



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕΛΙΩΝ ΤΗΣ ΣΤΕΡΕΑΣ
ΕΛΛΑΔΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΑΓΙΟΥ ΟΡΟΥΣ ΕΝΑΝΤΙ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ
ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ»



ΛΑΜΠΡΗ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2020

«Μελέτη της αντιβακτηριακής δράσης μελιών της Στερεάς Ελλάδας και του Αγίου Όρους έναντι κλινικών παθογόνων και παθόγονων τροφίμων»

“Examination of the antibacterial activity of honey derived from Central Greece Region and Mount Athos against clinical and food pathogens”

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Μόσιαλος Δημήτριος (επιβλέπων): 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

Αμούτζιας Γρηγόριος : Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοπληροφορικής με έμφαση στην Μικροβιολογία του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες:

Με το πέρας της εργασίας αυτής και τη συγγραφή της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι υποχρέωση μου να ευχαριστήσω τους ανθρώπους εκείνους, οι οποίοι με βοήθησαν και συνέβαλαν, με οποιονδήποτε τρόπο, στην πραγματοποίησή της. Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων-Μοριακής Βακτηριολογίας-Ιολογίας, στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Πρωτίστως, ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Μόσιαλο Δημήτριο, τόσο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθοδήγηση και την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, όσο και για τις επιστημονικές γνώσεις και εμπειρίες που μου μετέδωσε καθ' όλη τη διάρκεια της.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, τον κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη και τον κ. Αμούτζια Γρηγόριο, καθώς και όλη την ομάδα του εργαστηρίου για την άριστη συνεργασία και ιδιαιτέρως την Χαραλάμπους Ελένη, απόφοιτη του μεταπτυχιακού προγράμματος Βιοτεχνολογία - Ποιότητα διατροφής & Περιβάλλοντος, η οποία με καθοδήγησε και με βοήθησε σε κάθε βήμα των πειραμάτων μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, οι οποίοι στήριξαν τις σπουδές μου και πίστεψαν σε μένα, φροντίζοντας για τη καλύτερη δυνατή μου μόρφωση και γενικά όλους τους δικούς μου ανθρώπους καθώς χωρίς αυτούς, αρωγούς και συνοδοιπόρους, δεν θα μπορούσα να πετύχω τους στόχους μου και τα όνειρα μου.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	8
Abstract.....	9
1. Εισαγωγή.....	10
1.1 Τι ακριβώς είναι το μέλι;	10
1.1.1 Ιστορική Αναδρομή	11
1.1.2 Ευεργετικές Ιδιότητες	11
1.2 Σύσταση του μελιού	12
1.2.1 Σάκχαρα.....	12
1.2.2 Πρωτεΐνες.....	13
1.2.3 Αμινοξέα	13
1.2.4 Οργανικά Οξέα	13
1.2.5 Βιταμίνες	14
1.2.6 Ιχνοστοιχεία.....	14
1.2.7 Φαινολικές Ενώσεις.....	14
1.2.8 Νερό	15
1.3 Τα είδη μελιού.....	15
1.3.1 Μέλι Ανθέων	16
1.3.2 Μέλι Πεύκου.....	16
1.3.3 Μέλι Καστανιάς	17
1.3.4 Μέλι Κουμαριάς	17
1.3.5 Μέλι Σουσούρας	18
1.3.6 Μέλι Θυμαρίσιο.....	19
1.3.7 Μέλι Γλυκάνισου	19
1.3.8 Μέλι Ελάτης.....	19
1.4 Αντιμικροβιακές Ιδιότητες Μελιού	20
1.4.1 Παράγοντες αντιβακτηριακής δράσης	21
1.5 Το Μέλι Manuka.....	24
1.6 Βακτηριακά Είδη.....	26
1.6.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	26
1.6.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
1.6.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	29
1.6.4 <i>Acinetobacter baumannii</i>	30
1.6.5 <i>Citrobacter freundii</i>	31
1.6.6 <i>Salmonella typhimurium</i>	32

1.6.7 <i>Salmonella infantis</i>	33
2. Σκοπός της Παρούσας Εργασίας	35
3. Υλικά και Μέθοδοι	36
3.1 Υλικά.....	36
3.1.1 Δείγματα Μελιών.....	37
3.1.2 Μέλι Manuka	38
3.2. Μέθοδοι.....	38
3.2.1 Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration, MIC).	38
3.2.2 Προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (Minimum Bactericidal Concentration, MBC).	39
3.3 Πειραματική διαδικασία.....	39
3.3.1 Παρασκευή Καλλιέργειας Βακτηρίων	39
3.3.2 Παρασκευή Αραιωμένων Δειγμάτων	40
3.3.3 Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration, MIC).	40
3.3.4 Προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (Minimum Bactericidal Concentration, MBC).	42
4. Αποτελέσματα.....	43
4.1 Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration) και της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (Minimum Bactericidal Concentration)	43
4.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	43
4.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
4.1.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	45
4.1.4 <i>Acinetobacter baumannii</i>	46
4.1.5 <i>Citrobacter freundii</i>	46
4.1.6 <i>Salmonella typhimurium</i>	47
4.1.7 <i>Salmonella infantis</i>	48
4.2 Προσδιορισμός της ακριβής ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration)	49
4.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	49
4.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
4.2.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	51
4.2.4 <i>Acinetobacter baumannii</i>	51
4.2.5 <i>Citrobacter freundii</i>	52
4.2.6 <i>Salmonella typhimurium</i>	53

4.2.7 <i>Salmonella infantis</i>	53
5. Συζήτηση	55
6. Βιβλιογραφία	59

Περίληψη

Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το χαμηλό pH, η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, οι φαινολικές ενώσεις αλλά και οι πρωτεϊνικές φύσεως ουσίες. Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η εξετάση οκτώ δειγμάτων μελιών από διαφορετική βοτανική προέλευση από την ευρύτερη περιοχή της Στερεάς Ελλάδος και από την χερσόνησο του Άθω, για την εκτίμηση της ικανότητας τους να αναστέλλουν και να θανατώνουν τα εξής βακτήρια: το *Staphylococcus aureus*, τη *Pseudomonas aeruginosa*, το *Acinetobacter baumannii*, τη *Klebsiella pneumoniae*, το *Citrobacter freundii*, τη *Salmonella typhimurium* και τη *Salmonella infantis*. Η ικανότητα τους αυτή συγκρίθηκε με το μέλι Manuka, γνωστό για την ισχυρή αντιβακτηριακή του δράση. Για την εκτίμηση της αντιβακτηριακής ικανότητας των μελιών, χρησιμοποιήθηκε η *in vitro* μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*Minimum Inhibitory Concentration, MIC*) και για τη διάκριση τους σε αυτά με βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνο δράση, χρησιμοποιήθηκε η *in vitro* μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (*Minimum Bactericidal Concentration, MBC*). Συμπερασματικά, τα μέλια της περιοχής του Στερεάς Ελλάδος και του Αγίου Όρους, παρουσίασαν ανασταλτική και βακτηριοκτόνο δράση έναντι και των επτά παθογόνων βακτηρίων. Επίσης, σε σύγκριση με το μέλι Manuka, εμφάνισαν εφάμιλλη ή μικρότερη δράση. Έτσι, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, δημιουργούνται νέες προοπτικές για τη θεραπευτική δράση και χρήση του μελιού της Ελλάδος, καθώς και για τη χρήση του ως φυσικό συντηρητικό τροφίμων.

Abstract

The antimicrobial activity of honey is due to various factors, such as hydrogen peroxide, low pH, high sugar concentration, phenolic compounds and protein substances. The aim of the present study was to examine eight specimens of honey from different botanical origins in the wider area of Central Greece and Mount Athos, and to evaluate their ability to inhibit and kill these bacteria: *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella typhimurium* and *Salmonella infantis*. These activities were compared to Manuka honey which is used as an alternative medicine. In order to evaluate the antibacterial capacity of the honeys, the in vitro method of determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was used and to distinguish them with bacteriostatic or bactericidal activity, the in vitro method of determining the minimum bactericidal concentration (MBC) was used. In conclusion, honeys from the region of Central Greece and Mount Athos showed inhibitory and bactericidal activity against all seven pathogenic bacteria. Also, compared to Manuka honey, they exhibited comparable or lesser action. Thus, according to the results, new prospects are created for the therapeutic action and use of Greek honey, as well as for its use as a natural food preservative.

1. Εισαγωγή

1.1 Τι ακριβώς είναι το μέλι;

Μέλι είναι η φυσική γλυκιά ουσία που παράγουν οι μέλισσες του είδους *Apis mellifera* από το νέκταρ των φυτών ή από εκκρίσεις ζώντων μερών φυτών ή από εκκρίματα εντόμων απομυζούντων φυτά. Οι μέλισσες συλλέγουν το μέλι, το μετατρέπουν αναμειγνύοντάς το με ειδικές ύλες του σώματός τους, το αποθέτουν, το αφυδατώνουν, το εναποθηκεύουν και το φυλάσσουν στις κηρήθρες της κυψέλης, προκειμένου να ωριμάσει (Κοινοτική Οδηγία Ευρωπαϊκής Ένωσης 2014/63).

Το μέλι είναι ένα φυσικό τρόφιμο, το οποίο αποτελείται κυρίως από σάκχαρα και άλλα συστατικά όπως ένζυμα, αμινοξέα, οργανικά οξέα, καροτενοειδή, βιταμίνες, μέταλλα και αρωματικές ουσίες. Είναι πλούσιο σε φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα που παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών επιδράσεων και δρουν ως φυσικά αντιοξειδωτικά. Η σύνθεση, το χρώμα, το άρωμα και η γεύση του μελιού εξαρτώνται κυρίως από τα άνθη, τις γεωγραφικές περιοχές, το κλίμα και τα είδη μελισσών που εμπλέκονται στην παραγωγή του και επηρεάζονται επίσης από τις καιρικές συνθήκες, την επεξεργασία, τον χειρισμό, τη συσκευασία και το χρόνο αποθήκευσης (Escuredo et al. 2014).

