να ωριμάσει.
(www.melissoktima.blogspot.gr)

Οι μέλισσες απορροφούν όλο το νέκταρ των ανθών και το αποθηκεύουν στον πρόλοβο, ένα είδος κύστης, που βρίσκεται πριν το κυρίως στομάχι. Μέσα εκεί το νέκταρ, που είναι αραιή ζαχαρώδης διάλυση, δέχεται την επίδραση του πεπτικού υγρού της μέλισσας. Όταν αυτή επιστρέψει στην κυψέλη, εναποθέτει το νέκταρ στα κελιά των κηρυθρών και στη συνέχεια άλλες μέλισσες, οι ανεμίστρες, δημιουργούν με τα φτερά τους ισχυρό ρεύμα αέρα, με αποτέλεσμα να προκαλούν την εξάτμιση του μεγαλύτερου μέρους του νερού που περιέχει. Όταν το μέλι συμπυκνωθεί τόσο ώστε να μπορεί να διατηρηθεί αναλλοίωτο και να μην απορροφά υγρασία, οι μέλισσες σφραγίζουν τα κελιά με ένα λεπτό κάλυμμα κεριοϋ(www.kynigos.net.gr). Αυτή η μετατροπή του νέκταρ σε μέλι γίνεται με τη προσθήκη ενζύμων από τους σιελογόνους και τους 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. Στις μεγαλύτερης ηλικίας εργάτριες συρρικνώνονται και παράγουν το ένζυμο ιμβερτάση, που είναι απαραίτητο για τη μετατροπή του νέκταρος σε μέλι και το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης, που μετατρέπει τη γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ (Zander and Maurizio 1984; White 1993). Η μέση εργάτρια μέλισσα παράγει το 1/12 από ένα κουταλάκι του γλυκού μέλι στη διάρκεια ζωής της. Οι μέλισσες πρέπει να επισκευτούν περίπου 4 εκατομμύρια λουλούδια για τη παραγωγή ενός κιλού μελιού. Η μέση εργάτρια μέλισσα επισκέπτεται περισσότερα από 2000 λουλούδια μια καλή μέρα (50 έως 100 λουλούδια κατά τη διάρκεια μιας πτήσης συλλογής) ώσπου να γεμίσει ο πρόλοβός της με νέκταρ και να γυρίσει στη κυψέλη (www.omse.gr).

Το μέλι είναι προϊόν όξινης αντίδρασης, ρευστό στην αρχική μορφή του αλλά μεταβάλλεται σε κρυσταλλικό όταν μείνει για πολύ καιρό. Η κυρίαρχη χημική μετατροπή (μεταβολισμός) του φυτικού χυμού όταν αυτός γίνεται μέλι είναι η αποδόμηση του διζακχαρίτη σουκρόζη (της κοινής ζάχαρης) στα άμεσα αφομοιώσιμα μονοσάκχαρα της γλυκόζης (δεξτρόζης) και φρουκτόζης (λεβουλόζης). Πέρα από την λεβουλόζη που είναι ο επικρατέστερος υδατάνθρακας, υπάρχουν και πιο σύνθετοι υδατάνθρακες, ανόργανες ουσίες, φυτικά χρωστικά υλικά, μερικά ένζυμα και κόκκοι γύρεως (www.el.wikipedia.org).

Η μελέτη των συστατικών του μελιού σε συσχέτισμό με πληροφορίες για τη βοτανική και γεωγραφική του προέλευση αλλά και άλλες παραμέτρους, μπορεί να εξηγήσει τις αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα και διαμορφώνουν τα φυσικοχημικά του χαρακτηριστικά. Οι φυσικές ιδιότητες του μελιού είναι μια σειρά χαρακτηριστικών ιδιοτήτων που αποκτά το μέλι όταν είναι πλέον ώριμο, οι οποίες δύνανται να τροποποιηθούν κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής του. Μερικές από αυτές είναι το χρώμα, το άρωμα και η γεύση του, η κρυστάλλωση, η ζύμωση, η υγροσκοπικότητα, το ιξώδες και η πυκνότητα, η αντιμικροβιακή του δράση κ.α. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του μελιού σχετίζονται άμεσα με τα οργανοληπτικά του (γεύση, χρώμα, άρωμα, ρευστότητα). Οι αρωματικές (διάφορα τερπένια) και οι χρωστικές ουσίες του φυτικού χυμού δεν μεταβολίζονται. Το μέλι απλά εμπλουτίζεται και με το άρωμα των οργανικών οξέων από τη διάσπαση της γλυκόζης. Επίσης το μέλι 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. Η σύσταση και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του μελιού, είναι από τις σημαντικότερες παραμέτρους που συμβάλουν στον ορισμό της ταυτότητας ενός μελιού. Όσο καλύτερα γνωρίζουμε την σύσταση και τις φυσικοχημικές ιδιότητες ενός μελιού, τόσο ευκολότερα μπορούμε να εξάγουμε συμπεράσματα για τα οργανοληπτικά, τα μικροσκοπικά

χαρακτηριστικά του και την ακριβή προέλευσή του και να το εντάξουμε στην σωστή ποιοτική ομάδα.

Ο μεταβολισμός των ζαχάρων 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 αξία της μέλισσας και των προϊόντων της είναι αναγνωρισμένη από όλους τους επιστημονικούς φορείς που σχετίζονται με τη μελέτη και την έρευνα για τη διατροφή και την υγεία του ανθρώπου, ενώ η συνεισφορά της στην γεωργία και την οικολογία είναι πραγματικά ανυπολόγιστη. Από τις εμπειρικές μεθόδους αξιολόγησης της μελισσοκομίας και των παραγόμενων προϊόντων, βρισκόμαστε σήμερα στην διενέργεια επιστημονικών μελετών, πειραμάτων και υπολογισμών ακριβείας, όλων των παραμέτρων που συνιστούν την μοναδικότητα της συνεισφοράς του εντόμου της μέλισσας στη βιολογική αλυσίδα και του μελιού στη διατροφική αλυσίδα του ανθρώπου και στην αγροτική παραγωγή μιας χώρας (www.nefeli.lib.teicrete.gr).

1.1.1 Είδη μελιού

Υπάρχουν 2 κατηγορίες μελιού: Το **ανθόμελο** που παράγεται από το νέκταρ των λουλουδιών και το **μέλι των μελιτωμάτων** που παράγεται από το χυμό του πεύκου, της ελάτης, και άλλων δασικών φυτών.

Μέλι μελιτωμάτων: Οι εδαφοκλιματολογικές συνθήκες της Ελλάδας ευνοούν την ανάπτυξη του εντόμου *Marchalina hellenica* (κοινώς βαμβακάδα,ή εργάτης) το οποίο παρασιτεί στα πεύκα και εκκρίνει μελίτωμα. Οι μελιτώδεις εκκρίσεις συλλέγονται από τις μέλισσες, μεταποιοούνται και αποθηκεύονται ως μέλι. Η μεγαλύτερη παραγωγή μελιού στην Ελλάδα (περίπου 60-65%) προέρχεται από τις μελιτώδεις εκκρίσεις του «εργάτη» και το μέλι που παράγεται είναι γνωστό ως πευκόμελο.

Το ακμαίο θηλυκό του εργάτη γεννά 200-300 περίπου αυγά σε διάστημα 3-4 ημερών, τον Απρίλιο(Νικολόπουλος 1965). Από τα αυγά αυτά εκκολάπτονται μετά από 15-20 ημέρες οι προνύμφες πρώτου σταδίου, οι οποίες ψάχνουν αμέσως και βρίσκουν θέσεις προσήλωσης στο φλοιό του πεύκου. Στις θέσεις αυτές το έντομο εκκρίνει μια βαμβακώδη, κηρώδη ουσία, με την οποία καλύπτεται, έτσι ώστε να προστατευτεί από τους φυσικούς του εχθρούς και τις δυσμενείς συνθήκες του περιβάλλοντος.

Η περίοδος που παράγονται οι μελιτώδεις εκκρίσεις είναι σταθερή από έτος σε έτος και μπορεί να προβλεφθεί με σχετική ακρίβεια.

Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή μελιτωμάτων: Η παραγωγή μελιτωμάτων γνωστή ως «βάρεμα του εργάτη» επηρεάζεται από το μέγεθος (ηλικία) του εντόμου, τη ζωτικότητα του δέντρου, τις κλιματολογικές συνθήκες και το είδος του πεύκου στο οποίο παρασιτεί το έντομο(Καϊλίδης 1965).

Όσο ο εργάτης είναι μικρότερος σε μέγεθος τόσο μικρότερη ποσότητα τροφών λαμβάνει και τόσο λιγότερα μελιτώματα παράγει. Στην περίοδο των αλλαγών του δέρματος (εκδύσεων) καθώς επίσης και όταν ενηλικιωθεί, το έντομο δεν τρέφεται και δεν παράγει μελίτωμα.

Υψηλές θερμοκρασίες και μεγάλη ξηρασία έχουν ως αποτέλεσμα να λιγοστεύουν τα μελιτώματα, ενώ αντίθετα μέτριες θερμοκρασίες με δροσερό καιρό ευνοούν την κυκλοφορία των χυμών του πεύκου και την άφθονη παραγωγή μελιτοεκκρίσεων.

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

Τα διάφορα είδη μελιού διακρίνονται ανάλογα με το φυτό από όπου άντλησαν οι μέλισσες το νέκταρ (θυμαρίσιο, ελάτου, ανθέων), από την περιοχή προέλευσης και τον τρόπο παραλαβής του από τις κηρύθρες.

Το χρώμα του μελιού ποικίλλει από σχεδόν άχρωμο έως καφέ σκούρο. Ως προς τη σύσταση, μπορεί να είναι ρευστό, παχύρρευστο ή μη, μερικά ή ολικά κρυσταλλωμένο. Η γεύση και το άρωμα ποικίλουν, αλλά εξαρτώνται από τη φυτική προέλευση. Κάθε κατηγορία έχει τις εξής ιδιομορφίες που την κάνει να ξεχωρίζει απ' όλες τις άλλες:



Εικ.1 θυμάρι - *thymus* sp(νέκταρ):Έντονα αρωματικό μέλι, εξαιρετικά ευχάριστο στη γεύση με ανοιχτόχρωμη λαμπερή εμφάνιση. Αποτελεί μία από τις κύριες κατηγορίες ελληνικού μελιού, που αποτελεί το 10% της ετήσιας παραγωγής. Παράγεται κυρίως στα ελληνικά νησιά όπου το θυμάρι απαντάται σε αφθονία. Κατατάσσεται στις καλύτερες ποιότητες μελιού που υπάρχουν. Έχει ιδιαίτερο κεχριμπαρένιο χρώμα, χαρακτηριστική γεύση και κρυσταλλώνει σε 6 έως 18 μήνες ανάλογα με το ποσοστό των σακχάρων. Φημίζεται για τις τονωτικές και αντισηπτικές του ιδιότητες (www.bee2bee.gr) (www.melifotopoulos.gr),.



Είκ.2 πορτοκαλιά - *Citrus aurantium* (νέκταρ):

Η πορτοκαλιά αποτελεί τον κύριο αντιπρόσωπο των εσπεριδοειδών. Το μέλι που παράγεται από άνθη πορτοκαλιάς έχει υπέροχο, χαρακτηριστικό άρωμα ανάλογο του είδους από το οποίο προέρχεται και εξαιρετική, γλυκιά γεύση. Είναι ανοιχτόχρωμο και κρυσταλλώνει με υψηλή ταχύτητα μέσα σε ένα με δύο μήνες. Μετά τη κρυστάλλωση μετατρέπεται σε ασπριδερό στο χρώμα (www.melifotopoulos.gr).



Εικ.3 ηλίανθος - *Helianthus annuus*(νέκταρ):

Λόγω της εκτεταμένης καλλιέργειάς του σε αρκετές περιοχές της χώρας μας και κυρίως στη Μακεδονία, το μέλι ηλίανθου απαντάται συχνά. Είναι ανοιχτού κίτρινου χρώματος και έχει γλυκιά γεύση. Το υψηλό ποσοστό υγρασίας και η χαμηλή περιεκτικότητα σε διάσταση το καθιστούν ιδιαίτερα ευπαθές. Επειδή όμως κρυσταλλώνει με μεγάλη ταχύτητα και αποκτά βουτυρώδη υφή είναι κατάλληλο για λεπτοκρυστάλλωση. Είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στη ποιότητα της διατροφής μας (www.bee2bee.gr).



Εικ.4 Ερείκης - *Erica multipolyflora* (νέκταρ):

Παράγεται από διάφορα είδη ερείκης γνωστή και ως "σουσούρα", που ευδοκιμούν στη χώρα μας. Το μέλι ερείκης που συλλέγεται το φθινόπωρο έχει χαρακτηριστικό κοκκινωπό χρώμα(συνήθως μετά την κρυστάλλωση), έντονη οσμή και γεύση καθώς και υψηλή θρεπτική αξία που το καθιστούν ιδιαίτερο. Όταν προέρχεται από ανοιξιότικη ερείκη έχει τελείως διαφορετικό χρώμα που μοιάζει με αυτό του κεριού και ιδιαίτερη υφή. Παρόλα αυτά λόγω της υψηλής ταχύτητας κρυστάλλωσής του(1-3 μήνες), δεν ενδείκνυται για αναμείξεις (www.bee2bee.gr).



Εικ.5 Καστανιά - *Castanea sativa*: Είναι μια ιδιαίτερη περίπτωση κατηγορίας μελιού γιατί αν και θεωρείται ανθόμελο έχει χαρακτηριστικά μελιού μελιτώματος καθώς προέρχεται τόσο από το νέκταρ της καστανιάς όσο και από τις μελιτώδεις εκκρίσεις ενός είδους αφίδας που παρασιτεί στα φύλλα της καστανιάς. Έχει ιδιαίτερο έντονο σκούρο καφέ έως μαύρο χρώμα, χαρακτηριστικό έντονο άρωμα και έντονη έως πικρή γεύση. Παρόλα αυτά έχει υψηλή διατροφική αξία καθώς είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία. Όταν προέρχεται από τις εκκρίσεις του φυτού διατηρείται ρευστό φια περισσότερο από ένα χρόνο και είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία. Κρυσταλλώνει αργά σε ένα με δύο χρόνια. Παράγεται στη Μακεδονία και στο Άγιο Όρος(www.bee2bee.gr).