Αξίζει να αναφερθεί πως το μέλι αποτελεί πολυσύνθετο φυσικό προϊόν της παγκόσμιας και ελληνικής αγροτικής παραγωγής και η οικονομική συμβολή στην αγροτική παραγωγή της χώρας μας, είναι σημαντική. Η συνολική ετήσια παραγωγή μελιού κυμαίνεται από 10.000 έως 14.000 τόνους. Το παραγόμενο μέλι περιλαμβάνει μέλι από νέκταρ, στο οποίο συγκαταλέγονται τα διάφορα ανθόμελα (καστανιάς, θυμαριού, πορτοκαλιάς, βαμβακιού, ηλιάνθου, ερείκης κ.ά.) και το μέλι από μελιτώματα (πεύκου, έλατου, βελανιδιάς κ.ά.). Οι μεγαλύτερες ποσότητες προέρχονται από το πεύκο (60-65%), το έλατο (10%) και το θυμάρι (15%), ενώ δεν υπάρχουν ακριβή στοιχεία για την παραγωγή άλλων προϊόντων, όπως γύρης, βασιλικού πολτού, πρόπολης και κεριού (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων) (Θρασυβούλου, 1998).

1.1.1 Ιστορική Αναδρομή

Το μέλι από την αρχαιότητα, αποτελούσε σημαντική τροφή για τον άνθρωπο. Οι μέλισσες αποτελούν μια από τις αρχαιότερες μορφές ζωής. Από τους προϊστορικούς χρόνους, συγκεκριμένα από το 7000 π.Χ. που ξεκινάει η λίθινη εποχή του *Homo sapiens*, οι άνθρωποι ήξεραν να παίρνουν το μέλι και να το χρησιμοποιούν στη διατροφή τους αλλά και σαν φάρμακο στην Ιατρική. Επί πολλούς αιώνες το μέλι ήταν η μόνη γνωστή γλυκαντική ουσία. Στους περισσότερους αρχαίους πολιτισμούς το μέλι χρησιμοποιήθηκε τόσο για θρεπτικούς όσο και ιατρικούς σκοπούς, ως παραδοσιακό φάρμακο για την επούλωση εσωτερικών και εξωτερικών πληγών, για την αντιμετώπιση κοινών κρυολογημάτων και άλλων παθήσεων του οργανισμού (Alvarez-Suarez et al., 2010).

1.1.2 Ευεργετικές Ιδιότητες

Το μέλι έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλούς πολιτισμούς για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης της θεραπείας για εγκαύματα, καταρράκτη, έλκη και επούλωση πληγών, καθώς έχει καταπραϊντική δράση όταν εφαρμόζεται σε ανοιχτά τραύματα. Εκτός από την επούλωση, το μέλι έχει επίσης χρησιμοποιηθεί ως συντηρητικό για άλλα τρόφιμα, λόγω της αντιμικροβιακής του δράσης (Krushna et al., 2006). Η κατανάλωσή του από τον άνθρωπο έχει συνδεθεί με πλήθος ευεργετικών επιδράσεων στην υγεία και τη μακροζωία.

Λαμβάνοντας υπόψη τις φυσικές του ιδιότητες, το μέλι παρέχει στον οργανισμό ένα φράγμα προστασίας και, λόγω της υψηλής οσμωτικότητας του, δημιουργεί ένα υγρό θεραπευτικό περιβάλλον στην πληγή με μια μορφή που δεν κολλάει στους τραυματισμένους ιστούς. Αυτό το υγρό περιβάλλον γύρω από την πληγή πιστεύεται ότι εμποδίζει τον αποικισμό βακτηρίων. Έτσι, το μέλι μειώνει τη φλεγμονή και μειώνει επίσης το σχηματισμό του εξιδρώματος πιο γρήγορα από τις συνήθεις διαδικασίες (Coulston, 2000).

1.2 Σύσταση του μελιού

Η σύνθεση του μελιού είναι μεταβλητή και εξαρτάται κυρίως από την πηγή της χλωρίδας που χρησιμοποιείται. Ωστόσο επηρεάζεται και από ορισμένους εξωτερικούς παράγοντες, όπως οι εποχιακοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες και η επεξεργασία του. Το μέλι περιέχει τουλάχιστον 200 ουσίες (Chow, 2002). Είναι ένα υπερκορεσμένο διάλυμα σακχάρων, αποτελούμενο κυρίως από φρουκτόζη και γλυκόζη, που περιέχει επίσης μεταλλικά στοιχεία, πρωτεΐνες, ελεύθερα αμινοξέα, ένζυμα και βιταμίνες (Pérez, 2002). Υπάρχει ακόμη ένα μεγάλο εύρος από δευτερεύοντα συστατικά, επίσης παρόν στο μέλι, πολλά από τα οποία είναι γνωστό ότι έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Αυτά περιλαμβάνουν φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή, ορισμένα ένζυμα (οξειδάση γλυκόζης και καταλάση) και αμινοξέα (Dimitrova, 2007). Τα κύρια συστατικά του μελιού αναφέρονται παρακάτω.

1.2.1 Σάκχαρα

Τα σάκχαρα στο μέλι αντιπροσωπεύονται από μονοσακχαρίτες, γλυκόζη και φρουκτόζη, ακολουθούμενοι από δισακχαρίτες, σακχαρόζη, μαλτόζη και άλλα. Η σύνθεση του σακχάρου εξαρτάται κυρίως από τη βοτανική προέλευση του μελιού (είδη των λουλουδιών που χρησιμοποιούνται από τις μέλισσες), τη γεωγραφική προέλευση και επηρεάζεται από το κλίμα, την επεξεργασία και την αποθήκευση (Tornuk et al., 2013). Η συγκέντρωση της φρουκτόζης και της γλυκόζης, καθώς και η αναλογία μεταξύ αυτών, είναι χρήσιμοι δείκτες για την ταξινόμηση των μελιών. Σε σχεδόν όλους τους τύπους μελιού, η φρουκτόζη είναι ο μεγαλύτερος κατά βάρος υδατάνθρακας, εκτός από μερικά μέλια όπως το *Brassica napus* και το *Taraxacum officinale*, όπου το κλάσμα της γλυκόζης μπορεί να είναι υψηλότερο από το κλάσμα της φρουκτόζης (Escuredo et al., 2014), και κατά συνέπεια να έχουν ταχεία κρυστάλλωση.

1.2.2 Πρωτεΐνες

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες του μελιού ποικίλλει ανάλογα με τα είδη των μελισσών. Για παράδειγμα, το μέλι από μέλισσες *Apis Cerana* περιέχει από 0,1% έως 3,3% πρωτεΐνη, ενώ το μέλι από μέλισσες *Apis Mellifera* περιέχει μεταξύ 0,2% και 1,6% πρωτεΐνη (Won, Li, Kim & Rhee, 2009). Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα στα μέλια οφείλονται τόσο σε ζωικές όσο και σε φυτικές πηγές, συμπεριλαμβανομένων των υγρών και των εκκρίσεων νέκταρ των σιελογόνων αδένων και του φάρυγγα των μελισσών (Sak-Bosnar & Sakas, 2012).

1.2.3 Αμινοξέα

Τα αμινοξέα είναι υπεύθυνα για το 1% των συστατικών του μελιού και οι σχετικές αναλογίες τους εξαρτώνται από την προέλευση του μελιού (νέκταρ ή μέλι). Το πιο άφθονο αμινοξύ στο μέλι και τη γύρη είναι η προλίνη (Iglesias et al., 2006). Εκτός από την προλίνη, περιέχονται και άλλα αμινοξέα στο μέλι όπως για παράδειγμα το γλουταμικό οξύ, το ασπαρτικό οξύ, η γλουταμίνη και ιστιδίνη (Girolamo, D'amato & Righetti, 2012).

1.2.4 Οργανικά Οξέα

Σύμφωνα με έρευνες, όλα τα μέλια έχουν ελαφρά οξύτητα, ως αποτέλεσμα των ορισμένων οργανικών οξέων (Karabagias et al., 2014). Αυτά τα οργανικά οξέα προέρχονται από τα σάκχαρα από τα ένζυμα που εκκρίνουν οι μέλισσες όταν μετασχηματίζουν το νέκταρ στο μέλι ή όταν λαμβάνονται απευθείας από το νέκταρ. Τα οργανικά οξέα χρησιμοποιούνται επίσης για να διακρίνουν τα μέλια ανάλογα με τη βοτανική ή τη γεωγραφική τους προέλευση. Αυτά τα οξέα σχετίζονται επίσης με το χρώμα και τη γεύση του μελιού, καθώς και τις χημικές του ιδιότητες όπως η οξύτητα, το pH και η ηλεκτρική αγωγιμότητα. Ορισμένα οργανικά οξέα από διάφορες περιοχές του κόσμου είναι παρόντα στο μέλι ως οξέα: ασπαρτικό οξύ, βουτυρικό,

κιτρικό, οξικό, μυρμηκικό, φουμαρικό και άλλα, ενώ το κυρίαρχο οξύ στο μέλι είναι το γλυκονικό οξύ. (Mato et al., 2003).

1.2.5 Βιταμίνες

Το μέλι περιέχει μικρές ποσότητες βιταμινών, ειδικά του συμπλέγματος βιταμίνης Β, οι οποίες προέρχονται από τους κόκκους γύρης σε εναιώρημα. Οι βιταμίνες που βρίσκονται στο μέλι περιλαμβάνουν τη θειαμίνη (Β1), τη ριβοφλαβίνη (Β2), το νικοτινικό οξύ (Β3), το παντοθενικό οξύ (Β5), την πυριδοξίνη (Β6), τη βιοτίνη (Β8 ή Η) και το φολικό οξύ (Β9). Η βιταμίνη C βρίσκεται σχεδόν σε όλους τους τύπους μελιού και έχει αξιολογηθεί κυρίως λόγω της αντιοξειδωτικής της δράσης. Οι βιταμίνες που περιέχονται στο μέλι διατηρούνται λόγω του χαμηλού pH του μελιού (Bonté & Desmoulière, 2013).

1.2.6 Ιχνοστοιχεία

Διάφορες ομάδες χημικών ενώσεων έχουν ανιχνευθεί σε διαφορετικούς τύπους μελιού. Αυτές οι χημικές ομάδες περιλαμβάνουν ανόργανα άλατα όπως το κάλιο, το μαγνήσιο, το ασβέστιο, ο σίδηρος και άλλα σημαντικά για τη διατροφή του ανθρώπου στοιχεία. Το μέλι αντικατοπτρίζει τα χημικά συστατικά των φυτών από τα οποία οι μέλισσες συλλέγουν την τροφή τους, οπότε η περιεκτικότητα των ιχνοστοιχείων στο μέλι εξαρτάται από το είδος του εδάφους στο οποίο βρέθηκαν το φυτό και το νέκταρ και μπορεί να υποδεικνύει τη βοτανική προέλευση συγκεκριμένου μελιού (Madejczyk και Baralkiewicz , 2008).

1.2.7 Φαινολικές Ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις είναι μια χημικά ετερογενής ομάδα, με περίπου 10.000 ενώσεις, οι οποίες ομαδοποιούνται σε διαφορετικές κατηγορίες σύμφωνα με τη βασική χημική δομή τους. Μπορούν να χωριστούν σε μη φλαβονοειδή και φλαβονοειδή . Οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στο μέλι είναι

παρούσες με τη μορφή φλαβονοειδών (Cortes et al., 2011). Τα φλαβονοειδή που υπάρχουν στο μέλι συμβάλλουν σημαντικά στο χρώμα του, τη γεύση και το άρωμα του (Alzahraní et al., 2012). Επίσης, συμβάλλουν εξαιρετικά και στην αντιοξειδωτική δράση του μελιού με ευεργετικά αποτελέσματα για την υγεία (da Silva et al., 2016).

1.2.8 Νερό

Τέλος, ένα από τα συστατικά του μελιού είναι και το νερό. Η περιεκτικότητα του μελιού σε νερό κυμαίνεται μεταξύ 13-25%, με το βέλτιστο περίπου στο 17% και σχετίζεται με διάφορους παράγοντες, όπως η βοτανική και γεωγραφική προέλευση του νέκταρ, οι εδαφοκλιματικές συνθήκες, η εποχή συγκομιδής, ο βαθμός ωρίμανσης και ο χειρισμός από τους μελισσοκόμους κατά τη διάρκεια της συγκομιδής, επεξεργασίας και αποθήκευσης του. Ορισμένες άλλες ιδιότητες του μελιού, όπως το χρώμα, η κρυστάλλωση, το ιξώδες, η γεύση και η πυκνότητα επηρεάζονται επίσης από το περιεχόμενο του σε νερό (De-Melo et al., 2017).

1.3 Τα είδη μελιού

Τα μέλια ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την προέλευση τους. Τα μέλια ανθέων (ή νέκταρ) που προέρχονται από το νέκταρ των φυτών, όπως το μέλι πορτοκαλιάς, θυμαριού, ευκάλυπτου, δεντρολίβανου, λεβάντας, λυγαριάς, ακακίας είναι μερικά από τα μέλια που προέρχονται από το νέκταρ που παράγουν τα αντίστοιχα φυτά. Τα μέλια μελιτώματος που προέρχονται από τους φυσικούς χυμούς των φυτών και των εντόμων που τρέφονται από τα φυτά αυτά, όπως το μέλι του πεύκου και του ελάτου (Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990). Η χημική σύνθεση του μελιού ποικίλλει από είδος σε είδος. Παρακάτω περιγράφονται κάποια από τα είδη ελληνικού μελιού και οι χαρακτηριστικές τους ιδιότητες.

1.3.1 Μέλι Ανθέων

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. Το μέλι ανθέων παράγεται σε μεγάλες ποσότητες και είναι μέλι που μπορεί να παράγει ακόμη και ένας άπειρος μελισσοκόμος. Το χρώμα του συνήθως είναι ανοιχτόχρωμο και η κρυστάλλωση του γίνεται συνήθως 4-6 μήνες μετά τη συλλογή του. Θεωρείται ως ένα κλασσικό ελληνικό μέλι που μαζί με το πευκόμελο υπερβαίνουν το 80% του ποσοστού της συνολικής ελληνικής παραγωγής. Λόγω της μαζικής και εύκολης παραγωγής του και επειδή το μέλι ανθέων δεν έχει διακριτά στοιχεία, πολλοί μελισσοκόμοι και τυποποιητές το αναμειγνύουν με διάφορα μέλια τα οποία είναι ταυτοποιημένα (π.χ. βαμβακιού) χωρίς να το αναφέρουν στην συσκευασία, ξεγελώντας τον αγοραστή.

1.3.2 Μέλι Πεύκου

Ένα εξίσου κλασσικό μέλι είναι το πευκόμελο, αφού το 65% περίπου της συνολικής παραγωγής του μελιού στην Ελλάδα, είναι πευκόμελο. Το μέλι προέρχεται από τις μελιτώδεις εκκρίσεις του εντόμου *Marchalina hellenica* γνωστό ως «βαμβακάδα», «εργάτης», «μικρόβιο» ή «παράσιτο» του πεύκου. Ο «εργάτης» βρίσκεται σε αρκετές περιοχές της χώρας και κυρίως στη Θάσο, στη Χαλκιδική, στην Εύβοια, στη Σκόπελο, στη Σκιάθο, στη Ζάκυνθο, στη Ρόδο και στην Κρήτη. Παρουσιάζει ένα έντονο σκούρο χρώμα, ενώ αυτό 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. Λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης σακχάρων που περιέχει δεν είναι ιδιαίτερα γλυκό στη γεύση και συνεπώς σακχαρώνεται σχετικά αργά, αφού η φυσική περιεκτικότητά του σε γλυκόζη είναι χαμηλή. Τα αμιγή πευκόμελα παραμένουν ρευστά, χωρίς να κρυσταλλώνουν, για περισσότερο από ενάμιση χρόνο. Το πευκόμελο θεωρείται μέλι υψηλής θρεπτικής αξίας και αυτό οφείλεται κυρίως 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).

1.3.3 Μέλι Καστανιάς

Παράγεται από το νέκταρ και τις μελιτώδεις εκκρίσεις της Καστανιάς (*Castanea sativa*), που είναι αξιόλογο μελισσοκομικό φυτό και αρκετά διαδεδομένο στην ορεινή ζώνη της χώρας μας. Στη Μακεδονία το μέλι καστανιάς συλλέγεται κυρίως στην χερσόνησο του Άθω (Άγιο Όρος). Οι μελιτώδεις εκκρίσεις παράγονται από την αφίδα *Myzocallis castanicola* που εγκαθίσταται στην κάτω επιφάνεια των φύλλων, αλλά και πάνω στα εχινόμορφα κύπελλα που περιβάλλουν τους καρπούς. Οι μελιτώδεις εκκρίσεις ξεκινούν τον Μάιο και συνεχίζονται μέχρι τον Ιούλιο και αργότερα (Santas, 1995). Ως προς το χρώμα ποικίλει ανάλογα με τον τόπο προέλευσης από ανοικτό μέχρι σκούρο καφέ, ακόμα και μαύρο όταν πρόκειται για μελίτωμα. Η γεύση του είναι δυνατή, έντονη, πικρή και με διάρκεια και συνοδεύει την δυνατή εντύπωση που προκαλεί το άρωμά του. Η γεύση και το άρωμα του μελιού καστανιάς είναι τόσο δυνατό και χαρακτηριστικό, που μια μικρή αναλογία του υπερκαλύπτει τη γεύση άλλων μελιών. Αποτελεί επίσης και ένα φυσικό φάρμακο καθώς το μέλι καστανιάς επιταχύνει την κυκλοφορία του αίματος και δρα ως στυπτικό σε μερικές περιπτώσεις δυσεντερίας (Θρασυβούλου και Μανίκη, 1993).

1.3.4 Μέλι Κουμαριάς

Το μέλι κουμαριάς συλλέγεται από τις νεκταροεκκρίσεις της ανοιξιιάτικης κουμαριάς και είναι ένα προϊόν με ιδιαίτερα υψηλή θρεπτική αξία και αποτελεί μια από τις καλύτερες επιλογές για την τόνωση του οργανισμού. Οι θερμίδες που εμπεριέχει το μέλι κουμαριάς είναι λιγότερες από τα άλλα μέλια λόγω του χαμηλού ποσοστού γλυκόζης και φρουκτόζης και έτσι συνίσταται σε περιπτώσεις δίαιτας καθώς και για Διαβητικούς τύπου Β'. Επιπλέον, 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 βοηθώντας έτσι στο κυκλοφορικό άρα και στην καρδιά, αλλά και ταυτόχρονα σαν διουρητικό κάνει καλό στα νεφρά και κατ' επέκταση και στον

προστάτη. Έχει σκούρο χρώμα με χάλκινες ανταύγειες και πολύ χαρακτηριστική υπόπικρη γεύση με αρωματικές νότες πικρής καραμέλας που αρέσει σε απαιτητικούς καταναλωτές. Η κρυστάλλωσή του πραγματοποιείται πολύ γρήγορα, σε 2-4 μήνες μετά τη συλλογή του (Παπαδόπουλος, 2014). Στην χώρα μας το μέλι της κουμαριάς όπως και της καστανιάς είναι δυστυχώς ελάχιστα γνωστά. Τα γνωρίζουν όμως και είναι περιζήτητα για τις ευεργετικές ιδιότητές τους στις αγορές της Κεντρικής Ευρώπης, της Ρωσίας και των Αραβικών χωρών. Στα προστατευόμενα δάση του Αγίου Όρους, παράγεται μέλι Κουμαριάς από τις νεκταροεκρίσεις του θάμνου της Κουμαριάς (*Arbutus Unedo* & *Arbutus andrachne*).

1.3.5 Μέλι Σουσούρας

Στην Ελλάδα υπάρχουν τέσσερα φυτά της οικογένειας των Ερεικωδών, από την νεκταροέκκριση των οποίων παράγονται αντίστοιχοι τύποι μελιών. Η φθινοπωρινή ερείκη, γνωστή και ως «σουσούρα» (*Erica verticillata*), η ανοιξιιάτικη ερείκη (*Erica arborea*), η Κουμαριά (*Arbutus unedo*) και το Ροδόδενδρο (*Rhododendron*). Το μέλι σουσούρας ή ρεικόμελο προέρχεται από τη φθινοπωρινή ερείκη ή σουσούρα, έναν θάμνο με μοβ λουλούδια που ανθίζει το φθινόπωρο. Το φυτό αυτό προμηθεύει τις μέλισσες με την τελευταία γύρη που θα βρουν πριν τον χειμώνα. Το φυτό αυτό παρέχει πλούσια και τονωτική τροφή για τις μέλισσες κατά τους φθινοπωρινούς μήνες. Το χρώμα του είναι κόκκινο-χάλκινο που μετατρέπεται σε χρώμα καραμέλας μετά την κρυστάλλωση του, η οποία πραγματοποιείται πολύ γρήγορα 1-3 μήνες μετά τη συλλογή του. Είναι προϊόν με υψηλή θρεπτική αξία και πολύ τονωτικό για τον οργανισμό καθώς εμφανίζει αντισηπτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες με έμφαση στο πεπτικό σύστημα. Επίσης έχει την ιδιότητα να ρίχνει τα επίπεδα της χοληστερίνης. Επιπλέον, το μέλι από το φυτό ρείκι έχει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινόλες. Επίσης, η υψηλή ποσότητα των αντιοξειδωτικών του μελιού ερείκης βοηθά στην απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών που παράγονται ως αποτέλεσμα των μεταβολικών αντιδράσεων και αλληλεπιδράσεων με τους εξωτερικούς ρύπους του περιβάλλοντος. Η εξόντωση αυτών των ελευθέρων ριζών

προλαμβάνει τη γήρανση και βελτιώνει τη γενική υγεία. Έχει πολύ χαρακτηριστική γεύση που θυμίζει πικρή καραμέλα.