Εικ.6 βαμβάκι –*Gossypium hirsutum*(νέκταρ): Όπως και στη περίπτωση της καστανιάς, το μέλι από βαμβάκι προέρχεται τόσο από το νέκταρ του φυτού, όσο και από τις μελιτώδεις εκκρίσεις εντόμων που παρασιτούν σε αυτό. Η παραγωγή του βαμβακόμελου έχει μειωθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια εξαιτίας της αυξημένης χρήσης φυτοφαρμάκων στις καλλιέργειες βαμβακιού. Λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα κρυσταλλώνει γρήγορα. Είναι πολύ ανοιχτόχρωμο και όταν κρυσταλλώνει παίρνει ένα χαρακτηριστικό υπόλευκο χρώμα και έχει χαρακτηριστική βουτυρώδη υφή, γλυκιά γεύση και ουδέτερο χρώμα (www.bee2bee.gr).



Εικ.7 πεύκο – *pinus halepensis*(κοινό πεύκο) *μελίτωμα*: Το πευκόμελο είναι η σημαντικότερη κατηγορία ελληνικού μελιού καθώς αντιπροσωπεύει το 65% της συνολικής παραγωγής μελιού στη χώρα

μας. Προέρχεται από τις μελιτώδεις εκκρίσεις ενός εντόμου που παρασιτεί στο πεύκο γνωστό και ως “βαμβακάδα” ή “εργάτης”(*Marchalina hellenica*). Οι κυριότερες περιοχές που παράγεται το πευκόμελο είναι η Θάσος, η Χαλκιδική, η Εύβοια, η Ζάκυνθος, η Κρήτη και οι Σποράδες.

Το πευκόμελο όπως όλα τα μέλια που προέρχονται από μελίτωμα έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα. Γι' αυτό το λόγο η ταχύτητα κρυστάλλωσής του είναι μικρή. Συνήθως αμιγή πευκόμελα, χωρίς αναμειξεις διατηρούνται ρευστά για περισσότερο από ένα χρόνο. Δεν είναι ιδιαίτερα γλυκό, γι' αυτό και δεν αρέσει στη γεύση. Η ιδιαίτερη θρεπτική αξία του οφείλεται στο μεγάλο αριθμό θρεπτικών στοιχείων, κυρίως ιχνοστοιχείων, πρωτεϊνών και αμινοξέων που περιέχει. Το χρώμα του ποικίλει από ανοιχτό όταν παράγεται την άνοιξη έως πιο σκούρο όταν παράγεται το φθινόπωρο (www.bee2bee.gr).



Εικ.8 ακακία - *Robinia pseudoacacia*(νέκταρ): Το πιο γνωστό είδος ακακίας που αποφύεται στην Ελλάδα είναι η ακακία η κοινή ή αλλιώς *Robinia pseudoacacia*. Το μέλι που προέρχεται από τα άνθη της ακακίας έχει υπερβολικά ανοιχτό χρώμα, ιδιαίτερα λεπτή υφή, πλούσιο άρωμα και αρκετά γλυκιά αλλά ελαφριά γεύση. Έχει υψηλό ποσοστό φρουκτόζης και υψηλή αναλογία φρουκτόζης/γλυκόζης. Γι' αυτό το λόγο διατηρείται ρευστό για μεγάλο χρονικό διάστημα και μπορεί να καταναλωθεί και από άτομα που πάσχουν από διαβήτη (www.bee2bee.gr).



Εικ.9 πολύκομβος - *Polygonum spp*(νέκταρ): Το μέλι πολύκομβου είναι σκοτεινόχρωμο. Η γεύση του δεν αρέσει ιδιαίτερα γι' αυτό δε συναντάται ως αμιγές μέλι στην ελληνική αγορά. Είναι πλούσιο σε ένζυμα και προσφέρεται για ανάμιξη με άλλα είδη μελιού. Έχει έντονη οσμή, μαύρο χρώμα και κρυσταλλώνει πολύ γρήγορα (20-30 μέρες μετά τον τρύγο) (www.melisokomiki.eu).



Εικ.10 έλατο - *Abies sp(μελίτωμα)*: Το μέλι ελάτης αποτελεί το 5-10% της συνολικής παραγωγής μελιού στην Ελλάδα. Ανήκει στην κατηγορία των μελιών μελιτώματος και προέρχεται από τις εκκρίσεις κοκκοειδών και αφίδων που παρασιτούν στα έλατα. Έχει χαρακτηριστική γεύση και εμφάνιση, είναι ιδιαίτερα πυκνόρευστο και λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα δε κρυσταλλώνει. Έχει ουδέτερο άρωμα και ιδιαίτερα καλή γεύση χωρίς να είναι πολύ γλυκό. Παράγεται σε ορεινές περιοχές και κυρίως στον Όλυμπο, την Πίνδο, το Μαίναλο, το Χελμό και την Πάρνηθα. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση του μελιού Ελάτης που προέρχεται από τη περιοχή της Βυτίνας, το οποίο λόγω της ιδιαίτερης εμφάνισής του και των χρυσών-μεταλλικών ανταυγείων στο χρώμα του, φέρει το όνομα “έλατο βανίλια”, που από το 1994 αποτελεί Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης (Π.Ο.Π). Είναι μία από τις καλύτερες και τις ακριβότερες κατηγορίες μελιού (www.bee2bee.gr).



Εικ.11 κουμαριά – *Arbutus unedo(νέκταρ)*: Το μέλι της κουμαριάς, έχει χρώμα σκούρο κίτρινο, το ιξώδες του είναι μέτριο, γεύση πικρή και γι'αυτό έχει και μικρή εμπορική αξία. Τα τελευταία χρόνια που υπάρχει ενημέρωση του αγοραστικού κοινού όλο και περισσότεροι καταναλωτές το ζητάνε για δοκιμή και κατανάλωση. Οι μελισσοκόμοι το αφήνουν στις κυψέλες να το φάνε τα μελίσσια τους για ξεχειμώνιασμα. Τα άνθη της κουμαριάς έχουν χρώμα λευκό προς το κρεμ, είναι σε ταξιανθία σαν τσαμπί και έχουν το σχήμα καμπανούλας έτσι η βροχή δεν τα επηρεάζει καθόλου. Το μέλι της κουμαριάς είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία και βιταμίνες, κάνει καλό στον άνθρωπο και μάλιστα έχει βρεθεί ότι είναι διουρητικό και κατεβάζει την πίεση, κάνει καλό στο κυκλοφορικό άρα και στην καρδιά, αλλά και ταυτόχρονα σαν διουρητικό κάνει καλό στα νεφρά και κατ επέκταση και στον προστάτη (www.melissomania.gr).



Εικ.12 ευκάλυπτος – *Eucalyptus*

srp(νέκταρ): Το μέλι ευκάλυπτου είναι ανοιχτόχρωμο, κίτρινο με πρασινωπές ανταύγειες Έχει έντονο άρωμα με χαρακτηριστική γεύση. Συνιστάται για κρυσταλλώματα μέσα σε ροφήματα (www.xmbeekeeping.eu).



Εικ.13 μέλι ανθέων(*νέκταρ*): Το μέλι ανθέων και

δάσους το συλλέγουν οι μέλισσες από το νέκταρ και τη γύρη των λουλουδιών και των δέντρων κατά την περίοδο της άνθισης τους, καλλιεργούμενων ή αυτοφυών, από την πλούσια ποικιλόχρωμη και μοναδική χλωρίδα της Ελλάδας. Συλλέγεται από διάφορες περιοχές, ακολουθώντας και αναζητώντας τις ανθοφορίες της κάθε εποχής. Έχει χρώμα από ανοιχτό κίτρινο έως καφέ ή ακόμα και κοκκινωπό ανάλογα με τη φυτική του προέλευση. Επίσης έχει άρωμα ανθώδες και φρουτώδες, γεύση απαλή και γλυκιά, και περιέχει θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για μια ισορροπημένη καθημερινή διατροφή. Κρυσταλλώνει πιο γρήγορα από τα άλλα μέλια συνήθως 4-6 μήνες μετά τη συλλογή του (www.geaolymprou.gr).

1.1.2 Διατροφική αξία του μελιού

Η βιολογική αξία του μελιού έγκειται τόσο στη διαιτητική αξία που έχει για τον ανθρώπινο οργανισμό καθώς και στην αντιβακτηριακή, στη μυκοστατική και την αντιοξειδωτική του δράση. Έχουν αναγνωριστεί πάνω από 180 διαφορετικές ουσίες στο μέλι που το καθιστούν πολύτιμη τροφή. Το μέλι περιέχει εκτός από νερό σε ποσοστό 16%, και μια πληθώρα συστατικών, όπως σάκχαρα, αμινοξέα, οργανικά οξέα, μεταλλικά στοιχεία, ένζυμα, βιταμίνες, πολυφαινόλες, φαινολικά οξέα, μονοτερπένια και βιοφλαβονοειδή.

που είναι ευεργετικά για τον άνθρωπο και λειτουργούν συνεργιστικά. Πιο αναλυτικά η φρουκτόζη και η γλυκόζη, που είναι τα κυριότερα σάκχαρα του μελιού, αφομοιώνονται πιο εύκολα και γρήγορα από τον ανθρώπινο οργανισμό. Επιπλέον η γλυκόζη είναι η μόνη μορφή σακχάρου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τους μυς, γι'αυτό το μέλι αποτελεί μια άριστη πηγή ενέργειας για παιδιά και αθλητές. Τα μεταλλικά στοιχεία(κάλιο, ασβέστιο, χλώριο και νάτριο) που περιέχει το μέλι βοηθούν στη λειτουργία των κυττάρων του οργανισμού, στη διατήρηση της υγείας των οστών και των δοντιών και στη πήξη του αίματος. Τα ένζυμα του μελιού(διασάση, καταλάση) είναι καταλύτες σε πολλές αντιδράσεις του οργανισμού που έχουν ως αποτέλεσμα τη διάσπαση ελευθέρων ριζών που είναι επιβλαβείς για τον άνθρωπο. Το μέλι επιπλέον περιέχει ένα μεγάλο αριθμό βιταμινών, όπως οι βιταμίνες (A,B1,B2,B6,C,D,E,ριβοφλαβίνη, παντοθενικό οξύ, φολικό οξύ κ.α)που αν και βρίσκονται σε μικρή ποσότητα, συμβάλλουν στην απορρόφηση των σακχάρων από τον οργανισμό και γενικότερα στη καλή λειτουργία του. Όσον αφορά τη συμβολή του μελιού στην ανθρώπινη διατροφή, από μετρήσεις που έγιναν από το Υπουργείο Γεωργίας των Η.Π.Α βρέθηκε ότι το μέλι έχει κατά μέσο όρο 300 θερμίδες ανά 100 γραμμάρια. Ένα τυπικό δείγμα μελιού αποτελείται από: φρουκτόζη 38%,γλυκόζη 31%,σουκρόζη 1,3 %, μαλτόζη 7,1%,νερό 16-17% και τέφρα 0,2% (www.bee2bee.gr).

1.1.3 Ιστορική αναδρομή της χρήσης του μελιού ως αντιμικροβιακή ουσία

Αρχαίοι λαοί, όπως οι Αιγύπτιοι, οι Σύριοι, οι Βαβυλώνιοι, οι Σουμέριοι και οι Χετταίοι, είχαν εντάξει το μέλι στη διατροφή τους ως θεραπευτικό και φαρμακευτικό μέσο. Ο Ιπποκράτης και όλοι οι γιατροί της αρχαιότητας το συνιστούσαν σαν φάρμακο σε πολλές περιπτώσεις. Ο Ιπποκράτης αναφέρει ότι το μέλι κάνει πιο ζωηρό το χρώμα του ανθρώπου, ενώ εξαίρει την ευεργετική του επίδραση σε υγιείς και ασθενείς. Ο Πυθαγόρας διαπιστώνει ότι το μέλι εξαφανίζει την κόπωση. Ο Δημόκριτος ο οποίος έζησε περισσότερο από 110 χρόνια, απέδωσε τη μακροβιότητά του στο μέλι, λέγοντας ότι το προϊόν βοηθάει τον μεσήλικα να διατηρεί νεανικό σφρίγος. Οι Αρχαίοι Έλληνες και οι Ρωμαίοι χρησιμοποίησαν το μέλι σε μίγμα με ζωικό λίπος για τη θεραπεία πληγών που είχαν μολυνθεί. Ο Αριστοτέλης το χαρακτήρισε σαν βάλαμο για τα ερεθισμένα μάτια και τις πληγές και ο Διοσκουρίδης αποτελεσματικό για τις υπό σήψη πληγές. Στον Α' Παγκόσμιο Πόλεμο χρησιμοποιήθηκε για επιτάχυνση της επούλωσης πληγών στους τραυματίες του Ρωσικού στρατού. Σήμερα σε αναπτυσσόμενες χώρες του Τρίτου Κόσμου

γίνεται ευρύτατη χρήση του μελιού υπό μορφή επιθεμάτων για την επούλωση χειρουργικών τραυμάτων ([www.users.uoa.gr KALLYNTIKO_21.pdf](http://www.users.uoa.gr/KALLYNTIKO_21.pdf),page5).

1.1.4 Το μέλι ως αντιμικροβιακός παράγοντας

Η αντιβακτηριακή δράση του μελιού, όπως αναφέρθηκε, είναι γνωστή εδώ και πολλά χρόνια. Η δράση του αυτή οφείλεται σε ένα εύρος παραγόντων, όπως τη περιεκτικότητα σε ουσίες με αντιμικροβιακή δράση, την υψηλή συγκέντρωση των σακχάρων του, αλλά και το χαμηλό του pH. Αρκετά είναι τα είδη μικροοργανισμών των οποίων το μέλι εμποδίζει την ανάπτυξη, όπως είδη λυστέριας, στρεπτόκοκκου, σταφυλόκοκκου, ψευδομονάδας, και άλλων μικροβίων (Lusby et al 2005). Σημαντική συνεισφορά στην αντιμικροβιακή δράση του μελιού έχει και η παρουσία οργανικών οξέων με βασικό το γλυκονικό οξύ, τα φλαβονοειδή και τα υπόλοιπα φαινολικά συστατικά αλλά και ουσίες τερπενικής φύσεως (Wahdan 1998). Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού οφείλεται κυρίως στην ενζυμική παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου μέσω του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου παράγεται συνεχώς σε μικρές ποσότητες στο μέλι και δεν χρειάζονται υψηλές συγκεντρώσεις για την αντιμικροβιακή του δράση. Επειδή υπάρχει συνεχής παραγωγή σε μικρές ποσότητες, δεν δημιουργείται ανθεκτικότητα των μικροβίων στη δράση του και ταυτόχρονα δεν προκαλούνται βλάβες στο δέρμα που θα δημιουργούνταν εάν υπήρχε υψηλή συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου που τοποθετείται στο δέρμα. Υπάρχουν διάφορες ποικιλίες μελιού που έχουν ψηλότερες συγκεντρώσεις υπεροξειδίου. Το μέλι που προέρχεται κυρίως από δέντρα του τύπου *leptospermum* που υπάρχουν στη Νέα Ζηλανδία και στην Αυστραλία, έχει ιδιαίτερα ισχυρή αντιβακτηριδιακή δράση λόγω των συγκεντρώσεων υπεροξειδίου που παράγονται σε αυτό. Επίσης λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων φαινολών που υπάρχουν στο συγκεκριμένο μέλι, πιθανόν να είναι δυσκολότερο για τα βακτηρίδια να αναπτυχθούν (Cooper et al 1999).