1.3.6 Μέλι Θυμαρίσιο

Από τους 12.000 περίπου τόνους μέλι που παράγει ετησίως η χώρα μας, οι 1.000, δηλαδή το 10% περίπου, είναι θυμαρίσιο. Το θυμαρίσιο μέλι θεωρείται και είναι άριστης ποιότητας λόγω του εξαιρετικού αρώματος και γεύσης που διαθέτει. Παράγεται κυρίως στα νησιά, αλλά και σε περιοχές της ηπειρωτικής Ελλάδας που φυτρώνουν διάφορα είδη θυμαριού. Το θυμαρίσιο μέλι έχει ευχάριστη γεύση, αλλά μερικές φορές, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σε φρουκτόζη, δίνει την αίσθηση «καψίματος» στο λάρυγγα. Το άρωμά του είναι ευχάριστο και χαρακτηριστικό. Είναι χαρακτηριστικό, ότι το θυμαρίσιο μέλι είναι τονωτικό, έχει αντισηπτικές ιδιότητες, και αυξάνει την ενεργητικότητα και τις φυσικές δυνάμεις του ανθρώπου (Escriche et al., 2017).

1.3.7 Μέλι Γλυκάνισου

Μια νέα σχετικά ποικιλία ανθόμελου παρασκευάστηκε πρόσφατα. Προέρχεται από μεγάλο αριθμό στρεμμάτων όπου καλλιεργείται το αρωματικό φυτό γλυκάνισος. Το μέλι ανθέων γλυκάνισου, είναι σχετικά σκουρόχρωμο και λεπτόρρευστο όπως τα περισσότερα ανθόμελα. Χαρακτηρίζεται από την ιδιαίτερη γεύση του, καθώς είναι εντελώς ξεχωριστή και αναγνωρίσιμη σε σχέση με τις υπόλοιπες ποικιλίες ανθόμελων. Θεωρείται μέλι υψηλής θρεπτικής αξίας, με υψηλή αντιοξειδωτική δράση, και δεν κρυσταλλώνει εύκολα.

1.3.8 Μέλι Ελάτης

Το μέλι ελάτης αποτελεί σημαντική πηγή εισοδήματος για τον Έλληνα μελισσοκόμο, αφού συμβάλει κατά 5%-10% στην συνολική ετήσια παραγωγή του μελιού στην Ελλάδα. Στην Ελλάδα απαντάται η ελάτη η κεφαλληνιακή (*Abies cephalonica*), που

καλύπτει μεγάλες εκτάσεις στις ορεινές περιοχές νότια του Ολύμπου και στην Στερεά Ελλάδα. Το μέλι ελάτης είναι από τις κατηγορίες ελληνικού μελιού με ιδιαίτερα καλή γεύση και χαρακτηριστική εμφάνιση. Το χρώμα και η εμφάνιση του ποικίλουν ανάλογα με τον τόπο προέλευσής του, και είναι τα χαρακτηριστικά που το κάνουν να ξεχωρίζει. Λόγω του χαμηλού του ποσοστού σε γλυκόζη, δεν κρυσταλλώνει, γεγονός που το κάνει περιζήτητο για ανάμιξη σε εμπορικούς τύπους. 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).

1.4 Αντιμικροβιακές Ιδιότητες Μελιού

Ανέκαθεν, οι επιδράσεις του μελιού στην υγεία κινούσαν το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Όπως αναφέρθηκε ήδη, το μέλι χρησιμοποιούταν για θεραπεία πληγών καθώς και για θεραπεία παθήσεων του γαστρεντερικού συστήματος (Zumla & Luat, 1989, Olaitan et al., 2007). Ταυτόχρονα, το μέλι έχει περιγραφεί ως ένα τρόφιμο με αντιβακτηριακή δράση από τον 19^ο αιώνα (Kwakman and Zaat, 2012). Λόγω της μαζικής χρήσης αντιβιοτικών, παρατηρήθηκε μια έξαρση στην ανάπτυξη ανθεκτικών μικροβιακών στελεχών, γεγονός που έκανε την αντιμετώπιση της λοίμωξης από αυτά, ακόμη πιο δύσκολη. Ως αποτέλεσμα, η χρήση του μελιού ως αντιβακτηριακό παράγοντα αυξάνεται, τόσο για τη χρήση του σαν συντηρητικό σε άλλα τρόφιμα όσο και για τη χρήση του σε ιατρικές εφαρμογές.

Όπως και τα χαρακτηριστικά του κάθε μελιού, έτσι και η αντιμικροβιακή δράση του μελιού εξαρτάται από τη βοτανική προέλευση, τον μεταβολισμό των μελισσών και τις περιβαλλοντικές και κλιματικές συνθήκες, οι οποίες έχουν ισχυρή επίδραση στις φυσικές και χημικές ιδιότητες αυτού του τροφίμου (De Melo et al., 2017). Το περιβάλλον του προϊόντος, η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων και η υψηλή οξύτητα (χαμηλή τιμή του pH) εμποδίζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Kwakman et al., 2010). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι μερικά από τα βακτήρια που υπάρχουν στο μέλι παράγουν αντιμικροβιακούς παράγοντες, όπως οι βακτηριοσίνες, που μπορούν

να προστατεύσουν το προϊόν από την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών και να είναι ευεργετικό για την υγεία των καταναλωτών (Lee et al., 2008).

Το μέλι είναι υγροσκοπικό, που σημαίνει ότι προσλαμβάνει υγρασία από το περιβάλλον και έτσι αφυδατώνει τα βακτήρια. 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 δραστηριότητα του διαφέρει έναντι σε κάθε βακτήριο και αυτό ίσως οφείλεται στις διαφορές των φυτικών πηγών του. Μελέτες μέχρι σήμερα έχουν δείξει ότι τα Gram-αρνητικά βακτήρια είναι λιγότερο ευαίσθητα στη δραστηριότητα του μελιού σε σύγκριση με τα θετικά κατά Gram βακτήρια (Szweda, 2017; Bueno-Costa et al., 2016).

Οι αντιμικροβιακές επιδράσεις μπορεί να είναι βακτηριοστατικές ή βακτηριοκτόνες ανάλογα με τη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται (Abeshu and Geleta, 2016). Επιπλέον, ενισχύει τη δράση των αντιβιοτικών όταν χορηγείται μαζί με αυτά (Wang et al., 2012). Έρευνες έχουν δείξει την *in vitro* αποτελεσματικότητα του μελιού έναντι βακτηρίων που μολύνουν πληγές συμπεριλαμβανομένου της *Escherichia coli*, του *Staphylococcus aureus* και της *Salmonella enterica* (Mundo et al., 2004).

Οι επιστήμονες, προσπαθώντας να εντοπίσουν την πηγή της βακτηριοκτόνου δράσης του μελιού έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη μορίων όπως η μεθυλ-γλυοξάλη (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).

1.4.1 Παράγοντες αντιβακτηριακής δράσης

Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού οφείλεται κυρίως στην ενζυμική παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου μέσω του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης (Dustmann, 1979, Molan, 1992), στην οξύτητα του, στην ώσμωση του και σε άλλα συστατικά του μελιού (Anthimidou & Mossialos, 2012), όπως αρωματικά οξέα ή φαινολικές ενώσεις

και πρωτεΐνες (Weston, 2000). Η αντιμικροβιακή δράση του πάντως είναι εξαιρετικά πολύπλοκη και μέχρι και σήμερα δεν παραμένει πλήρως αναγνωρισμένη. Έως τώρα, έχει διαπιστωθεί ότι διάφορα συστατικά αυτού του προϊόντος διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για τις αντιμικροβιακές ιδιότητές του. Παρακάτω αναφέρονται οι κύριοι παράγοντες που συμβάλλουν στην αντιμικροβιακή του δράση.

Υψηλή Συγκέντρωση Σακχάρων

Η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων εξαλείφει τους μικροοργανισμούς και αναστέλλει την ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών (Szweda, 2017). 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 (Joirisch, 1970).

Χαμηλή τιμή pH

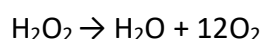
Η χαμηλή τιμή pH και η υψηλή συγκέντρωση των οργανικών οξέων (π.χ., γλυκονικού οξέος) παίζουν επίσης ρόλο στην αντιμικροβιακή δράση. Το pH των περισσότερων τύπων μελιού κυμαίνεται από 3.4 έως 6.1, και σε συνδυασμό με την υψηλή ωσμωτική πίεση εξαλείφει ή αναστέλλει την ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών. 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. Το παραπροϊόν της αντίδρασης αυτής, το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), είναι ένας ισχυρός αντιμικροβιακός παράγοντας. Το ένζυμο παράγεται στους σιελογόνους αδένες των μελισσών και εισάγεται στο νέκταρ και προστατεύει το μέλι ωριμάνσεως από την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών. Τα περισσότερα βακτήρια δεν μπορούν να αναπτυχθούν μέσα στη μάζα του μελιού, εξαιτίας αυτών των δύο

συστατικών. Το H₂O₂ έχει την ικανότητα να αναχαιτίζει την ανάπτυξη των βακτηρίων αλλά και να τα θανατώνει. Είναι ενδιαφέρον ότι το ένζυμο αυτό βρίσκεται στο ώριμο μέλι χωρίς να είναι ενεργό. Όταν το μέλι αραιώνεται, το ένζυμο ανακτά τη δραστηριότητά του, η οποία είναι εξαιρετικά σημαντική για τις μέλισσες και ιδιαίτερα για την υγεία των νυμφών τους. Η παραγωγή του είναι εξίσου ζωτικής σημασίας για το αντιμικροβιακό δυναμικό του μελιού που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία λοιμώξεων του δέρματος και των μαλακών μορίων, των μολυσμένων πληγών ή της εξάλειψης παθογόνων βακτηρίων που βρίσκονται στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα ή του *Helicobacter pylori* που βρίσκεται στο ανθρώπινο στομάχι (Szweda, 2017).

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 H₂O₂ 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 νέκταρ, με συνέπεια να ανιχνεύεται και στο μέλι. Παρατηρήθηκε πως προσθέτοντας το ένζυμο καταλάση, το υπεροξείδιο του υδρογόνου απομακρύνεται, και μερικά μέλια εξακολουθούν να εμφανίζουν σημαντική αντιβακτηριακή δράση. Έτσι, τα δυο αυτά ένζυμα, η οξειδάση της γλυκόζης (η οποία παράγει το H₂O₂) και η καταλάση (η οποία διασπά το H₂O₂) καθορίζουν τα επίπεδα του H₂O₂ στο μέλι (Weston, 2000) και κατά ένα μεγάλο βαθμό, την αντιμικροβιακή του δράση.

Φυτοχημικά συστατικά

Συστατικά όπως τα φαινολικά οξέα, η λυσοζύμη, τα φλαβονοειδή (Cooper et al., 1999), οι πρωτεΐνες, τα ολιγοπεπτίδια (Mundo et al., 2004) και η μεθυλ-γλυοξάλη MGO (Mavric E et al., 2008), φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιβακτηριδιακή δράση του μελιού. Επιπλέον, υπάρχει μια πρωτεΐνη, η bee-defensin-1, η οποία εκκρίνεται από τους υποφαρυγγικούς αδένες της μέλισσας και

μπορεί να εισέλθει στο μέλι μέσω του σάλιου της μέλισσας κατά τη διάρκεια παραγωγής του μελιού. Μετά από μελέτη παρατηρήθηκε ότι το αντιμικροβιακό πεπτίδιο bee-defensin-1 έχει ισχυρή δραστηριότητα έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων συμπεριλαμβανομένων των *B. subtilis*, *S. aureus* και *Paenibacillus larvae* (McLoone et al., 2016; Kwakman and Zaat, 2012).

1.5 Το Μέλι Manuka

Το μέλι Manuka παράγεται από το νέκταρ των λουλουδιών του *Leptospermum scoparium* της οικογένειας *Myrtaceae*, το οποίο αναπτύσσεται ως θάμνος ή μικρό δέντρο σε όλη τη Νέα Ζηλανδία και την ανατολική Αυστραλία. Είναι δέντρο ιδιαίτερα γνωστό στη φυλή *Maori*, οι οποίοι το χρησιμοποιούσαν για αιώνες στην παραδοσιακή ιατρική τους. Παράλληλα, 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. Το μέλι Manuka έχει ακόμη χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό μολύνσεων, συμπεριλαμβανομένων αποστημάτων, χειρουργικών πληγών, εγκαυμάτων και ελκών (Carnwath et al., 2014). Περίπου 10.000-12.000 τόνοι μελιού παράγονται κάθε χρόνο στη Νέα Ζηλανδία, από τα οποία 6000-8000 τόνοι που είναι διαθέσιμοι για εξαγωγή, είναι κυρίως μέλι Manuka (Rogers et al., 2014).

Ο καθηγητής Peter Molan του Πανεπιστημίου Waikato της Νέας Ζηλανδίας ήταν ο πρώτος που ανέφερε την ασυνήθιστη δραστηριότητα του Manuka και άρχισε να δοκιμάζει τη δράση του σε ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών βακτηριακών ειδών στα μέσα της δεκαετίας του '80. Ωστόσο, ενώ ήταν σαφές ότι ακόμη και χαμηλές συγκεντρώσεις του μελιού ήταν τοξικές προς παθογόνα βακτήρια, το δραστικό συστατικό που ήταν υπεύθυνο για την αντιβακτηριακή του δράση, παρέμεινε αδιευκρίνιστο για πολλά χρόνια. Η υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και το χαμηλό

pH καθιστούν το μέλι ανασταλτικό για την ανάπτυξη μικροβίων, αλλά η δραστηριότητα παραμένει όταν αυτά αραιώνονται σε αμελητέα επίπεδα

Η σύνθεση του μελιού Manuka αποτελείται από υδατάνθρακες, μεταλλικά στοιχεία, πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα, φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις. Παρόλο που τέτοιες ενώσεις απαντώνται στους περισσότερους τύπους μελιού, μοναδικά χαρακτηριστικά εμφανίζονται επίσης στο μέλι Manuka. Η αιτία αυτής της αντιμικροβιακής του δραστηριότητας, αποκαλύφθηκε τελικά το 2008, όταν δύο εργαστήρια ταυτοποίησαν ανεξάρτητα την μεθυλογλυοξάλη (MGO) στο μέλι Manuka (Adams et al., 2008, Mavric et al.). Το ασυνήθιστα υψηλό επίπεδο μεθυλογλυοξάλης (MGO), σχηματίζεται από την διυδροξυακετόνη (DHA) και σχετίζεται με την αντιβακτηριακή δράση. Δυστυχώς, δεν είναι γνωστό πώς σχηματίζεται η DHA στο νέκταρ και γιατί υπάρχει σε τόσο μεγάλες ποσότητες στο νέκταρ συγκεκριμένα των δέντρων Manuka.

Το μέλι Manuka, αξιολογείται συνήθως χρησιμοποιώντας ένα σύστημα ταξινόμησης γνωστό ως μοναδικό παράγοντα Manuka (UMF), το οποίο αντανακλά την ισοδύναμη συγκέντρωση φαινόλης (% w / v) που απαιτείται για να παράγει την ίδια αντιβακτηριακή δράση με το μέλι. Είναι αξιοσημείωτο ότι η βαθμολογία UMF του μελιού Manuka συσχετίζεται έντονα με την ισοδυναμία MGO και την αντιβακτηριακή δραστηριότητα, αλλά η σχέση δεν είναι πλήρως κατανοητή (Molan, 2008). Μια πρόσφατη έρευνα κατέληξε επίσης στο συμπέρασμα ότι η βαθμολογία UMF για το μέλι Manuka συσχετίζεται ακόμη και με την αντιοξειδωτική της ικανότητα, εκτός από την συνολική φαινόλη που βρίσκεται στο μέλι (Henderson et.al., 2015).

Επίσημα πλέον η μεθυλογλυοξάλη αναγράφεται στη συσκευασία κάθε μελιού Manuka. Για παράδειγμα, MGO +100 σημαίνει ότι 100mg μεθυλογλυοξάλης περιέχονται σε 1 κιλό μελιού Manuka. Το μέλι Manuka αποτελεί ένα από τα πιο ακριβά μέλια παγκοσμίως, φτάνοντας ακόμη και τα 200 €/kg, ενώ η τιμή του εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποσότητα MGO που εμπεριέχεται.

1.6 Βακτηριακά Είδη

Όπως αναφέρθηκε ήδη, το μέλι Manuka έχει αποδειχθεί να φέρει μεγάλη αντιμικροβιακή δράση, έναντι κλινικών παθογόνων βακτηρίων. Πολύ πρόσφατα, το μέλι της Manuka δοκιμάστηκε σε βιοϋμένες (biofilms) πολλαπλών ειδών βακτηρίων που περιείχαν μεταξύ άλλων και *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, και *Pseudomonas aeruginosa*, όπου βρέθηκε ότι μειώνει τη βιωσιμότητα όλων των ειδών (Sojka et al., 2016). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τη χρήση του μελιού για κλινικές μελέτες, σε τραύματα που περιέχουν βιοϋμένες παθογόνων. Το MGO φαίνεται να είναι ως επί το πλείστον αλλά όχι πλήρως υπεύθυνο για την αναστολή των βιοϋμενών παθογόνων από το μέλι Manuka, υπογραμμίζοντας και πάλι τη σημασία των επιπρόσθετων συστατικών που ρυθμίζουν τη δραστικότητα του (Kilty et al., 2011; Lu et al., 2014). Ορισμένα από τα βακτήρια τα οποία έχει βρεθεί πως αναστέλλει η δράση του, θα αναλυθούν στην συνέχεια.

1.6.1 *Staphylococcus aureus*

Το *Staphylococcus aureus* είναι ένα Gram (+) θετικό βακτήριο και θεωρείται ως το πιο κοινό είδος σταφυλόκοκκου, το οποίο προκαλεί τις πιο συχνές μολύνσεις. (Kluytmans et al., 1997). Το 65% των ανθρώπων με λοιμώξεις του *S. aureus* μολύνονται με το ίδιο στέλεχος, ενώ το ποσοστό ανεβαίνει στο 80% στις νοσοκομειακές μολύνσεις (Weinstein, 1959, von Eiff et al., 2001). 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 (Gordon and Lowy, 2008). Μπορεί να επιβιώσει επίσης σε οικόσιτα ζώα, όπως σκυλιά, γάτες και άλογα. Προκαλεί πυρετογόνες μολύνσεις, λοιμώξεις του δέρματος και των πληγών, λοιμώξεις του αναπνευστικού, σύνδρομο τοξικής καταπληξίας (TTS), τοξική επιδερμική νεκρόλυση, φλύκταινες, οστεομυελίτιδα, μηνιγγίτιδα και αρθρίτιδα. Αντίθετα, οι χρόνιες μολύνσεις σχετίζονται με την ανάπτυξη του σε βιοϋμένες όπου ο *S. aureus* μπορεί να προσκολλάται και να παραμένει στους ιστούς του ξενιστή, όπως τις βαλβίδες οστού και καρδιάς, να προκαλεί οστεομυελίτιδα και ενδοκαρδίτιδα αντιστοίχως ή σε

εμφυτευμένα υλικά όπως καθετήρες και προσθετικές αρθρώσεις (Parsek and Singh, 2003; Chatterjee et al., 2014). Σε περιπτώσεις μολυσμένων ιατρικών εργαλείων, η αφαίρεση αυτών είναι απαραίτητη για τη θεραπεία της λοίμωξης (Darouiche, 2004).



Εικόνα 1. *Staphylococcus aureus*

Η σταφυλοξανθίνη, μια καροτενοειδής χρωστική ουσία, είναι υπεύθυνη για το χαρακτηριστικό χρυσό χρώμα των αποικιών του. Ο *S. aureus* είναι το συνηθέστερο παθογόνο σε έλκη διαβητικών. Η τοπική χρήση επιθεμάτων μελιού έχει ευεργετική επίδραση στις πληγές αυτές (Molan, 1999), καθώς και σε τομές εγχείρησης και εγκαύματα που έχουν προσβληθεί από το βακτήριο. Ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος θεωρείται ως ένα άκρως επιτυχημένο παθογόνο βακτήριο που προκαλεί σημαντικές ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις (Fridkin et al., 2005). Η επιτυχία του οφείλεται εν μέρει στην αντίσταση του 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).