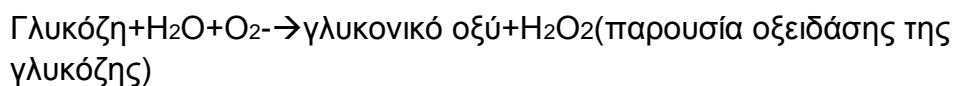
Το μέλι δεν είναι βιομηχανικό προϊόν και ως εκ τούτου η χημική σύστασή του διαφέρει ανάλογα με την πηγή από την οποία προέρχεται. Επιπλέον, επηρεάζεται από τις συνθήκες συλλογής του, την κατάσταση του μελισσιού και άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Τα παραπάνω σημαίνουν ότι δεν είναι όλα τα μέλια ίδια σε ό,τι αφορά την αντιμικροβιακή τους δράση. Αυτά που έχουν χαμηλές συγκεντρώσεις σε φαινολικά συστατικά καθυστερούν περισσότερο την ανάπτυξη των μικροβίων, ενώ όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των συστατικών αυτών τα μικρόβια θανατώνονται.

Πρέπει να επισημανθεί επίσης ότι, λόγω της χαμηλής του περιεκτικότητας σε νερό, το μέλι αναστέλλει την ανάπτυξη βακτηρίων και μυκήτων. Όταν τοποθετείται σε πληγές βοηθά τον μολυσμένο ιστό να αφυδατωθεί αποτρέποντας την ανάπτυξη μολυσματικών παραγόντων (Gomez et al 2006)

Ουσίες και παράγοντες που προκαλούν την αντιμικροβιακή δράση

Υπεροξειδίο του υδρογόνου. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου για πολλά χρόνια θεωρείτο ως ο κύριος ανασταλτικός παράγοντας του μελιού στην ανάπτυξη των βακτηρίων. Παράγεται κατά την οξειδωση της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ, από την οξειδάση της γλυκόζης



Η δράση αυτού του ενζύμου είναι πιο αποτελεσματική όταν το μέλι αραιώνεται. Σε αδιάλυτο μέλι το παραγόμενο γλυκονικό οξύ μειώνει πολύ το pH, το οποίο τελικά αναστέλλει την ενζυμική δράση και κατ'επέκταση την παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Επιπλέον η ενζυμική δράση μειώνεται όταν το μέλι θερμαίνεται πάνω από τους 50°C. Ωστόσο η παρουσία στο μέλι του ενζύμου καταλάση που διασπά με πολύ μεγάλη ταχύτητα το υπεροξειδίο του υδρογόνου, θέτει σε αμφισβήτηση τη παραπάνω παραδοχή (Molan 1992 ; Mandal et al 2011).

Χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό (υψηλή συγκέντρωση σακχάρων).

Ένας δεύτερος παράγοντας που παίζει ρόλο στην αντιμικροβιακή δράση του μελιού είναι η μεγάλη συγκέντρωση των σακχάρων του. Υπάρχουν πολλά σάκχαρα στο μέλι, για την ακρίβεια είναι ένα υπέρκορο υδατικό διάλυμα σακχάρων, που σημαίνει ότι περιέχει σάκχαρα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από εκείνες οι οποίες μπορούν κανονικά να ανευρισκονται μέσα στην υγρή φάση του. Η χαμηλή περιεκτικότητα του μελιού σε νερό αναστέλλει την ανάπτυξη μιας μεγάλης πληθώρας βακτηρίων και μυκήτων. Όταν εφαρμόζεται τοπικά πάνω σε πληγές, το μέλι απορροφάει το νερό από το τραύμα, λόγω οσμωτικών φαινομένων, βοηθώντας έτσι το μολυσμένο ιστό να αφυδατωθεί αποτρέποντας τη βακτηριακή ανάπτυξη. Ακόμη και αραιωμένο, η εφαρμογή του στις πληγές, δεν επιτρέπει την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηρίων και μυκήτων, παρά τη μεγαλύτερη περιεκτικότητά του σε νερό (Molan 1992).

Χαμηλό pH.

Το μέλι είναι ελαφρώς όξινο με pH που κυμαίνεται μεταξύ 3,2 και 4,5 και οφείλεται στην ύπαρξη οργανικών οξέων. Το γλυκονικό οξύ σχηματίζεται όταν οι μέλισσες εκκρίνουν την οξειδάση της γλυκόζης, το ένζυμο το οποίο καταλύει την οξειδωση της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ. Οι χαμηλές τιμές pH αποτελούν ανασταλτικό παράγοντα ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών. Όταν το μέλι εφαρμόζεται τοπικά σε πληγές, το χαμηλό του pH και μόνο, μπορεί να αποτρέψει τη βακτηριακή ανάπτυξη (Molan 1992 ; Mandal et al 2011).

Μεθυλογλυοξάλη

Διάφορα μέλια έχουν σημαντική μη-υπεροξειδιακή αντιβακτηριακή δραστηριότητα. Συγκεκριμένα το μέλι Manuka έχει υποβληθεί σε αναγνώριση μη-υπεροξειδιακών αντιμικροβιακών συστατικών. Το μέλι παράγεται από το νέκταρ του δέντρου manuka (*Leptospermum scoparium*), που είναι γηγενής στη Νέα Ζηλανδία και είναι γνωστή για την μη-υπεροξειδιακή αντιβακτηριακή δράση του. Πρόσφατα εξαιρετικά υψηλά επίπεδα της αντιμικροβιακής ένωσης μεθυλογλυοξάλη(MGO) έχουν βρεθεί στο μέλι Manuka. Σε γενικές γραμμές MGO σχηματίζεται από σάκχαρα κατά τη διάρκεια θερμικής επεξεργασίας ή παρατεταμένης αποθήκευσης των τροφίμων ή ποτών που περιέχουν υδατάνθρακες. Ωστόσο τα υψηλά επίπεδα της MGO στο μέλι Manuka σχηματίζονται με μετατροπή της διϋδροξυακετόνης(DHA) που υπάρχει σε εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις στο νέκταρ των λουλουδιών του είδους *L.scoparium*. Αυτή η μετατροπή λαμβάνει χώρα μη ενζυματικά με βραδύ ρυθμό κατά την διάρκεια αποθήκευσης του μελιού. Είναι άγνωστο πως η DHA διαμορφώνεται στο νέκταρ και γιατί είναι παρούσα σε τέτοιες μεγάλες ποσότητες στο νέκταρ των δέντρων Manuka. Βασισμένη σε μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων MGO και του δυναμικού του μελιού να αναστέλλουν την ανάπτυξη του *S.aureus*, έχει προταθεί ότι η MGO είναι πλήρως υπεύθυνη για την μη-υπεροξειδιακή αντιμικροβιακή δραστηριότητα του μελιού Manuka (Kwakman et al 2012) .

Αμυντοσίνη-1

Πρόσφατα εντοπίστηκε το αντιμικροβιακό πεπτιδίο αμυντοσίνη-1 στις μέλισσες. Το πεπτιδίο (επίσης γνωστό και ως royalisin)είχε προηγουμένως αναγνωριστεί στις μέλισσες του είδους hemolymphe, το αντίστοιχο έντομο του αίματος, στο κεφάλι μελισσών και των θωρακικών αδένων και στο βασιλικό πολτό που είναι η κύρια τροφή των προνυμφών της βασίλισσας, χωρίς όμως να έχουν ανιχνευθεί στο μέλι. Η αμυντοσίνη-1 έχει ισχυρή δραστηριότητα αλλά μόνο έναντι των Gram(+) βακτηριδίων, συμπεριλαμβανομένων του *B.subtilis*, *S.aureus* και προνυμφών *Paenibacillus*. Το τελευταίο είδος είναι ο αιτιολογικός παράγοντας για την καταστροφική για τις προνύμφες των μελισσών νόσο της Αμερικανικής σηψιγονίας. Η Αμερικάνικη σηψιγονία είναι μια καταστροφική ασθένεια που πλήττει ειδικά τις προνύμφες των μελισσών. Λοίμωξη με *P. pronύμφες* λαμβάνει χώρα μέσω του πεπτικού σωλήνα και καταλήγει σε σοβαρή θνησιμότητα μεταξύ των νυμφών κατά την διάρκεια του πρώτου 48 ώρου μετά την εκκόλαψη των αυγών. Η παρουσία της αμυντοσίνης-1 στο βασιλικό πολτό που όπως αναφέρθηκε αποτελεί σημαντική τροφή για τις προνύμφες των βασιλισσών συμβάλλει στη προστασία αυτών ενάντια στην νόσο της Αμερικανικής σηψιγονίας. Η αμυντοσίνη-1 εκκρίνεται από τον υποφαρυγγικό αδένά των μελισσών οι οποίες χρησιμοποιούν τις εκκρίσεις του υποφαρυγγικού αδένά για την παραγωγή του βασιλικού πολτού και μελιού. Η ποσότητα της αμυντοσίνης-1 σε βασιλικό πολτό (αυτό αναφέρεται ως "royalisin") και μελιού ποικίλλει σε

μεγάλο βαθμό , με μερικά δείγματα εντελώς να στερούνται αυτού του πεπτιδίου. Αυτό συνεπάγεται ότι η έκφραση της αμυνοσίνη-1 στους υποφαρυγγικούς αδένες ή / και η ποσότητα των εκκρίσεων του αδένου που προστίθενται ποικίλουν έντονα. Εφόσον η αμυνοσίνη-1 είναι δραστική έναντι των νυμφών *Raenibacillus* ,η αιτία της Αμερικανικής σηψιγονίας θα ήταν δυνατόν να διερευνηθεί αν η διακύμανση των επιπέδων έκφρασης της αμυνοσίνης-1 σχετίζεται με την ευαισθησία των μελισσών σε αυτή την ασθένεια(Kwakman et al 2012).

Άλλες αντιμικροβιακές ουσίες του μελιού

Οι φαινολικές ενώσεις που προέρχονται από το νέκταρ των φυτών έχουν προταθεί ως σημαντικοί παράγοντες για την μη-υπεροξειδιακή αντιμικροβιακή δράση του μελιού. Αρκετές αντιβακτηριακές φαινολικές ενώσεις έχουν ταυτοποιηθεί στο μέλι, αλλά η συμβολή τους στη συνολική δραστηριότητα του μελιού παραμένει ασαφής. Η δραστηριότητα των μεμονωμένων φαινολικών ενώσεων που έχουν απομονωθεί από το μέλι είναι πολύ χαμηλή για να συμβάλει ουσιαστικά στην αντιμικροβιακή δράση. Ίσως ο συνδυασμός των διαφόρων φαινολικών αντί των μεμονωμένων ενώσεων θα μπορούσε να συμβάλει ουσιαστικά στην δραστηριότητα του μελιού(Kwakman et al 2012). Σύγχρονα πειραματικά δεδομένα αποδίδουν την αντιμικροβιακή δράση του μελιού κυρίως σε άλλους παράγοντες, όπως π.χ. στους βιοδραστικούς δευτερογενείς μεταβολίτες. Πολλά από τα συστατικά αυτά δεν έχουν ακόμα προσδιορισθεί. Μερικές, όμως, από τις ουσίες που έχουν προσδιορισθεί και στις οποίες οφείλεται η αντιμικροβιακή δράση του μελιού είναι το συριγγικό οξύ (3,5 διμεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ), το 3,4,5 τριμεθοξυβενζοϊκό οξύ, το 2-υδροξυ-3-φαινυλοπροπιονικό οξύ και η πινοσεμπρίνη. Τέλος οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στο μέλι έχουν προταθεί ως μια πιθανή πηγή των αντιμικροβιακών ενώσεων (Molan 1992) . Τα βακτήρια που απομονώθηκαν από το μέλι μπορούν να παράγουν πράγματι αντιμικροβιακές ενώσεις, όταν καλλιεργούνται *in vitro*, αλλά παραμένει ασαφές εάν τέτοιες ενώσεις στην πραγματικότητα υπάρχουν στο μέλι(Kwakman et al 2012) .

1.1.5 Ευεργετικές ιδιότητες του μελιού στον άνθρωπο

Το μέλι έχει αρκετές θεραπευτικές δράσεις, ενώ παράλληλα θεωρείται ότι τονώνει γενικότερα τον οργανισμό. Από την αρχαιότητα πιστεύεται ότι αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα μακροβιοτικά που μας έχει δώσει η φύση. Συγκεκριμένα, οι ευεργετικές ιδιότητες του μελιού είναι οι εξής :

- Το μέλι έχει βακτηριοστατική, βακτηριοκτόνο δράση και επομένως δεν ευνοεί την ανάπτυξη οποιουδήποτε παθογόνου βακτηρίου. Η δράση αυτή του μελιού εκδηλώνεται κυρίως, όταν το μέλι βρεθεί μέσα σε υδάτινο περιβάλλον(π.χ υδατικό διάλυμα).Επίσης το μέλι έχει την

ιδιότητα να αποξηραίνει και να αφυδατώνει τα βακτήρια που θα έρθουν σε επαφή μαζί του.

- Έχει ηπατο-ενισχυτική δράση τονώνοντας το συκώτι και τη χολή.
- Βοηθάει σε γαστρεντερικές παθήσεις, είναι ελαφρώς καθαρτικό, βοηθάει στη δυσκοιλιότητα, ενισχύει τη ποιότητα των γαστρικών υγρών, και άρα βοηθάει τη πέψη που, με τη σειρά της, προστατεύει τον οργανισμό, έμμεσα από παθογόνα μικρόβια που περιέχονται στη τροφή. Το μέλι βοηθάει στη καλύτερη αφομοίωση των τροφών. Βοηθάει στην θεραπεία της γαστρεντερίτιδας και το πεπτικού έλκους.
- Έχει ενισχυτική, τονωτική δράση στα νεφρά. Έχει διουρητικές ιδιότητες και βοηθάει τη γρηγορότερη αποβολή άχρηστων ουσιών από το αίμα. Οι αντισηπτικές, αντιβακτηριδιακές ιδιότητες που έχει προστατεύουν την ουροδόχο κύστη από μολύνσεις.
- Το μέλι έχει ευεργετικές ιδιότητες στον καρδιακό μυ. Αυτό το κάνει δίνοντάς του μεγάλες ποσότητες ενέργειας, για να μπορεί να λειτουργεί ακατάπαυστα. Παράλληλα με τη τόνωση της καρδιάς και την ενίσχυση του καρδιακού παλμού, το μέλι έχει αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες διευκολύνοντας την κυκλοφορία.
- Το μέλι συμβάλλει στην αποσυμφόρηση των αναπνευστικών οδών. Βοηθάει στην αποκατάσταση των βλεννογόνων του λαιμού και του ρινολάρυγγα και ελαττώνει τον σπαστικό βήχα.
- Το μέλι συμβάλλει στην επούλωση των πληγών στο δέρμα και στη καταπολέμηση των δερματικών παθήσεων (www.apistherapy.blogspot.gr).
- Περιέχει πολλά θρεπτικά συστατικά και θωρακίζει τον οργανισμό με αντιοξειδωτικές ουσίες. Το μέλι περιέχει σάκχαρα, βιταμίνες, μεταλλικά στοιχεία και αμινοξέα. Από όλα αυτά, ίσως τα πιο σημαντικά είναι τα αμινοξέα, καθώς οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η περιεκτικότητα σε αμινοξέα σχετίζεται άμεσα με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του μελιού. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες, που περιέχονται επίσης στο μέλι, εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες και προστατεύουν τον οργανισμό από τη διαδικασία της γήρανσης.
- Ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα. Προκαλεί αύξηση της παραγωγής των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων. Επίσης συμβάλλει στη διατήρηση των επιπέδων της αιμοσφαιρίνης του αίματος σε σχετικά ικανοποιητικά επίπεδα σε ασθενείς που αναμένεται να εμφάνιζαν σοβαρή αναιμία.

Τέλος το μέλι βελτιώνει τη ποιότητα ζωής σε ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο(www.healthnotesandnews.blogspot.gr).

1.2 *Staphylococcus aureus*(Χρυσίζων σταφυλόκοκκος)



Εικ.14 Ο *S.aureus* ανήκει στο γένος των βακτηρίων που είναι θετικοί κατά Gram κόκκοι. Σχηματίζουν συστάδες με μορφή σταφυλιού στο οποίο οφείλουν και το όνομά τους(Haddadin et al 2002). Οι αποικίες τους έχουν κίτρινο χρώμα, το οποίο οφείλεται στη καροτινοειδής χρωστική ουσία σταφυλοξανθίνη, και αναπτύσσονται και διαιρούνται σε πλούσιο θρεπτικό μέσο. Ο *S.aureus* είναι δυνητικά αναερόβιο βακτήριο, που σημαίνει ότι αναπτύσσονται από την αερόβια αναπνοή ή ζύμωση που παράγει γαλακτικό οξύ(Masalha et al 2001).

Ο *S.aureus* “κατοικεί” και αναπτύσσεται κυρίως στο δέρμα και στο βλεννογόνο της μύτης ενός υγιούς ανθρώπου. Είναι μολυσματικό τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τα ζώα και μπορεί να επιβιώσει μόνο σε ξηρό δέρμα. Μπορεί να μεταδοθεί μέσω μολυσμένων επιφανειών, μέσω του αέρα και μέσω της επαφής μεταξύ των ανθρώπων(David et al 2010). Περίπου το 30% ενός υγιούς πληθυσμού επηρεάζεται από τον *S.aureus* καθώς αποικίζει χωρίς να προκαλεί συμπτώματα στο δέρμα του ανθρώπου ξενιστή.

Ο *S.aureus* είναι ένα από τα πιο κοινά νοσοκομειακά παθογόνα(Gosbell 2004). Αποτελεί την πιο κοινή αιτία λοιμώξεων από βακτήρια του είδους αυτού, και είναι υπεύθυνο για διάφορες ασθένειες όπως: ήπιες λοιμώξεις του δέρματος (θυλακίτιδα),διεισδυτικές νόσους(μολύνσεις τραυμάτων, οστεομυελίτιδα, βακτηριαιμίες με μεταστατικές επιπλοκές),τοξικές επιπλοκές(τροφική δηλητηρίαση, σύνδρομο τοξικού σοκ ή TSS),ενδοκαρδίτιδα(λοίμωξη των βαλβίδων της καρδιάς)και λοιμώξεις του αναπνευστικού όπως πνευμονία. Στα ζώα και συγκεκριμένα στις αγελάδες, στα πρόβατα και στις κασικές προκαλεί μαστίτιδα(David et al 2010;Haddadin et al 2002).Ο *S.aureus* προκαλεί και τροφικές δηλητηριάσεις, διότι καθώς αναπτύσσεται παράγει διάφορες θερμοσταθερές πρωτεϊνικές εντεροτοξίνες οι οποίες απελευθερώνονται στη μάζα της τροφής. Αν αυτή η μολυσμένη με εντεροτοξίνες τροφή καταναλωθεί τότε εντός 1 έως 6 ωρών εμφανίζεται γαστρεντερίτιδα συνοδευόμενη από ναυτία και εμετό. Εκτιμάται ότι κάθε χρόνο σημειώνονται, στις ΗΠΑ, 185.000 κρούσματα τροφικής δηλητηρίασης

σταφυλοκοκκικής αιτιολογίας. Οι τροφές που συνήθως συνδέονται με δηλητηριάσεις σταφυλοκοκκικής προέλευσης είναι τα προϊόντα που περιέχουν κρέμα, τα διάφορα κρέατα (συμπεριλαμβανομένου του κρέατος πουλερικών), τα αυγά, οι πουτίγκες και οι κρεμώδεις σάλτσες. Θάνατος από σταφυλοκοκκική τροφική δηλητηρίαση είναι πολύ σπάνιος, αν και τέτοιες περιπτώσεις έχουν συμβεί μεταξύ των ηλικιωμένων, τα βρέφη και σοβαρά εξασθενημένα άτομα(Βιολογία των μικροοργανισμών Brock Τόμος I+II).

1.3 Το καλύτερο αντιμικροβιακό μέλι παγκοσμίως: Μέλι Manuka



Εικ.15

Το μέλι Manuka προέρχεται από το γηγενές φυτό *Leptospermum scoparium*, το οποίο φυτρώνει στη Νέα Ζηλανδία και στη νοτιοανατολική Αυστραλία (Atrott and Henle 2009). Το φυτό Manuka είναι ένα αειθαλές δέντρο που φτάνει τα 15 μέτρα σε ύψος. Τα μικρά του φύλλα φραγκοσυκιάς φέρουν άνθη με λευκό έως ροζ χρώμα. Ένα άλλο φυτό γνωστό ως δέντρο Kanuka είναι παρόμοιο με το φυτό Manuka, με τη μόνη διαφορά ότι το φυτό Kanuka έχει λείο φύλλωμα.

Από τα παλιά χρόνια οι Ευρωπαίοι άποικοι καθώς και η φυλή των Μάορι, χρησιμοποιούσαν τα φυτά Manuka και Kanuka για τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες. Ο φλοιός, το σφρίγος, τα φύλλα και το λάδι των δέντρων αυτών έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή τσαγιού, επιδέσμων, εμπλάστρων και άλλων προϊόντων του δέρματος. Σήμερα προϊόντα όπως το μέλι Manuka είναι γνωστά σε όλο τον κόσμο για την αντιβακτηριακή τους δράση (www.goldenfern.co.nz.page1)

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου αποτελεί ένα από τα συστατικά των μελιών και τους δίνει μια ισχυρή αντιμικροβιακή δράση. Ωστόσο ορισμένα είδη μελιού συμπεριλαμβανομένου και του Manuka, έχουν επίσης και άλλα συστατικά με αντιβακτηριακές ιδιότητες. Η κύρια αντιβακτηριακή ουσία στο μέλι Manuka είναι η **μεθυλογλυοξάλη**, η οποία εντοπίζεται και σε άλλα είδη μελιού αλλά σε μικρότερες ποσότητες (Manjic et al 2008). Ονομάζεται επίσης πυρουβαλδεϋδη ή 2-οξοπροπανάλη ($\text{CH}_3\text{-CO-CH} = \text{O}$) που είναι η μορφή αλδεϋδης του πυροσταφυλικού οξέος. Έχει μορφή αλδεϋδης και προπανάλης. Η μεθυλογλυοξάλη παράγεται από τη μετατροπή μιας ένωσης, της διυδροξυακετόνης, με βραδύ ρυθμό, η οποία βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο νέκταρ των λουλουδιών του φυτού Manuka. Αποθήκευση

των μελιών αυτών στους 37°C οδήγησε σε μείωση της περιεκτικότητας σε διυδροξυακετόνη και σε μια σχετική αύξηση της συγκέντρωσης σε μεθυλογλυοξάλη. Όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση της μεθυλογλυοξάλης, τόσο ισχυρότερη είναι η αντιβακτηριακή δράση του μελιού Manuka (Adams et al 2009).

Οι παραγωγοί του μελιού αυτού έχουν αναπτύξει μια κλίμακα για τη βαθμονόμηση της δραστηριότητας του μελιού Manuka. Η κλίμακα αυτή καλείται UMF (Unique Manuka Factor). Το εύρος της κυμαίνεται από 0-30, αλλά τυπικά το μέλι Manuka έχει βαθμολογία 10 ή περισσότερο. Όσο υψηλότερη είναι η κλίμακα UMF τόσο υψηλότερη αντιβακτηριακή δράση έχει το μέλι. Η κλίμακα UMF προσδιορίζεται μετρώντας την αντιβακτηριακή δραστηριότητα ενός συγκεκριμένου μελιού με την αντιβακτηριακή δραστηριότητα της φαινόλης, γνωστή και ως καρβολικό οξύ, σε διάφορες συγκεντρώσεις. Για να γίνει αυτό το υπεροξειδίο του υδρογόνου πρέπει πρώτα να διασπαστεί με τη χρήση του ενζύμου καταλάση, έτσι ώστε να μετρηθούν μόνο οι μη-υπεροξειδικές ενώσεις. Οι αριθμοί είναι ανάλογοι με την δραστηριότητα ενός ορισμένου ποσοστού φαινόλης. Για παράδειγμα μια βαθμολογία της κλίμακας UMF με 10 είναι ίδια με την αντιβακτηριακή δραστηριότητα ενός διαλύματος φαινόλης 10% (Wallace et al 2009; Allen et al 1991). Οι βαθμολογίες της κλίμακας UMF (μέτρο της αντιβακτηριακής αντοχής) είναι:

- 0-4: δεν ανιχνεύεται αντιβακτηριακή δραστηριότητα
- 5-9: κανονικά επίπεδα αντιβακτηριακής δραστηριότητας παρόμοια με αυτή των συνηθισμένων μελιών
- 10-15: χρήσιμα επίπεδα αντιβακτηριακής δραστηριότητας, που εγκρίθηκαν και από τη Μονάδα Έρευνας Μελιού του Πανεπιστημίου του Waikato.
- 16 και άνω όπου είναι τα επίπεδα με πολύ υψηλή δραστηριότητα (www.ray4goodkarma.wordpress.com).

Το μέλι Manuka είναι γνωστό για τις θεραπευτικές και ευεργετικές του ιδιότητες στον άνθρωπο. Η κύρια ιατρική χρήση του είναι στη θεραπεία μικρών πληγών και εγκαυμάτων. Μια μελέτη στο περιοδικό *European Journal of Medical Research* το 2003 υποστήριξε το μέλι Manuka το οποίο χρησιμοποιήθηκε κάτω από τα επιθέματα σε πληγές μετά από εγχείρηση, είχε ποσοστό επιτυχίας 85% στην αντιμετώπιση των λοιμώξεων, σε σύγκριση με ποσοστό επιτυχίας 50% που είχαν οι κανονικές αντιβιοτικές κρέμες. Το 2007 σε επιθεώρηση σε ασθενείς που είχαν προσβληθεί από το βακτήριο *S.aureus* ανθεκτικό στο αντιβιοτικό μεθικιλίνη, οι οποίοι νοσηλεύονταν σε κορυφαία νοσοκομεία της Ν.Ζηλανδίας διαπιστώθηκε ότι τα τραύματα που υπέστησαν αγωγή με γάζες εμποτισμένες με μέλι Manuka, καθαρίζονταν γρήγορα (www.honeycentre.com).

Επίσης χρησιμοποιείται και για άλλες θεραπείες όπως:

- Την πρόσληψη και τη θεραπεία του καρκίνου(ισχυρή αντιοξειδωτική δράση)
 - Τη μείωση της υψηλής χοληστερόλης
 - Τη μείωση των συστηματικών φλεγμονών
 - Τη θεραπεία του διαβήτη
 - Τη θεραπεία των μολύνσεων των ματιών, του αυτιού και του κόλπου
 - Τη θεραπεία γαστρεντερικών προβλημάτων
- Πάντως τα στοιχεία που έχουμε είναι περιορισμένα για το αν το μέλι Manuka είναι αποτελεσματικό σε αυτές τις συνθήκες(www.webmd.com).

1.4 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης μελιών της περιοχής του Ολύμπου . Συγκεκριμένα εξετάστηκαν 12 δείγματα μελιών όσον αφορά την αντιμικροβιακή τους δράση έναντι του Gram θετικού βακτηρίου *S.aureus* το οποίο εμφανίζει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό μεθικιλίνη. Για να μελετηθεί η αντιμικροβιακή ικανότητα των μελιών χρησιμοποιήθηκαν δύο *in vitro* μέθοδοι :α)η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ(*well diffusion method*) και β)η μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης(*Minimum Inhibitory Concentration, MIC*) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοδότησης(*microtiter plates*).Για την εκτίμηση των μηχανισμών της αντιβακτηριακής δράσης των μελιών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσδιορισμού MIC με τη προσθήκη α)καταλάσης, ένζυμο που διασπά το υπεροξειδίο του υδρογόνου και β)πρωτεΐνάσης K, ένζυμο που διασπά πρωτεΐνες ή ολιγοπεπτίδια που υπάρχουν στο μέλι και συμβάλλουν στην αντιβακτηριακή του δραστηριότητα.