1.6.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένα Gram (-) αρνητικό βακτήριο. Πρόκειται για ένα ευκαιριακά παθογόνο ικανό να προκαλέσει μια ευρεία σειρά απειλητικών για την

ζωή οξειών και χρόνιων μολύνσεων, ιδιαίτερα σε ασθενείς με υποβαθμισμένη ανοσολογική άμυνα, ηλικιωμένους, και νεογέννητα. Έχει ιδιαίτερη σημασία επειδή είναι η κύρια αιτία θνησιμότητας σε ασθενείς με κυστική ίνωση (CF) και ένα από τα κύρια νοσοκομειακά παθογόνα που επηρεάζουν νοσηλευόμενους ασθενείς καθώς είναι ανθεκτικό σε ευρύ φάσμα αντιβιοτικών (Mayer-Hamblett, 2014).

Η μεταβολική ικανότητα της *P. aeruginosa* είναι εκτεταμένη όπως αποδεικνύεται από την ικανότητά τους να παράγουν πολλούς δευτερογενείς μεταβολίτες και πολυμερή καθώς και την ικανότητά τους να χρησιμοποιούν διάφορες πηγές άνθρακα και δέκτες ηλεκτρονίων. Η παρουσία του *P. aeruginosa* παντού καθώς και η επιμονή του σε κλινικές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένης της εγγενούς ανθεκτικότητας στη θεραπεία, αποδίδονται στην εξαιρετική ικανότητά του να επιβιώνει έχοντας στην διάθεση του ένα σύνολο ανταποκρινόμενων μηχανισμών.



Εικόνα 2. *Pseudomonas aeruginosa*

Τα πιο σημαντικά δομικά στοιχεία του βακτηριακού κυττάρου είναι η πρωτεΐνη F (OprF), το έλυτρο και τα τριχίδια του διότι παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της λοιμογόνου δράσης της *P. 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. Η *P. aeruginosa* είναι η μόνη που έχει την ιδιότητα να παράγει την πράσινη χρωστική πυοκυανίνη, η οποία θεωρείται ως ένας

δευτερογενής μεταβολίτης με την ικανότητα να οξειδώνει και μπορεί να σκοτώνει τα μικρόβια που ανταγωνίζονται τη *P. aeruginosa*.

1.6.3 *Klebsiella pneumoniae*

Η *Klebsiella pneumoniae* είναι ένα Gram (-) αρνητικό παθογόνο βακτήριο. Η *K. pneumoniae* είναι μέρος της οικογένειας των *Enterobacteriaceae*, που αποτελείται και από άλλα γνωστά παθογόνα όπως το *Escherichia coli*, το είδος *Salmonella* και το είδος *Shigella*. Είναι μία από τις κύριες αιτίες νοσοκομειακών λοιμώξεων στις Ηνωμένες Πολιτείες (Magill et al., 2014), ενώ χαρακτηρίζεται ως ευκαιριακό παθογόνο, καθώς προκαλεί συνήθως λοιμώξεις σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα (Podschun & Ullmann, 1998).



Εικόνα 3. *Klebsiella pneumoniae*

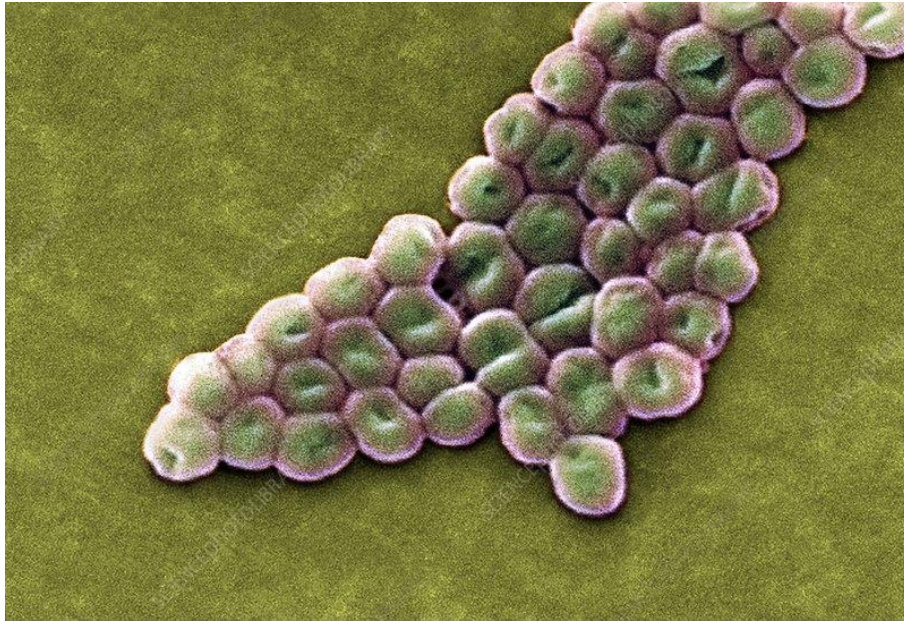
Στον άνθρωπο, η *K. pneumoniae* αποικίζει το γαστρεντερικό σωλήνα και λιγότερο συχνά το ρινοφάρυγγα, από τον οποίο αποκτά πρόσβαση στην κυκλοφορία και σε άλλους ιστούς στους οποίους προκαλεί λοίμωξη. Θεωρείται ως ένα ευκαιριακό παθογόνο που συνδέεται με τις λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος που έχουν αποκτηθεί από το νοσοκομείο, τη σηψαιμία, την πνευμονία και τις λοιμώξεις των μαλακών μορίων (Trivedi et al., 2015; Lee et al., 2017). Η *K. pneumoniae* εμφανίζει αυξημένη ανοχή στα αντιβιοτικά και αποτελεί μία από τις αιτίες που προκαλούν τις

λοιμώξεις που σχετίζονται με την υγειονομική περίθαλψη παγκοσμίως (Mohamed et al., 2018).

Υπάρχουν δύο απαραίτητοι παράγοντες για τη λοιμογόνο δράση της *K. pneumoniae*, ο λιποπολυσακχαρίτη (LPS) και ο πολυσακχαρίτης της κάψας (CPS). Ο LPS αποτελείται από το λιπίδιο A, τον πυρήνα και τον Ο-πολυσακχαρίτη. Ο CPS είναι το εξωτερικό στρώμα αυτού του παθογόνου παράγοντα και εμπλέκεται κυρίως στην αντοχή στη φαγοκυττάρωση από πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα ενεργώντας ως φυσικό φράγμα. Έτσι, και τα δύο συστατικά είναι κρίσιμα για τον μικροοργανισμό να μπορεί να εξαπλωθεί μέσω του αίματος και να προκαλέσει σήψη (Cortes et al., 2002).

1.6.4 *Acinetobacter baumannii*

Το *A. baumannii* είναι ένα αερόβιο, Gram (-) αρνητικό κοκκοβακτηρίδιο, ένα ευκαιριακά ανθρώπινο παθογόνο το οποίο προσβάλλει κυρίως βαριά ασθενείς. Το *A. baumannii* θεωρείται πλέον παγκόσμια απειλή στην υγειονομική περίθαλψη, κυρίως λόγω της τάσης του να αποκτά αντίσταση έναντι φαρμάκων και αντιβιοτικών. Παρουσιάζει μάλιστα σχεδόν τέσσερις φορές υψηλότερα ποσοστά ανθεκτικότητας από εκείνα που παρατηρήθηκαν για άλλα Gram-αρνητικά παθογόνα, όπως η *Pseudomonas aeruginosa* και *Klebsiella pneumoniae*, για τα οποία υπάρχουν επίσης στατιστικά στοιχεία παγκόσμια παρακολούθησης (Giammanco et al., 2017). Υπό το πρίσμα αυτό, τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) χαρακτήρισαν το *Acinetobacter* ως σοβαρή απειλή, κατατάσσοντας το στην ομάδα βακτηρίων που αποτελούν τη μεγαλύτερη απειλή για την ανθρώπινη υγεία, δίνοντας βήμα στις προσπάθειες έρευνας και ανάπτυξης νέων αντιμικροβιακών θεραπειών (Organization WH, 2017).



Εικόνα 4. *Acinetobacter baumannii*

Η επικράτησή του σε νοσοκομειακά κρούσματα και σε λοιμώξεις που σχετίζονται με ιατρικά εργαλεία, έχει αποδοθεί στην ικανότητά του να σχηματίζει βιοϋμένες σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα και σε ιατρικές συσκευές και εργαλεία, αντίστοιχα. Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από το *A. baumannii* συνδέονται με καταστροφικές επιπτώσεις από άποψη νοσηρότητας και θνησιμότητας. Εισέρχεται στο σώμα μέσω των υγρών των ιστών και αποικεί συνήθως στην αναπνευστική οδό, στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στο δέρμα και στα μάτια. Πνευμονία, λοιμώξεις του αίματος και μηνιγγίτιδα είναι τα συχνότερα ανεπιθύμητα αποτελέσματα της μόλυνσης από *A. baumannii* (Qin et al., 2018). Είναι σημαντικό ότι σπάνια βρίσκεται έξω από το περιβάλλον της υγειονομικής περίθαλψης και παρουσιάζει χαμηλό συντελεστή ανθρώπινου μεταφορέα.

1.6.5 *Citrobacter freundii*

Το *Citrobacter freundii* είναι ένα Gram (-) αρνητικό αερόβιο, ραβδόμορφο βακτήριο μήκους 1-5 μm ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*, και θεωρείται ευκαιριακά παθογόνο. Στον άνθρωπο, ο *C. freundii* προκαλεί λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, διάρροια, πνευμονία και, σπάνια, μηνιγγίτιδα και ενδοκρανιακά αποστήματα. Απαντάται στο νερό, το έδαφος και τα τρόφιμα (Wang et al., 2001).

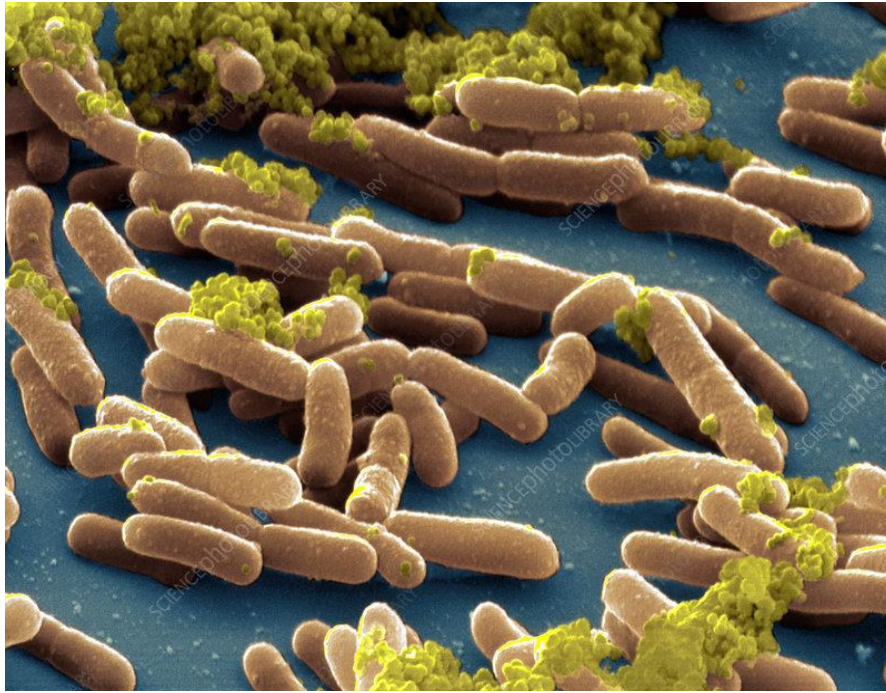
Το *C. freundii* είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο που μπορεί να αποικίσει τον εντερικό σωλήνα ανθρώπων και ζώων και έχει συσχετιστεί με ένα ευρύ φάσμα λοιμώξεων που εμπλέκουν το γαστρεντερολογικό, το ουροποιητικό και το αναπνευστικό σύστημα. Έχει συσχετιστεί με νοσοκομειακές λοιμώξεις του ουροποιητικού, του χοληφόρου, γαστρίτιδας, μηνιγγίτιδας, αποστήματα εγκεφάλου και νεοπλασματικής σήψης (Rezaei et al., 2016). Αντιπροσωπεύει περίπου το 29% όλων των ευκαιριακών λοιμώξεων οι οποίες προκαλούν ανησυχία για τη δημόσια υγεία και απαιτούνται εναλλακτικές λύσεις ή συμπληρώματα αντιβιοτικής αγωγής.



Εικόνα 5. *Citrobacter freundii*

1.6.6 *Salmonella typhimurium*

Η *Salmonella* είναι ένα κινητό, Gram (-) αρνητικό ραβδόμορφο βακτήριο και ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Η *S. typhimurium* είναι ένα από τα σημαντικά παθογόνα των τροφίμων και συνήθως οι λοιμώξεις από τη *S. typhimurium* πραγματοποιούνται μέσω της κατάποσης μολυσμένου νερού ή τροφίμου (Tsen, 2000) Η κύρια πηγή μόλυνσης είναι τρόφιμα που προέρχονται από ζώα, κυρίως αυγά και προϊόντα αυγών. Έπειτα μέσω του εντερικού επιθηλίου μπορεί να προκαλέσει γαστρεντερική νόσο (Fabrega and Vila, 2013).

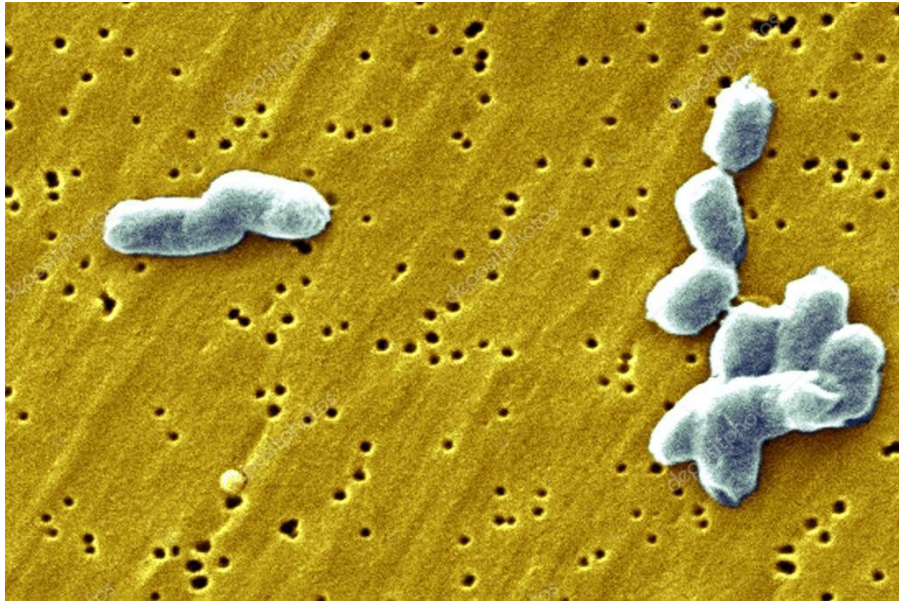


Εικόνα 6. *Salmonella typhimurium*

Η ασθένειες που προκαλούνται από τη *S. typhimurium* σε ανθρώπους και ζώα περιλαμβάνει συμπτώματα όπως πυρετό, οξεία φλεγμονή του εντέρου και διάρροια εντός 24 ωρών μετά τη μόλυνση. Η τοξικότητά της φαίνεται να οφείλεται στην εξωτερική μεμβράνη που διαθέτει και αποτελείται κυρίως από λιποπολυσακχαρίτες (LPS) που προστατεύουν τα βακτήρια από το περιβάλλον (Gart et al., 2016).

1.6.7 *Salmonella infantis*

Η *Salmonella infantis* είναι μια από τις δέκα πιο συνηθισμένες μολύνσεις που έχουν προκληθεί από την ευρύτερη οικογένεια *Salmonella*. Συχνά συναντάται σε ζώα εκτροφής και στα ζωοτροφία. Παρόλο που οι λοιμώξεις της *S. infantis* δεν απειλούν τη ζωή σε υγιή άτομα, αυτές οι μολύνσεις μπορεί να είναι απειλητικές για τη ζωή σε άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα ακόμη και στα μικρά παιδιά.



Εικόνα 7. *Salmonella infantis*

Οι περισσότερες λοιμώξεις από *S. infantis* έχουν ως αποτέλεσμα γαστρεντερικές διαταραχές, οι οποίες συχνά είναι απλές και δεν χρειάζονται θεραπεία, αλλά μπορούν επίσης να εμφανισθούν επεμβατικές λοιμώξεις, οι οποίες στη συνέχεια απαιτούν αντιβιοτική αγωγή, καθώς μπορεί να είναι απειλητικές για τη ζωή. Ταυτόχρονα, η ανθεκτικότητα της *Salmonella* στα αντιβιοτικά έχει αυξηθεί παγκοσμίως, αλλά και στην Ελλάδα.

Όπως και η *S. typhimurium*, έτσι και η *S. infantis*, έχει ως βασική πηγή μόλυνσης τα τρόφιμα που προέρχονται από ζώα, κυρίως αυγά και προϊόντα αυγών, και κοτόπουλο.

2. Σκοπός της Παρούσας Εργασίας

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η αντιβακτηριακή δράση μελιών της περιοχής της Στερεάς Ελλάδας και του Αγίου Όρους, από διαφορετικές φυτικές προελεύσεις, έναντι των βακτηριακών ειδών *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella typhimurium*, και *Salmonella infantis*.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Υλικά

Κατά της διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

- Τρυβλία Petri (100 mm)
- Τετράγωνα Τριβλύα (120mm)
- Μικροπλάκες 96-θέσεων (96-wells microplates)
- Microplate Replicator
- Αποστειρωμένα πλαστικά φιαλίδια τύπου falcon 50ml
- Θρεπτικό υλικό Mueller Hinton Agar (Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα σε τρυβλία)
- Θρεπτικό υλικό Mueller Hinton Broth (Χρησιμοποιείται για υγρές καλλιέργειες)
- Πιπέτες
- Eppendorfs (1.5 ml)
- Tips
- Κυψελίδες
- Κρίκος εμβολιασμού
- Φιαλίδιο υγραερίου
- Αναδευόμενος επωαστήρας
- Φασματοφωτόμετρο



Εικόνα 9. ELx808 Absorbance Microplate Reader



Εικόνα 10. Microplate replicator

3.1.1 Δείγματα Μελιών

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μελιών που προέρχονται από την περιοχή της Στερεάς Ελλάδας και του Αγίου Όρους. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκαν οκτώ δείγματα μελιών, τα οποία αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα. Κάθε δείγμα έχει πληροφορίες για τον τόπο προέλευσης και την ημερομηνία συγκομιδής τους. Η αποθήκευση τους έγινε σε σκιερό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου.

Τύπος Μελιού	Γεωγραφική Προέλευση	Ημερομηνία Παραγωγής
Καστανιάς	Όρος Άθως	2018
Κουμαριάς	Όρος Άθως	2018
Σουσούρας	Όρος Άθως	2018
Θυμαρίσιο	Θυμαρότοποι Γαλαξιδίου	2018
Ελάτης με Θυμάρι	Όρος Γκιώνα	2018
Γλυκάνισου	Βόρεια Εύβοια	2018
Ελάτης (με κουμαριά, πιο ανοικτόχρωμο) (1)	Όρος Γκιώνα	Ιούνιος 2018
Ελάτης (με άγρια βότανα) (2)	Όρος Γκιώνα	Ιούλιος 2018

Πίνακας 1. Δείγματα μελιών της περιοχής της Στερεάς Ελλάδος και της Χερσονήσου του Άθω.

3.1.2 Μέλι Manuka

Ως μέλι «αναφοράς», χρησιμοποιήθηκε Manuka honey UMF 24+ (MGO 1122+) (PA & SC Steens Limited, Masterton, New Zealand). Το μέλι Manuka χρησιμοποιήθηκε ως θετικό control για τη σύγκριση της αντιβακτηριακής δράσης των δειγμάτων που εξετάστηκαν.

3.2. Μέθοδοι

Για την εκτίμηση της αντιβακτηριακής ικανότητας των μελιών, χρησιμοποιήθηκε η *in vitro* μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (microtiter plates).

Για την διάκριση τους σε αυτά με βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνο δράση χρησιμοποιήθηκε η *in vitro* μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (Minimum Bactericidal Concentration).

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι τα εξής:

- *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Acinetobacter baumannii*
- *Citrobacter freundii*
- *Salmonella infantis*
- *Salmonella typhimurium*

3.2.1 Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration, MIC).