Όλες οι μέθοδοι στηρίζονται στην ικανότητα των συστατικών του μελιού να αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων.

2.Υλικά και μέθοδοι

2.1 Υλικά

- Θρεπτικό υλικό Mueller-Hinton agar[εκχύλισμα βόειου κρέατος 2,0g(30%w/v), υδρολυμένη καζεΐνη 17,5g(1,75%w/v), άμυλο

1,5g(0,15%w/v),άγαρ 17,0g(1,7%w/v) τελικό pH 7,3+-0,1 στους 25°C]
(www.neogen.com)

- Θρεπτικό υλικό Mueller-Hinton broth
- Θρεπτικό υλικό LB broth
- Θρεπτικό υλικό LB agar[τρυπτόνη 10g/L,εκχύλισμα ζύμης 5,0g/L,χλωριούχο νάτριο (NaCl) 5,0g/L, άγαρ 10,0g/L τελικό pH 7,2 στους 37°C] (www.sigmaaldrich.com)
- Τριβλία Petri (100mm)
- Πλάκες μικροτιπλοδότησης 96 θέσεων
- Γυάλινες πιπέτες Pasteur
- Μικροβιολογικός κρίκος
- Λύχνος(γκαζάκι)
- Eppendorfs
- Γυάλινα φιαλίδια(vials)
- Κυψελίδες φωτομέτρησης
- Χάρακας

Βακτηριακό στέλεχος: *Staphylococcus aureus*(ανθεκτικό στη μεθικιλίνη)

2.1.1 Δείγματα μελιών ως προς εξέταση

Τα μέλια που εξετάστηκαν με τις μεθόδους που αναφέραμε επιγραμματικά παραπάνω, προέρχονται από τη περιοχή του Ολύμπου. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν 12 δείγματα μελιών που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα(Πίνακας 1).

| A/A | ΤΥΠΟΣ | ΗΜ.ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ | ΠΕΡΙΟΧΗ | ΠΑΡΑΓΩΓΟΣ |
|-----|---|--------------|--------------------------------|---------------------------------|
| 1 | ΜΕΛΙ ΑΝΘΕΩΝ | ΙΟΥΛΙΟΣ 2013 | Καρυά Ολύμπου | Σαμαράς Γεώργιος |
| 2 | ΑΓΡΙΟΤΡΙΦΥΛΛΙ,ΠΟΛΛΑ ΜΙΚΡΑ ΕΤΗΣΙΑ ΛΟΥΛΟΥΔΙΑ | | Ελασσόνα Ολύμπου | Γκρίγκα Ιωάννα |
| 3 | ΜΕΛΙ ΑΝΘΕΩΝ | | Συκεά Ελασσόνας | Σδάνης Γεώργιος,Σδάνης Νικόλαος |
| 4 | ΠΙΘΑΝΑ ΜΕΛΙΣΣΟΚΟΜΙΚΑ ΦΥΤΑ,ΤΡΙΦΥΛΛΙΑ,ΓΚΟΡΤΣΙΑ,ΚΟΝΤΟΡΙΓΑΝΗ,ΛΑΔΑ | 30-07-2013 | Παλιαμπέλα Βερδικούσιας Λάρισα | Καρκατσέλας Χαράλαμπος |

| | | | | |
|----|--|----------------------------------|----------------------------|--|
| | ΝΙΑ, ΜΕΛΙΤΩΜΑΤΑ | | | |
| 5 | ΜΑΡΤΙΟΣ: ΑΜΥΓΔΑΛΙΑ ΑΠΡΙΛΙΟΣ: ΑΚΑΚΙΑ, ΠΕΥΚΟ, ΚΑΡΑΓΑΤΣΙ, ΑΣΦΟΔΕΛΟΣ ΜΑΙΟΣ: ΠΑΛΙΟΥΡΙ, ΒΙΚΟΣ, ΚΑΜΒΑΛΑΡΙΑ, ΑΓΡΙΟΛΟΥ ΛΟΥΔΑ, ΠΟΥΡΝΑΡΙ ΙΟΥΝΙΟΣ: ΤΣΑΪ, ΜΕΝΤΑ ΙΟΥΛΙΟΣ: ΛΥΓΑΡΙΑ, ΦΟΥΚΑΛΙΑ, ΑΚΑΚΙΑ, ΑΓΡΙΟΔΥΟΣΜΟΣ, ΑΓΡΙΟΒΑΜΒΑΚΙΑ, ΑΓΚΑΘΙΑ | ΙΟΥΛΙΟΣ 2013 | Δομένικο | Τσιπλικιάρης Κων/νος |
| 6 | ΑΚΑΚΙΑ, ΖΑΡΜΠΟΥΝΙ, ΓΑΪ ΔΟΥΡΑΓΚΑΘΟ, ΡΟΖ ΑΓΚΑΘΙ | 6-08-2013 | Σκαμνιά Κρυόβρυση | Γιούρι Σολκόβσκι |
| 7 | ΑΚΑΚΙΑ, ΠΑΛΙΟΥΡΙ, ΒΙΚΟΣ, ΦΑΚΕΣ, ΜΗΛΙΑ, ΑΓΡΙΟΛΟΥ ΛΟΥΔΑ | 25-06-2013 | Σαραντάπορο | Χατζή Μαρία |
| 8 | ΑΓΡΙΟΤΡΙΦΥΛΛΟ, ΑΚΑΚΙΑ, ΘΡΟΥΜΠΗ, ΜΕΝΤΑ, ΒΕΛΑ ΝΙΔΙΑ, ΜΕΛΟΥΡΑ | ΙΟΥΝΙΟΣ- ΙΟΥΛΙΟΣ 2013 | Κρασιά Ελασσόνας | Καραλής Νικόλαος |
| 9 | | | Αζώρο Ελασσόνας | Νταλίπη Χρυσούλα, Μπουρονίκος Δημήτριος |
| 10 | ΜΕΛΙ ΑΝΘΕΩΝ | | Βερδικούσια Λαρίσης | Σβαρνάς Αθανάσιος |
| 11 | | | Καλλιθέα Ελασσόνας | Πουρσανίδης, Κορδή Ουρανία |
| 12 | | ΙΟΥΝΙΟΣ 2012 | Καρυά Ολύμπου | Σαμαράς Γεώργιος |

Μέλι Manuka: Το μέλι Manuka είναι της εταιρίας Manuka Health New Zealand, με UMF 25+(MGO 550mg/kg).

Τεχνητό μέλι: Το τεχνητό μέλι φτιάχτηκε στο εργαστήριο και χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικό control. Ζυγίστηκαν και διαλύθηκαν 3.0g σουκρόζης, 15g μαλτόζης, 80.1g φρουκτόζης και 67g γλυκόζης σε 34 ml απιονισμένο νερό (Sherlock et al 2010). Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 56° C μέχρι να διαλυθεί. Αυτό το διάλυμα αντιπροσωπεύει τα τέσσερα κυρίαρχα σάκχαρα που βρίσκονται στο μέλι.

2.2 Πειραματικές μέθοδοι

Για την εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των μελιών, χρησιμοποιήθηκαν 2 *in vitro* μέθοδοι:

1. Η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ(*well diffusion method*)
2. Η μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)με τη χρήση πλακών μικροτιπλοδότησης(*microtiter plates*)

Η πρώτη μέθοδος στηρίζεται στην αναστολή της ανάπτυξης των βακτηρίων και είναι κατά βάση ποιοτική. Η δεύτερη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της αντιμικροβιακής δράσης των μελιών.

Για την εκτίμηση των μηχανισμών της αντιμικροβιακής δράσης των μελιών χρησιμοποιήθηκε μία *in vitro* μέθοδος:

Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης(*Minimum Inhibitory Concentration*) με τη χρήση πλακών μικροτιπλοδότησης(*microtiter plates*),με τη προσθήκη 2 ενζύμων:

a)καταλάσης

b) πρωτεϊνάσης K

2.2.1 Εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης των μελιών με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια(*wells diffusion method*)

2.2.1.1 Αρχή της μεθόδου/Πειραματική διαδικασία

Για την ποιοτική εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης των μελιών εφαρμόστηκε η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια(*wells diffusion method*)(Ahn and Stiles 1990).

Αρχικά προετοιμάζεται η καλλιέργεια των βακτηρίων χρησιμοποιώντας καλλιέργειες(*glycerol stock*) που διατηρούνται στους -80°C . Αφού έχουμε επιστρώσει με θρεπτικό υλικό[LB broth(αποστειρωμένο)]και σε ασηπτικό περιβάλλον, ένα τριβλίο Petri, ύστερα με ένα μικροβιολογικό κρίκο και πάντα δουλεύοντας κοντά στη λυχνία, παίρνουμε μία μικρή ποσότητα βακτηρίων *S.aureus* από τη καλλιέργεια stock η οποία τοποθετείται σε vial με θρεπτικό υπόστρωμα LB broth των 5ml. Το vial στη συνέχεια τοποθετείται σε επωαστήρα υπό ανάδευση(*incubator shaker*) για 16 ώρες στου 37°C στις 210 στροφές.

Μετά την επώαση, η καλλιέργεια αραιώνεται μέχρι τη παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος(*inoculum*)θολερότητας ίση με 0,5McFarland (περίπου $1,5 \times 10^8$ cfu/ml). Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας(OD) έγινε στα 600nm, με

φασματοφωτόμετρο μέχρι να πετύχουμε τελική τιμή 0,132 που αντιστοιχεί σε 0,5 McFarland(περίπου $1,5 \times 10^8$ cfu/ml).

Αφού γίνει η προετοιμασία των τριβλίων με αποστειρωμένο Mueller Hinton agar και σε ασηπτικό περιβάλλον, στη συνέχεια με την ανάποδη μεριά αποστειρωνένης γυάλινης πιπέτας Pasteur δημιουργούμε 3 κοιλότητες(wells) με διάμετρο 6mm η καθεμία.

Για την εξέταση κάθε δείγματος μελιού, χρησιμοποιούνται 3 erpendorfs, ένα για το υπό εξέταση δείγμα μελιού, ένα για το θετικό control(μέλι Manuka 25+)και ένα για το τεχνητό μέλι(αρνητικό control).Σε κάθε erpendorf τοποθετούνται, δουλεύοντας πάντα σε αποστειρωτικές συνθήκες,500μl από το αντίστοιχο μέλι και 500μl από το ρυθμιστικό διάλυμα PBS,ώστε να αραιωθούν. Ακολουθεί πολύ καλό Vortex των δειγμάτων αυτών και στη συνέχεια στην αντίστοιχη κοιλότητα του τριβλίου τοποθετούνται οι εξής ποσότητες:

- Στη πρώτη κοιλότητα βάζουμε 100μl από το υπό εξέταση δείγμα μελιού
- Στη δεύτερη κοιλότητα βάζουμε 100μl από το θετικό control(Manuka 25+)
- Στη Τρίτη κοιλότητα βάζουμε 100μl από το τεχνητό μέλι(αρνητικό control)

Υπήρχαν όμως και περιπτώσεις που σε κάποιες κοιλότητες τοποθετήθηκαν 150μl από κάποιο από τα 3 μέλια, γεγονός το οποίο οφείλεται στο πάχος του θρεπτικού μέσου στο τριβλίο.

Μετά από 30 λεπτά επιστρώνουμε το αραιωμένο βακτήριο *S.aureus* στο τριβλίο με τη βοήθεια μιας αποστειρωμένης γυάλινης πιπέτας Pasteur.Συγκεκριμένα για τον *S.aureus* επιστρώνουμε 10^6 CFUs ή 5μl.

Τοποθετούμε τα τριβλία σε επωαστήρα στους 37°C για 16 ώρες ώστε να σχηματιστεί στρώμα βακτηρίων σε όλο το τριβλίο. Μετά την επώαση εξετάζουμε κάθε τριβλίο Petri και μετράμε με χάρακα τις διαμέτρους(mm) των ζωνών πλήρους αναστολής της ανάπτυξης των βακτηρίων. Στις μετρήσεις συμπεριλαμβάνονται και τα 6mm από το πηγαδάκι .Όλα τα δείγματα εξετάζονται τουλάχιστον εις τριπλούν για το κάθε μέλι.

2.2.2 Εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των δειγμάτων μελιού μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης(*Minimum Inhibitory Concentration*,M.I.C)με τη χρήση πλακών μικροτιτλοδότησης(*microtiter plates*).

2.2.2.1 Αρχή της μεθόδου

Μια δεύτερη μέθοδος για την εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των μελιών, είναι ο προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*Minimum Inhibitory Concentration*) με τη χρήση αποστειρωμένων πλακών μικροπιλοδότησης από πολυστερίνη 96 θέσεων (96wells) η καθεμία (Patton et al.2005; Sherlock et al 2010).

Για τις υγρές καλλιέργειες, το M.I.C 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).

Για τη μέτρηση της βακτηριακής ανάπτυξης οι μικροπλάκες πολυστερίνης τοποθετήθηκαν σε *microplate reader* (*Elx808 Absorbance Microplate Reader, Biotek*) συνδεδεμένο με έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η μέτρηση έγινε στα 630nm. Η ανάλυση των οπτικών απορροφήσεων των καλλιεργειών έγινε με το λογισμικό *Gen5™ Data Analysis Software* (Biotek).

2.2.2.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται η καλλιέργεια των βακτηρίων χρησιμοποιώντας καλλιέργειες (glycerol stock) που διατηρούνται στους -80°C. Αφού έχουμε επιστρώσει με θρεπτικό υλικό [LB broth (αποστειρωμένο)] και σε ασηπτικό περιβάλλον, ένα τριβλίο Petri, ύστερα με ένα μικροβιολογικό κρίκο και πάντα δουλεύοντας κοντά στη λυχνία, παίρνουμε μία μικρή ποσότητα βακτηρίων *S. aureus* από τη καλλιέργεια stock η οποία τοποθετείται σε vial με θρεπτικό υπόστρωμα LB broth των 5ml. Το vial στη συνέχεια τοποθετείται σε επωαστήριο υπό ανάδευση (incubator shaker) για 16 ώρες στους 37°C στις 210 στροφές.

Μετά την επώαση, η καλλιέργεια αραιώνεται μέχρι τη παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος (inoculum) θολερότητας ίση με 0,5 McFarland (περίπου $1,5 \times 10^8$ cfu/ml). Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) έγινε στα 600nm, με φασματοφωτόμετρο μέχρι να πετύχουμε τελική τιμή 0,132 που αντιστοιχεί σε 0,5 McFarland (περίπου $1,5 \times 10^8$ cfu/ml).

Για κάθε ένα από τα 12 δείγματα μελιού δοκιμάστηκαν 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις (50%v/v, 25%v/v, 12,5%v/v, 6,25%v/v, 3,125%v/v και 1,5%v/v).

Αρχικά για την εξέταση κάθε μελιού χρησιμοποιούνται 6 erpendorfs για το δείγμα και 6 erpendorfs για το θετικό control (Manuka 25+). Στο πρώτο από τα

6 εppendorfs του δείγματος και του θετικού control,βάζουμε 750μl από το υπό εξέταση δείγμα και 750μl από το θρεπτικό μέσο Mueller Hinton broth.Κάνουμε καλό Vortex και στη συνέχεια παίρνουμε 750μl από το πρώτο εppendorf και τα βάζουμε στο επόμενο εppendorf κ.ο.κ. Με αυτό τον τρόπο κάνουμε αραιώση 1/10.Στα υπόλοιπα 5 εppendorfs έχουμε βάλει μόνο 750μl Mueller Hinton broth.Αφού κάνουμε τις αραιώσεις μέχρι το 6^ο εppendorf κάνοντας καλό Vortex στη συνέχεια βάζουμε τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις κάθε μελιού στην αντίστοιχη θέση στη πλάκα πολυστερίνης.

Συγκεκριμένα για κάθε μέλι χρησιμοποιήθηκαν εις τριπλούν 6 πηγαδάκια, στο καθένα από τα οποία προστέθηκε:

- 190μl από την εκάστοτε αραιώση του υπό εξέταση μελιού
- 5μl από τον αραιωμένο μικροοργανισμό *S.aureus*

Επιπλέον 3 σειρές με 6 πηγαδάκια για το θετικό control(Manuka25+)

- 190μl από την εκάστοτε αραιώση του θετικού control(Manuka 25+)
- 5μl από τον αραιωμένο μικροοργανισμό *S.aureus*

Τέλος 2 σειρές με 6 πηγαδάκια για το αρνητικό control (Mueller Hinton broth) όπου τοποθετήθηκαν 190μl από το θρεπτικό μέσο και 5μl από τον αραιωμένο μικροοργανισμό *S.aureus*.

Η πλάκα μικροπιλοδότησης τοποθετήθηκε αρχικά στο *ELx808 Absorbance Microplate Reader*(Εικόνα) και έγινε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 630nm για t=0.Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν και καταγράφηκαν από το λογισμικό Gen5™ *Data Analysis Software*.Στη συνέχεια η μικροπλακέτα τοποθετήθηκε σε επωαστήρα(*incubator*) στους 37°C για 24ώρες.Μετά από την επώαση των 24 ωρών ακολούθησε δεύτερη ανάγνωση από το *Absorbance Microplate Reader* για t=24.

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

Η OD για το κάθε πηγαδάκι προκύπτει από την αφαίρεση της μέτρησης για t=24 μείον τη μέτρηση για t=0. (δηλ. $OD_{\text{testwell}} = T_{24 \text{ test}} - T_{0 \text{ test}}$ και $OD_{\text{of corresponding control well}} = T_{24\text{control}} - T_{0\text{control}}$)

Η αναστολή της ανάπτυξης για το κάθε μέλι στο κάθε πηγαδάκι στην κάθε αραιώση υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τον τύπο

100%ΑΝΑΣΤΟΛΗ= $1 - (OD_{\text{testwell}} / OD_{\text{of corresponding control well}}) \times 100$ για κάθε σειρά από το πιατάκι με τα 96 πηγαδάκια. Από αυτό προέκυψαν 6 τιμές αναστολής για την κάθε αραιώση του μελιού. Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν τουλάχιστον για το κάθε μέλι και για την κάθε συγκέντρωση.



Εικ. 16 *ELx808 Absorbance Microplate Reader*

Πίνακας 2.Οι διαδοχικές αραιώσεις των δειγμάτων μελιών και του μελιού Manuka στη μικροπλάκα 96 θέσεων

| | 50% | 25% | 12,5% | 6,25% | 3,125% | 1,5% | | | | | | | | | | |
|--------|-----|-----|-------|-------|--------|------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Μέλι1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Μέλι1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Μέλι1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Manuka | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Manuka | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Manuka | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N/C | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N/C | | | | | | | | | | | | | | | | |

2.2.3Εκτίμηση των μηχανισμών της αντιμικροβιακής δράσης των μελιών μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης(*Minimum Inhibitory Concentration M.I.C*) με τη χρήση

πλακών μικροτιτλοδότησης (*microtiter plates*) με τη προσθήκη 2 ενζύμων α)καταλάσης και β)πρωτεΐνάσης K.

2.2.3.1 Αρχή της μεθόδου

Χρησιμοποιήθηκε η *in vitro* μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης(MIC) σε αποστειρωμένες πλάκες(*microplates*) πολυστερίνης 96 θέσεων(96 wells) η καθεμία, μετά τη προσθήκη α)καταλάσης και β)πρωτεΐνάσης K.

A)Με τη προσθήκη καταλάσης στο μέλι μπορεί να προσδιοριστεί αν η αντιμικροβιακή του δράση οφείλεται στο υπεροξειδίο του υδρογόνου (Kwakman et al 2010).

B)Με τη προσθήκη πρωτεΐνάσης K στο μέλι μπορεί να προσδιοριστεί αν η αντιμικροβιακή του δράση οφείλεται σε ολιγοπεπτίδια ή πρωτεΐνες(Mundo et al 2004).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν όπως περιγράφηκε και στη προηγούμενη μέθοδο, τη μέθοδο προσδιορισμού του M.I.C.

Για τις υγρές καλλιέργειες, το M.I.C 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).

.

Για τη μέτρηση της βακτηριακής ανάπτυξης οι μικροπλάκες πολυστερίνης τοποθετήθηκαν σε *microplate reader* (*Elx808 Absorbance Microplate Reader, Biotek*) συνδεδεμένο με έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η μέτρηση έγινε στα 630nm. Η ανάλυση των οπτικών απορροφήσεων των καλλιεργειών έγινε με το λογισμικό *Gen5™ Data Analysis Software* (Biotek).

2.2.3.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται η καλλιέργεια των βακτηρίων χρησιμοποιώντας καλλιέργειες(*glycerol stock*) που διατηρούνται στους -80°C . Αφού έχουμε επιστρώσει με θρεπτικό υλικό[LB broth(αποστειρωμένο)]και σε ασηπτικό περιβάλλον, ένα τριβλίο Petri, ύστερα με ένα μικροβιολογικό κρίκο και πάντα δουλεύοντας κοντά στη λυχνία, παίρνουμε μία μικρή ποσότητα βακτηρίων *S.aureus* από τη καλλιέργεια *stock* η οποία τοποθετείται σε *vial* με θρεπτικό

υπόστρωμα LB broth των 5ml. Το vial στη συνέχεια τοποθετείται σε επωαστήρα υπό ανάδευση (incubator shaker) για 16 ώρες στους 37°C στις 210 στροφές.

Μετά την επώαση, η καλλιέργεια αραιώνεται μέχρι τη παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος (inoculum) θολερότητας ίση με 0,5 McFarland (περίπου $1,5 \times 10^8$ cfu/ml). Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) έγινε στα 600nm, με φασματοφωτόμετρο μέχρι να πετύχουμε τελική τιμή 0,132 που αντιστοιχεί σε 0,5 McFarland (περίπου $1,5 \times 10^8$ cfu/ml).

Για κάθε ένα από τα 12 μέλια δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις (50%v/v, 25%v/v, 12,5%v/v, 6,25%v/v, 3,125%v/v και 1,5%v/v) για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης.

A) Καταλάση: Το stock καταλάσης (Kwakman et al 2010), (33.000 U/ml) έγινε με διάλυση 30mg σκόνη καταλάσης από συκώτι βοοειδούς (SERNA) σε 10 ml Phosphate buffer (pH 7.4). Στη συνέχεια, σε 1.5 ml μελιού αραιώσης 50% v/v (750 μl μέλι + 750 μl Muller Hinton Broth) προστέθηκαν 28 μl από το stock ώστε η τελική συγκέντρωση καταλάσης να είναι 600 U/ml. Τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα υπό ανάδευση (incubator shaker) για 16 ώρες στους 37° C στις 210 στροφές και στη συνέχεια έγιναν οι υπόλοιπες 5 διαδοχικές αραιώσεις.

B) Πρωτεΐνάση K: Για το stock πρωτεΐνάσης K συγκέντρωσης 10 mg/ml, έγινε διάλυση 10 mg από την πρωτεΐνάση K σε σκόνη (HT Biotechnology LTD) σε 1 ml απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την καταλάση. Σε 1.5 ml μελιού αραιώσης 50% v/v (750 μl μέλι + 750 μl Muller Hinton Broth) προστέθηκαν 15 μl πρωτεΐνάσης K σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml. Τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα υπό ανάδευση (incubator shaker) για 16 ώρες στους 37° C στις 210 στροφές και στη συνέχεια έγιναν οι 5 διαδοχικές αραιώσεις.

Η μικροπλακέτα τοποθετήθηκε στο *ELx808 Absorbance Microplate Reader* και έγινε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 630 nm για $t=0$. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν και καταγράφηκαν από το λογισμικό *Gen5™ Data Analysis Software*. Στη συνέχεια η μικροπλακέτα τοποθετήθηκε σε επωαστήρα (incubator) στους 37° C για 24 ώρες. Μετά από την επώαση των 24 ωρών έγινε ανάδευση με την πιπέτα και ακολούθησε μια δεύτερη ανάγνωση από το *Absorbance Microplate Reader* για $t=24$.

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

Η OD για το κάθε πηγαδάκι προκύπτει από την αφαίρεση της μέτρησης για $t=24$ μείον τη μέτρηση για $t=0$. (δηλ. $OD_{\text{testwell}} = T_{24 \text{ test}} - T_{0 \text{ test}}$ και $OD_{\text{of corresponding control well}} = T_{24\text{control}} - T_{0\text{control}}$)

Η αναστολή της ανάπτυξης για το κάθε μέλι στο κάθε πηγαδάκι στην κάθε αραίωση υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τον τύπο

100%ΑΝΑΣΤΟΛΗ = $1 - (OD_{\text{testwell}} / OD_{\text{of corresponding control well}}) \times 100$ για κάθε σειρά από το πιατάκι με τα 96 πηγαδάκια

Από αυτό προέκυψαν 6 τιμές αναστολής για την κάθε αραίωση του μελιού.

Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν τουλάχιστον για το κάθε μέλι και για την κάθε συγκέντρωση.

3.Αποτελέσματα των πειραμάτων

3.1Εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης των μελιών με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ(*well diffusion method*) με πηγαδάκια

Με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια εξετάστηκαν όλα τα δείγματα μελιού της περιοχής του Ολύμπου. Όλα τα δείγματα εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση εναντίον του *S.aureus*. Στο παρακάτω πίνακα (**πίνακας 3**)δείχνονται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των διαμέτρων των ζωνών αναστολής της ανάπτυξης, για κάθε ένα από τα 12 δείγματα μελιού και του μελιού Manuka 25+, που χρησιμοποιήθηκε στην εξέταση των δειγμάτων εις τριπλούν. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, δηλαδή ο υπολογισμός του μέσου όρου και της τυπικής απόκλισης της διαμέτρου της ζώνης αναστολής, έγινε με τη χρήση του προγράμματος Microsoft Office Excel 2007.

Πίνακας 3.Επίδραση των 12 δειγμάτων μελιών της περιοχής του Ολύμπου στο θετικό κατά Gram βακτήριο *Staphylococcus aureus* σε σχέση με το μέλι Manuka, με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια(*well diffusion method*).

| Μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (well diffusion method) | | |
|---|---|--|
| ΜΕΛΙ | Διάμετρος ζώνης αναστολής δείγματος (mm) | Διάμετρος ζώνης αναστολής Manuka 25+ (mm) |
| 1 ^ο δείγμα τρύγος Ιουλίου Σαμαράς Γ, Καρυά Ολύμπου | 22±05 | 18±1,5 |
| 2 ^ο δείγμα Αγριοτριφύλλι πολλά ετήσια λουλούδια, Γκρίγκα Ιωάννα, Ελασσόνα Ολύμπου | 20±1 | 18±1 |
| 3 ^ο δείγμα μέλι ανθέων Σδάνης Νικόλαος και Γεώργιος, Συκεά Ελασσόνας | 23±0,5 | 18±3 |
| 4 ^ο δείγμα πιθανά μελισσοκομικά φυτά,τριφύλλα,γκορτσιά,κοντορίγανη-λαδανιά,δυσ-μελιτώματα,Καρκατσέλας Χαράλαμπος, Παλιαμπέλα Βερδικούσιας Λάρισα, τρύγος 30-07-013 | 20±0,5 | 18±1 |
| 5 ^ο δείγμα τρύγος Ιουλίου, Τσιπλικιάρης Κων/νος,Δομένικο | 17±0,5 | 16±1 |
| 6 ^ο δείγμα τρύγος Ιούλιος, Γιούρι Σολκόβσκι,Σκαμνιά | 20±2 | 15±1,5 |
| 7 ^ο δείγμα Χατζή Μαρία ,Σαραντάπορο | 20±0,5 | 16±1 |
| 8 ^ο δείγμα τρύγοςΙουνίουΙουλίου,αγριοτριφύλλο,ακακία,θρούμπη,μ έντα,βελανιδιά,μελούρας, Καραλής Νίκος, Κρανιά Ελασσόνας | 21±3 | 16±1 |
| 9 ^ο δείγμα Αζώρο Ελασσόνας, Νταλίπη Χρυσούλα, Μπουρονίκος Δημήτριος | 21±0,5 | 16±0,5 |
| 10 ^ο δείγμα μέλι ανθέων, Σβαρνάς Αθανάσιος, Βερδικούσια Λαρίσης | 21± 0,5 | 15±0,5 |
| 11 ^ο δείγμα Πουρσανίδης ,Κουρδή Ουρανία, Καλλιθέα Ελασσόνος | 18±2 | 15±1 |
| 12 ^ο δείγμα Ιούνης 2012 Σαμαράς Γ, Καρυά Ολύμπου | 21±2 | 15±2 |

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι όλα τα δείγματα μελιού είχαν ανασταλτική δράση εναντίον του θετικού κατά Gram βακτηρίου *Staphylococcus aureus*. Τα δείγματα μελιού που έχουν την ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με το μέλι Manuka 25+ στον *S.aureus* , είναι τα δείγματα 10 και 12 και 8 δίνοντας σημαντικά μεγαλύτερη ζώνη αναστολής, ακολουθούν τα δείγματα 3,6 και 9,στη συνέχεια τα δείγματα 1 και 7,έπειτα τα

δείγματα 2,4 και 11 και τέλος το δείγμα 5 το οποίο παρουσιάζει την μικρότερη αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα μελιού και το μέλι Manuka 25+.Επίσης παρατηρούμε ότι τα μέλια 2 και 11 παρουσιάζουν εφάμιλλη αντιμικροβιακή δράση με το μέλι Manuka.



Εικ.17:Στο παραπάνω τριβλίο διακρίνεται η ζώνη αναστολής του μελιού Manuka έναντι του *S.aureus* στο πηγαδάκι αριστερά και η ζώνη αναστολής του υπό εξέταση μελιού(δείγμα 10)έναντι του *S.aureus* στο πηγαδάκι δεξιά. Στο πηγαδάκι που τοποθετήθηκε τεχνητό μέλι (S),δε παρατηρήθηκε καμία ζώνη αναστολής. Είναι εμφανής η μεγαλύτερη ζώνη αναστολής του δείγματός μας σε σχέση με αυτής του μελιού Manuka, που μαρτυρά την ισχυρή αντιμικροβιακή του δράση έναντι του μελιού Manuka.

3.2 Εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης των μελιών με τη μέθοδο προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης(*Minimum Inhibitory Concentration, M.I.C*).

Με τη μέθοδο μικροπιλοποίησης προσδιορίσαμε την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση που απαιτείται για την αναστολή της ανάπτυξης του

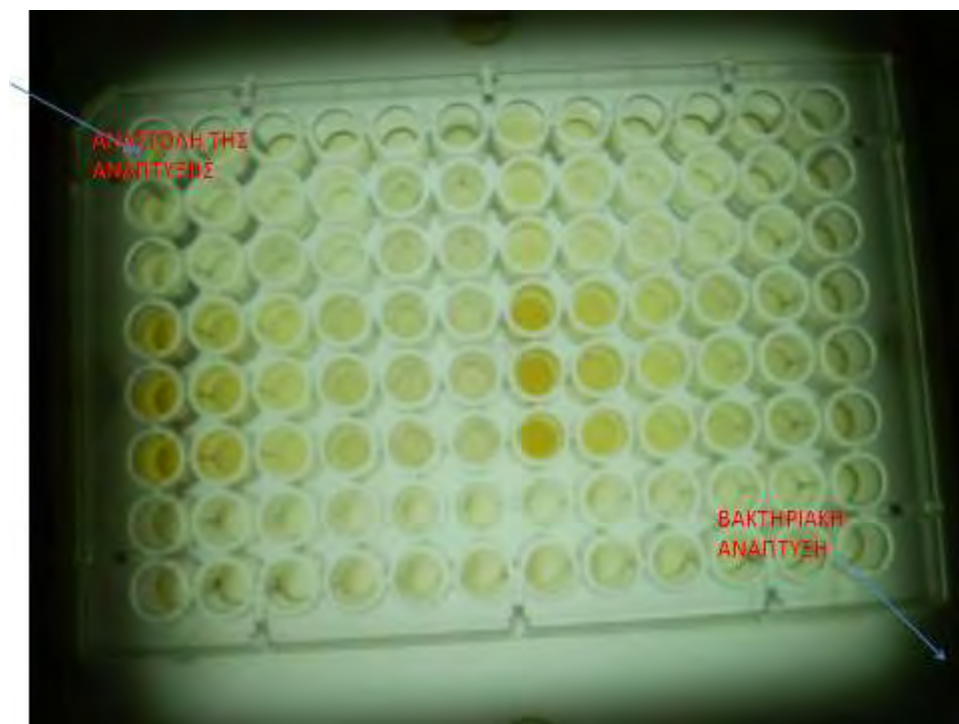
Staphylococcus aureus. Και τα 12 δείγματα μελιού εξετάστηκαν σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις, 50%v/v, 25%v/v, 12,5%v/v, 6,25%v/v, 3,125%v/v και 1,5%v/v. Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 4) φαίνονται τα 12 δείγματα μελιού και το μέλι Manuka 25+ και η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του καθενός (M.I.C) εναντίον του *Staphylococcus aureus*.

Πίνακας 4. Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration, M.I.C) των 12 δειγμάτων μελιών της περιοχής του Ολύμπου και σύγκρισή τους με το αντίστοιχο MIC του μελιού Manuka 25+.

| Μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration, M.I.C) | | |
|--|------------------------|---------------------|
| ΜΕΛΙ | M.I.C δείγματος | M.I.C Manuka |
| 1 ^ο δείγμα τρύγος Ιουλίου, Σαμαράς Γ, Καρυά Ολύμπου | 3,125%v/v | 6,25%v/v |
| 2 ^ο δείγμα Αγριοτριφύλλι, πολλά μικρά ετήσια λουλούδια, Γκρίγκα Ιωάννα, Ελασσόνα Ολύμπου | 6,25%v/v | 6,25%v/v |
| 3 ^ο δείγμα μέλι ανθέων, Σδάνης Νικόλαος και Γεώργιος, Συκεά Ελασσόνας | 3,125%v/v | 6,25%v/v |
| 4 ^ο δείγμα πιθανά μελισσοκομικά φυτά, τριφύλλια, γκορτσιά, κοντορίγανη-λαδανιά, δυς-μελιτώματα, Καρκατσέλας Χαράλαμπος, Παλιαμπέλα Βερδικούσιας Λάρισα, τρύγος 30-07-013 | 6,25%v/v | 6,25%v/v |
| 5 ^ο δείγμα Μάρτιος: αμυγδαλιά, Απρίλιος: ακακία, πεύκο, караγάτσι, ασφόδελος, Μάϊος: παλιούρι, βίκος, καμβαλαριά, αγριολούλουδα, πουρνάρι, Ιούνιος: τσάϊ, μέντα, Ιούλιος: λυγαριά, φουκαλιά, ακακία, αγριοδυσόσμος, αγριοβαμβακιά, αγκαθιά τρύγος Ιούλιος, Τσιπλικιάρης Κων/νος, Δομένικο | 12,5%v/v | 6,25%v/v |
| 6 ^ο δείγμα ακακία, ζαρμπούνι, γαϊδουράγκαθο, ροζ αγκάθι Τρύγος 6-08-2013, Γιούρι Σολκόβσκι, Σκαμνιά Κρυόβρυση | 6,25%v/v | 6,25%v/v |
| 7 ^ο δείγμα ακακία, παλιούρι, βίκος, φακές, μηλιά, αγριολούλουδα, τρύγος 25-06-2013, Σαραντάπορο, Χατζή Μαρία | 6,25%v/v | 6,25%v/v |
| 8 ^ο δείγμα Ιούνιος- Ιούλιος, αγριοτριφύλλο, ακακία, θρούμπη, μέντα, βελανιδιά, μελούρας, Καραλής Νίκος, Κρανιά Ελασσόνας | 6,25%v/v | 6,25%v/v |
| 9 ^ο δείγμα Αζώρο Ελασσόνας, Νταλίπη Χρυσούλα, Μπουρονίκος Δημήτριος | 6,25%v/v | 6,25%v/v |

| | | |
|--|-----------|----------|
| 10 ^ο δείγμα μέλι ανθέων ,Σβαρνάς Αθανάσιος, Βερδικούσια Λαρίσης | 3,125%v/v | 6,25%v/v |
| 11 ^ο δείγμα Πουρσανίδης, Κουρδή Ουρανία, Καλλιθέα Ελασσόνας | 6,25%v/v | 6,25%v/v |
| 12 ^ο δείγμα Σαμαράς Γ, Ιούνης 2012,Καρυά Ολύμπου | 6,25%v/v | 6,25%v/v |

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι τα δείγματα μελιού της περιοχής του Ολύμπου που παρουσιάζουν την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (*Minimum Inhibitory Concentration, M.I.C*) είναι τα δείγματα με τον αριθμό 1,3 και 10 με MIC ίσο με 3,125%v/v με καλύτερη αντιμικροβιακή δράση από το μέλι Μανuka. Τα δείγματα με τον αριθμό 2,4,6,7,8,9,11 και 12 έχουν λιγότερο ισχυρή αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με τα δείγματα 1,3 και 10 με M.I.C ίσο με 6,25%v/v, και ίση αντιμικροβιακή δράση με το μέλι Μανuka. Το δείγμα με τον αριθμό 5 έχει M.I.C ίσο με 12,5%v/v που σημαίνει πως έχει τη μικρότερη αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα μελιού της περιοχής του Ολύμπου και σε σχέση με το μέλι Μανuka. Το M.I.C του μελιού Μανuka βρέθηκε για όλα τα υπό εξέταση δείγματα μελιού ίσο με 6,25%v/v.



Εικ.18 : Στο παραπάνω microtiter plate διακρίνονται τα πηγαδάκια με τις διαδοχικές αραιώσεις των μελιών 11 και 12 και του αντίστοιχου μελιού Manuka.Επίσης φαίνονται και τα πηγαδάκια στα οποία παρατηρείται 100%αναστολή του *S.aureus* και τα πηγαδάκια όπου φαίνεται η ανάπτυξη του συγκεκριμένου βακτηρίου.

3.3 Εκτίμηση των μηχανισμών της αντιμικροβιακής δράσης των μελιών μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης(*Minimum Inhibitory Concentration, M.I.C*) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοδότησης (*microtiter plates*) με τη προσθήκη 2 ενζύμων: α)καταλάσης και β)πρωτεΐνάσης K.

Με τη μέθοδο μικροτιτλοποίησης προσδιορίσαμε την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση που απαιτείται για την αναστολή της ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus*,μετά τη προσθήκη α)καταλάσης και β)πρωτεΐνάσης K. Όλα τα δείγματα μελιού εξετάστηκαν σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις 50%v/v,25%v/v,12,5%v/v,6,25%v/v,3,125%v/v και 1,5%v/v. Στον παρακάτω πίνακα (**πίνακας 5**) φαίνονται τα 12 δείγματα μελιού και η ελάχιστη ανασταλτική τους συγκέντρωση (M.I.C) έναντι του *S.aureus* μετά την προσθήκη α)καταλάσης και β)πρωτεΐνάσης K.

Πίνακας 5: Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης(*Minimum Inhibitory Concentration,M.I.C*) των 12 δειγμάτων μελιών της περιοχής του Ολύμπου έναντι του *Staphylococcus aureus* μετά την προσθήκη α)καταλάσης και β)πρωτεΐνάσης K.

| No ΜΕΛΙ | M.I.C <i>S.aureus</i> | M.I.C με καταλάση | M.I.C με πρωτεΐνάση Κ |
|---------|-----------------------|-------------------|-----------------------|
| 1 | 3,125%v/v | 25%v/v | 3,125%v/v |
| 2 | 6,25%v/v | 25%v/v | 6,25%v/v |
| 3 | 3,125%v/v | 25%v/v | 6,25%v/v |
| 4 | 6,25%v/v | 25%v/v | 6,25%v/v |
| 5 | 12,5%v/v | 25%v/v | 12,5%v/v |
| 6 | 6,25%v/v | 12,5%v/v | 6,25%v/v |
| 7 | 6,25%v/v | 25%v/v | 6,25%v/v |
| 8 | 6,25%v/v | 12,5%v/v | 6,25%v/v |
| 9 | 6,25%v/v | 25%v/v | 6,25%v/v |
| 10 | 3,125%v/v | 25%v/v | 6,25%v/v |
| 11 | 6,25%v/v | 25%v/v | 6,25%v/v |
| 12 | 6,25%v/v | 50%v/v | 6,25%v/v |

Στον παραπάνω πίνακα, παρατηρούμε ότι με τη προσθήκη της καταλάσης, παρατηρείται αύξηση του M.I.C σε όλα τα δείγματα μελιών της περιοχής του Ολύμπου, απ'όπου συμπεραίνουμε πως η αντιβακτηριακή δράση των μελιών έναντι του *S.aureus* οφείλεται στη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂)σε μεγάλες ποσότητες. Στον ίδιο πίνακα παρατηρούμε πως μετά τη προσθήκη της πρωτεΐνάσης Κ, παρατηρήθηκε αύξηση του M.I.C σε 2 μόνο από τα 12 δείγματα μελιών και συγκεκριμένα στα δείγματα 3 και 10, απ'όπου συμπεραίνουμε πως η αντιβακτηριακή δράση των μελιών αυτών οφείλεται και στην ύπαρξη ολιγοπεπτιδίων και άλλων πρωτεϊνών που δρουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη του *S.aureus*. Στα υπόλοιπα 10 δείγματα δεν παρατηρήθηκε αύξηση του M.I.C.

4.Συζήτηση

Από τα αρχαία κιάλας χρόνια ,το μέλι αποτελούσε σημαντικό στοιχείο στη διατροφή των λαών και θεωρούνταν θεραπευτικό και φαρμακευτικό μέσο. Πολλοί γιατροί της αρχαιότητας, ανάμεσά τους και ο Ιπποκράτης το συνιστούσαν σαν φάρμακο σε πολλές περιπτώσεις ([www.users.uoa.gr KALLYNTIKO_21.pdf](http://www.users.uoa.gr/KALLYNTIKO_21.pdf),page5). Στη σημερινή εποχή, λόγω της αλόγιστης χρήσης πολλών αντιβιοτικών έχουν προκύψει ανθεκτικά στελέχη παθογόνων βακτηρίων, τα οποία αναπτύσσονται και εξαπλώνονται συνεχώς, αποτελώντας ένα παγκόσμιο κίνδυνο για την δημόσια υγεία. Γι'αυτό το λόγο η σύγχρονη ιατρική για την θεραπεία πολλών λοιμώξεων και ανθρώπινων παθήσεων 'ανατρέχει' σε παλαιότερες μεθόδους θεραπείας που περιλαμβάνει φυσικά προϊόντα, συμπεριλαμβανομένου και του μελιού(Mandal et al 2011). Τα είδη του μελιού είναι πολλά και διάφορα και διακρίνονται από το φυτό όπου άντλησαν οι μέλισσες (*Apis mellifera*) το νέκταρ, από τη περιοχή προέλευσής τους, και από τον τρόπο παραλαβής τους από τις κηρύθρες. Το μέλι περιέχει πάνω από 180 διαφορετικές ουσίες, όπως νερό σε ποσοστό 16%, διάφορα σάκχαρα, αμινοξέα, οργανικά οξέα, μεταλλικά στοιχεία, ένζυμα, βιταμίνες , φαινολικά οξέα, μονοτερπένια, βιοφλαβονοειδή και πολυφαινόλες, οι οποίες δρουν συνεργιστικά και ευεργετικά για την υγεία του ανθρώπου (www.bee2bee.gr). Πέρα από τις ευεργετικές του επιδράσεις, το μέλι αποτελεί σημαντικός αντιμικροβιακός παράγοντας εναντίον πολλών παθογόνων βακτηρίων όπως της λυστέριας, της ψευδομονάδας, του στρεπτόκοκκου, του σταφυλόκοκκου, του βακτηρίου του άνθρακα και άλλων μικροβίων (Lusby et

al 2005). Η παρουσία οργανικών οξέων(Wahdan 1998), το χαμηλό pH, η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων (Molan 1992) και άλλες αντιμικροβιακές ουσίες όπως η αμυνοσίνη-1(Kwakman et al 2012), διάφορες φαινολικές ενώσεις και ουσίες τερπενικής φύσεως (Wahdan 1998) αποτελούν σημαντικούς ανασταλτικούς παράγοντες της ανάπτυξης πολλών παθογόνων βακτηρίων. Η ουσία που οφείλεται κυρίως για την αντιμικροβιακή δράση του μελιού είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου το οποίο παράγεται από το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης (Molan 1992). Το μέλι Manuka , το οποίο προέρχεται από το αντίστοιχο φυτό στη Ν.Ζηλανδία, έχει χαρακτηριστεί ως το καλύτερο αντιμικροβιακό μέλι παγκοσμίως (Attrot and Henle 2009). Περιέχει πολλές αντιβακτηριακές ουσίες, όπως και υπεροξειδίο του υδρογόνου, αλλά η κύρια αντιβακτηριακή του ουσία είναι μια αλδεϋδη, η μεθυλογλυοξάλη (Mavric et al 2008). Η συγκέντρωση της μεθυλογλυοξάλης (MGO) αναγράφεται πάνω στις συσκευασίες του μελιού.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης μελιών της περιοχής του Ολύμπου. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν 12 δείγματα μελιών όσον αφορά την αντιμικροβιακή τους δράση έναντι του θετικού κατά Gram βακτηρίου *Staphylococcus aureus*, το οποίο εμφανίζει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό μεθικιλίνη (Haddadin et al 2002). Η αντιμικροβιακή τους δράση συγκρίθηκε με την αντίστοιχη του μελιού Manuka25+, του καλύτερου αντιμικροβιακού μελιού παγκοσμίως(Attrot and Henle 2009). Για την εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης των μελιών αυτών εφαρμόστηκαν 2 μέθοδοι: α) η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια(wells diffusion method)(Ahn and Stiles 1990)και β) η μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης(Minimum Inhibitory Concentration, M.I.C) με τη χρήση πλακών μικροτιπλοδότησης (microtiter plates) (Patton et al.2005;Sherlock et al 2010).

Επιπλέον για τη διερεύνηση των μηχανισμών της αντιμικροβιακής δράσης των μελιών της περιοχής του Ολύμπου εφαρμόστηκε η μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration,M.I.C) με τη χρήση πλακών μικροτιπλοδότησης (microtiter plates) με τη προσθήκη 2 ενζύμων: α) καταλάσης και β) πρωτεϊνάσης K.

Όσον αφορά τη πρώτη μέθοδο, αρχικά παρατηρήθηκε πως όλα τα μέλια εμφάνιζαν αντιμικροβιακή δράση έναντι του *S.aureus*. Από τα 12 μέλια, τα μέλια με τον αριθμό 10,12 και 8 εμφάνισαν μεγαλύτερη ζώνη αναστολής σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα και το μέλι Manuka25+. Στη δεύτερη μέθοδο προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης με τη χρήση πλακών μικροτιπλοδότησης, τα μέλια με τον αριθμό1 3και10 ,εμφάνισαν μικρότερη ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση(M.I.C)(3,125%v/v) σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα και το μέλι Manuka25+(6,25%v/v). Στη περίπτωση της

διερεύνησης των μηχανισμών της αντιμικροβιακής δράσης με τη μέθοδο προσδιορισμού του M.I.C με τη προσθήκη 2 ενζύμων: α)καταλάσης και β)πρωτεΐνάσης K, παρατηρήθηκε πως με τη προσθήκη της καταλάσης όλα τα μέλια εμφάνισαν σημαντική αύξηση του M.I.C(από 12.5% μέχρι και 50%v/v). Αυτή η μεγάλη αύξηση του M.I.C υποδηλώνει πως η αντιμικροβιακή δράση και των 12 μελιών οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου(H_2O_2) που δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη του *S.aureus* (Kwakman et al 2010).Με τη προσθήκη του ενζύμου πρωτεΐνάση K παρατηρήθηκε αύξηση του M.I.C στα μέλια με τον αριθμό 3 και 10(από 3,125%v/v σε 6,25%v/v),πράγμα το οποίο δηλώνει πως η αντιμικροβιακή δράση των μελιών αυτών οφείλεται επίσης και στη παραγωγή ολιγοπεπτιδίων και άλλων αντιμικροβιακών πρωτεϊνών (Mundo et al 2004).

Στα υπόλοιπα δείγματα μελιού δεν παρατηρήθηκε αύξηση του M.I.C. Αυτό που διαπιστώνεται είναι πως από τα 12 δείγματα μελιού της περιοχής του Ολύμπου, το μέλι με τον αριθμό 10(μέλι ανθέων, Βερδικούσια Λαρίσης) εμφάνισε τα καλύτερα αποτελέσματα και στις 2 μεθόδους. Επομένως αυτό που συμπεραίνουμε είναι πως στη πρώτη μέθοδο, τα 12 δείγματα μελιών της περιοχής του Ολύμπου εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση έναντι του *S.aureus*, από τα οποία τα 3(αριθ.8,10 και 12) είχαν σημαντικά μεγαλύτερη ζώνη αναστολής σε σχέση με το μέλι Manuka25+, τα υπόλοιπα δείγματα είχαν μεγαλύτερη ή σε κάποιες περιπτώσεις όπως στα δείγματα 2 και 11 εφάμιλλη ζώνη αναστολής σε σχέση με το μέλι Manuka25+, ενώ υπήρξε ένα δείγμα μελιού(αριθ.5) το οποίο είχε εφάμιλλη ή μικρότερη ζώνη αναστολής σε σχέση με το μέλι Manuka25+. Στη δεύτερη μέθοδο παρατηρούμε πως μόνο 3 δείγματα μελιού της περιοχής του Ολύμπου(αριθ.1,3και10) εμφάνισαν μικρότερη ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (M.I.C) σε σχέση με το μέλι Manuka25+, τα υπόλοιπα δείγματα είχαν ίδιο M.I.C με το μέλι Manuka25+,ενώ πάλι το δείγμα 5 εμφάνισε μεγαλύτερο M.I.C σε σχέση με το μέλι Manuka25+ που σημαίνει, πως λόγω της ευαισθησίας αυτής της μεθόδου, έχει τη μικρότερη αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα μελιού και το μέλι Manuka25+. Στη τρίτη μέθοδο τέλος διαπιστώνουμε πως σε όλα τα δείγματα με τη προσθήκη του ενζύμου καταλάση παρατηρήθηκε αύξηση του M.I.C σε όλα τα δείγματα μελιών της περιοχής του Ολύμπου, πράγμα το οποίο σημαίνει πως όλα τα μέλια έχουν υψηλή συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου(H_2O_2) που δρα ως αντιμικροβιακός παράγοντας έναντι το *S.aureus* (Kwakman et al 2010), ενώ με τη προσθήκη του ενζύμου πρωτεΐνάση K παρατηρήθηκε αύξηση του M.I.C σε 2 μόνο δείγματα, πράγμα το οποίο σημαίνει πως σε αυτά τα 2 μέλια εκτός από το υπεροξειδίο του υδρογόνου(H_2O_2) υπάρχουν και ολιγοπεπτιδία ή

αντιμικροβιακές ουσίες που συμβάλλουν στην αντιμικροβιακή δράση (Mundo et al 2004).

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν τη βάση για περαιτέρω έρευνα όσον αφορά α) την εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης μελιών και από άλλες περιοχές της Ελλάδας έναντι παθογόνων βακτηρίων όπως του *S.aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *listeria monocytogenes* και άλλων παθογόνων μικροβίων και β) τη διερεύνηση και άλλων μηχανισμών που πιθανόν προκαλούν αντιμικροβιακή δράση έναντι των παθογόνων βακτηρίων όπως της μεθυλογλυοξάλης, διαφόρων οργανικών οξέων, αμινοξέων, φλαβονοειδών, πολυφαινολών κ.α.

5.Βιβλιογραφία

- **Adams C.J, Manley-Harris M., Molan P.C** 2009 *The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (Leptospermum scoparium) honey. Carbohydr Res 344:1050– 1053*
- **Ahn, C., Stiles, M.E.,** 1990. *Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed meats. Journal of Applied Bacteriology 69, 302– 310.*
- **Allen K.L, Molan P.C, Reid G.M** 1991 *A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. J Pharm Pharmacol 43: 817– 822*
- **Atrott J. and Henle T.,** 2009 *Methylgluoxal in Manuka Honey- Correlation with Antibacterial Properties ,Czech J Food Sci, vol 27 special Issue*
- **Cooper R.A, Molan P.C, Harding K.C,** 1999 *Antibacterial activity of honey against strains of Staphylococcus aureus from infected wounds , Journal of the Royal Society of Medicine (Impact Factor: 1.72),92(6):283-285*
- **David M. Z., Daum R. S.,** 2010 *Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic, Clin Microbiol Rev23(3):616-687*
- **Gomez-caravaca Am., Gomez-Romero M., arraez-Roman D., segura-carretero A., Fernandez Gutierrez,**2006 *advances A in the*

analysis of phenolic compounds in products derived from bees. Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis. 2006; 41:1220–1234

- **Gosbell I. B**, 2004 *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus*, *American Journal of Clinical Dermatology* Volume 5, Issue 4, pp239-259
- **Haddadin A.S, Fappiano A.S, Lipsett P.A** 2002 *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in the intensive care unit* *Postgrad Med J*:78:385-392
- **Kwakman P.H.S and Zaat S.A.J** 2012 *Antibacterial components of honey* *IUBMB Life*, 64(1):48-55
- **Kwakman P.H, Te Velde A.A, de Boer L., Speijer D., Vandenbroucke-Grauls**, 2010 *CM, Zaat SA: How honey kills bacteria. FASEB J* 2010, 24:2576-2582
- **Lusby P. E., Coombes A.L., Wilkinson J.M.** 2005 *Bactericidal Activity of Different Honeys against Pathogenic Bacteria* *Archives of Medical Research* 36 :464-467
- **Mandal M.Deb, Mandal S.** 2011 *Honey: It's medicinal property and antibacterial activity* *Asian Pac Trop Biomed*;1(2) 154-180
- **Masalha M., Borovok I.,[...], and Cohen G.** 2001 *Analysis of Transcription of the Staphylococcus aureus Aerobic Class Ib and Anaerobic Class III Ribonucleotide Reductase Genes in Response to Oxygen*, *J Bacteriol*183(24):7260-7272
- **Mavric E., Wittmann S., Barth G. and 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.*,52 000-000
- **Molan P.C**, 1992 *The antibacterial nature of honey. 1. The nature of the antibacterial activity.* *Bee World*, 73(1):5-28

- **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*
- **Patton T., Barrett J., Brennan J., Moran N., 2006** *Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey, Institute of technology Sligo, IT Sligo, Ballinode, Sligo, Ireland 64(1):84-95*
- **Sherlock O., Dolan A., Athman R., Power A., Gethin G., Cowman S., Humphreys H., 2010** *Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa, 10:47*
- **Wahdan H.A.L 1998** *Causes of antimicrobial activity of honey volume 26 issue 1,pp 26-31*
- **Wallace A., Eady S., Miles M., Martin H., McLachlan A., Rodier M., Willis J., Scott R. and Sutherland J., 2009** *Demonstrating the safety of manuka honey UMF20+in a human clinical trial with healthy individuals,page 1of 6*
- **White J.W. Jr, 1993** *Honey, in the hive and the honey bee, Dadant and Sons Publication Hamilton- Illinois p.p. 869-895*
- **Zander E., Maurizio A., 1984** *Der Honig ulmer Verlag Stuttgart*
- **Νικολόπουλος Ν. Χ., 1965** *Μορφολογία και βιολογία του είδους Marchalina hellenica (Gennadius), Έκδοση της Ανώτατης Γεωπονικής Σχολής Αθηνών pg..32*
- **Καϊλίδης Σ.Δ., 1965** *Monophlebus hellenicus (Marchalina hellenica) Genn, Το μελισσοτροφικό έντομο της πεύκης, Δασικά χρονικά 81/82 (7-8): 1-16*
- **Τυπάλδος – Ξυδιάς Α., 1979** *Θάσος και Κασσάνδρα: οι μεγαλύτερες μελισσοκομικές περιφέρειες της Ελλάδας, Μελισσοκομική Ελλάς (29): 105-111*

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

www.melissoktima.blogspot.gr

www.kynigos.net.gr

www.omse.gr

www.el.wikipedia.org

www.nefeli.lib.teicrete.gr

www.melifotopoulos.gr

www.melisokomiki.eu

www.bee2bee.gr

www.melissomania.gr

www.xmbeekeeping.eu

www.geaolympou.gr

www.users.uoa.gr

www.apitherapy.blogspot.gr

www.healthnotesandnews.blogspot.gr

www.webmd.com

www.honeycentre.com

www.ray4goodkarma.wordpress.com

www.neogen.com

www.sigmaaldrich.com