3.2.1.1 Αρχή της μεθόδου

Η *in vitro* μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) έγινε σε αποστειρωμένες μικροπλάκες 96 θέσεων η καθεμία (96-well microplates). Το MIC ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιβακτηριακού παράγοντα, στην οποία δεν ανιχνεύεται καμιά 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 και έγινε η μέτρηση στα 630 nm. Η ανάλυση των οπτικών απορροφήσεων των καλλιιεργειών έγινε με το λογισμικό *Gen5™ Data Analysis Software* (Biotek).

3.2.2 Προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (Minimum Bactericidal Concentration, MBC).

3.2.2.1 Αρχή της μεθόδου

Η *in vitro* μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC) βασίζεται στην ελάχιστη συγκέντρωση ενός αντιβακτηριακού παράγοντα, που απαιτείται για να θανατώσει ένα συγκεκριμένο βακτήριο.

Περιλαμβάνει την χρήση ενός microplate replicator, την μεταφορά μικρής ποσότητας δείγματος σε τετράγωνα τρυβλία, και την παρατήρηση αυτών έπειτα από 24 ώρες.

3.3 Πειραματική διαδικασία

3.3.1 Παρασκευή Καλλιέργειας Βακτηρίων

Οι καλλιέργειες των βακτηρίων προετοιμάστηκαν χρησιμοποιώντας καλλιέργειες που διατηρούνται στους -80°C . Με μικροβιολογικό κρίκο και σε αποστειρωμένο περιβάλλον λήφθηκε μια μικρή ποσότητα βακτηρίων από την καλλιέργεια stock και μεταφέρθηκε σε φιαλίδια τύπου falcon που περιείχε 5 ml θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton Broth, το οποίο έχει αποστειρωθεί προηγουμένως. Τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα υπό ανάδευση (*incubator shaker*) για 24 ώρες στους 37°C στις 210 στροφές. Μετά το πέρας των 24 ωρών, οι καλλιέργειες των βακτηρίων αραιώθηκε μέχρι την παρασκευή ενός μικροβιακού εναιωρήματος θολερότητας ίση με 0.5 McFarland (περίπου 10^8 cfu/ml). Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm έγινε σε φασματοφωτόμετρο μέχρι να επιτευχθεί τελική τιμή ~ 0.132 που αντιστοιχεί σε 0.5 McFarland.

3.3.2 Παρασκευή Αραιωμένων Δειγμάτων

Για κάθε ένα από τα οκτώ δείγματα μελιού που χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα, παρασκευάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις συγκεντρώσεων: 50% v/v, 25% v/v, 12.5% v/v, 6.25% v/v, 3.125% v/v και 1.56% v/v. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για το μέλι Manuka, όπου χρησιμοποιήθηκε ως μέλι αναφοράς.

3.3.3 Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration, MIC).

Στη πλάκα μικροτιτλοποίησης χρησιμοποιήθηκαν για κάθε δείγμα μελιού, εις τριπλούν επτά πηγαδάκια (wells) στο καθένα, στα οποία προστέθηκαν 190 μl από την κάθε αραιώση του εκάστοτε υπό εξέταση μελιού συμπεριλαμβανομένου και του Manuka. Έπειτα, προστέθηκαν ~ 10 μl υγρής καλλιέργειας βακτηρίων, αραιωμένης μέχρι την επιθυμητή τιμή 0,5 McFarland. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε μια φορά για κάθε ένα από τα επτά βακτήρια.

Αρχικά η μικροπλάκα τοποθετήθηκε στο ELx808 Absorbance Microplate Reader και έγινε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 630 nm, παίρνοντας ως δεδομένο

χρόνο την τιμή 0h, την στιγμή που τοποθετήθηκαν τα ~10 μl της καλλιέργειας του εκάστοτε βακτηρίου (t=0h.) Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν και καταγράφηκαν από το λογισμικό Gen5™ Data Analysis Software. Στη συνέχεια η μικροπλάκα τοποθετήθηκε σε επωαστήρα στους 37° C για 24 ώρες. Μετά από την επώαση των 24 ωρών έγινε μια δεύτερη ανάγνωση από το Absorbance Microplate Reader (t=24h). Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δυο μετρήσεων, μέσω του προγράμματος Excel της Microsoft, προσδιορίστηκε η 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=24h από τη μέτρηση για t=0h.

$$OD_{\text{testwell}} = t_{24 \text{ test}} - t_{0 \text{ test}}$$

$$OD_{\text{of corresponding control well}} = t_{24\text{control}} - t_{0\text{control}}$$

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

$$100\% \text{ Αναστολή} = 1 - (OD_{\text{testwell}} / OD_{\text{of corresponding control well}}) \times 100$$

(Patton et al., 2006) για κάθε σειρά από τη πλάκα μικροτιτλοποίησης με τα 96 πηγαδάκια.

Από αυτό προέκυψαν οκτώ τιμές αναστολής για την κάθε αραιώση του μελιού. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν για το κάθε μέλι και για την κάθε συγκέντρωση.

3.3.3.1 Ακριβής Ποσοτικοποίηση του MIC

Έπειτα από την εύρεση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης, πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω αραιώσεις των μελιών, προκειμένου να έχουμε μια πιο ακριβής τιμή, αφού όπως είναι φανερό, οι αραιώσεις για παράδειγμα 50% v/v

μέχρι 25% v/v, έχουν μεγάλη απόκλιση μεταξύ τους. Έτσι, ανάλογα με την εκάστοτε τιμή MIC που μας έδωσε κάθε μέλι για κάθε ένα από τα βακτήρια, πραγματοποιήθηκαν οι ανάλογες αραιώσεις. Για παράδειγμα, εάν ένα μέλι μας δίνει MIC το 12,5% v/v, πραγματοποιήθηκαν οι εξής αραιώσεις: 17% v/v, 16% v/v, 15% v/v, 14% v/v, 13% v/v, 12% v/v, 11% v/v, 10% v/v, 9% v/v, 8% v/v, 7% v/v και 6% v/v. Ακολουθήθηκε λοιπόν η ίδια πειραματική διαδικασία, με διαφορά τις νέες πλέον αραιώσεις των δειγμάτων.

Τα αποτελέσματα που φαίνονται στην συνέχεια, μας βοήθησαν να κάνουμε μια καλύτερη και πιο ακριβής ανίχνευση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης κάθε μελιού, για κάθε ένα από τα επτά βακτήρια.

3.3.4 Προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (Minimum Bactericidal Concentration, MBC).

Αφού έχει προηγηθεί η διαδικασία προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC), μετά την επώαση των 24 ωρών, με την εμφάνιση ενός microplate replicator μεταφέρθηκε μια μικρή ποσότητα δείγματος από όλα τα πηγαδάκια της πλάκας μικροτιτλοποίησης σε τετράγωνα τρυβλία των 120mm που περιείχαν Mueller Hinton Agar. Στη συνέχεια τα τρυβλία τοποθετήθηκαν για επώαση στους 37°C για 24 ώρες και έπειτα παρατηρήθηκε η εμφάνιση αποικιών στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις μελιού 50% v/v, 25% v/v, 12.5% v/v, 6.25% v/v, 3.125% v/v και 1.56% v/v. Η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία θανατώθηκαν τα βακτήρια καθορίστηκε ως MBC, και γίνεται αντιληπτή μέσω της απουσίας ανάπτυξης αποικιών.

4. Αποτελέσματα

4.1 Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration) και της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (Minimum Bactericidal Concentration)

Με τη μέθοδο της μικροτιτλοποίησης προσδιορίστηκε η ελάχιστη συγκέντρωση του μελιού που απαιτείται για την αναστολή της ανάπτυξης των βακτηριακών ειδών. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε οκτώ δείγματα μελιών της περιοχής της Στερεάς Ελλάδος και του Αγίου Όρους και στο μέλι Manuka. Στους Πίνακες 2 έως 8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης και της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης για τα βακτήρια: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella infantis*, και *Salmonella typhimurium*.

4.1.1 *Staphylococcus aureus*

Ποικιλία Μελιού	MIC	MBC
Καστανιάς	12,5%	12,5%
Κουμαριάς	12,5%	12,5%
Σουσούρας	12,5%	12,5%
Θυμαρίσιο	12,5%	12,5%
Ελάτης με Θυμάρι	12,5%	12,5%
Γλυκάνισου	6,25%	6,25%
Ελάτης (1)	12,5%	12,5%
Ελάτης (2)	12,5%	12,5%
Manuka	6,25%	6,25 %

Πίνακας 2. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) και ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) έναντι του *Staphylococcus aureus*.

Σύμφωνα με τον Πίνακα 2, παρατηρείται ότι στο *Staphylococcus aureus* μικρότερο MIC εμφάνισε το μέλι Manuka όπως και το μέλι με γλυκάνισο με τιμή MIC 6.25% v/v ενώ τα υπόλοιπα μέλια έδωσαν τιμή MIC 12.5% v/v. Όσον αφορά την ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση, και πάλι όλα τα μέλια έδωσαν τιμή MBC 12.5% v/v, ενώ το μέλι Manuka όπως και το μέλι με γλυκάνισο εμφάνισε τιμή MBC 6.25% v/v.

Έτσι παρατηρείται ότι και στα οκτώ δείγματα μελιών που εξετάστηκαν, αλλά και στο μέλι Manuka, το MIC είναι ίδιο με το MBC. Επομένως, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι όλα τα μέλια, αναστέλλουν τη βακτηριακή ανάπτυξη και έχουν την ικανότητα να τα θανατώνουν στις ίδιες συγκεντρώσεις.

4.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Ποικιλία Μελιού	MIC	MBC
Καστανιάς	25%	25%
Κουμαριάς	25%	25%
Σουσούρας	25%	25%
Θυμαρίσιο	25%	25%
Ελάτης με Θυμάρι	25%	25%
Γλυκάνισου	25%	25%
Ελάτης (1)	25%	25%
Ελάτης (2)	25%	25%
Manuka	12,5%	12,5 %

Πίνακας 3. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) και ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) έναντι της *Pseudomonas aeruginosa*.

Σύμφωνα με τον Πίνακα 3, στη *Pseudomonas aeruginosa*, μικρότερο MIC έδωσε μόνο το Manuka, με τιμή MIC 12,5% v/v. Αντίθετα, όλα τα υπόλοιπα μέλια έδωσαν τιμή MIC 25% v/v. Αντίστοιχα, την ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση είχε και πάλι το

μέλι Manuka, με τιμή MBC 12.5% v/v, ενώ τα υπόλοιπα μέλια, εμφάνισαν τιμή MBC 25% v/v.

Και για την *Pseudomonas aeruginosa*, τα μέλια αναστέλλουν τη βακτηριακή ανάπτυξη και έχουν την ικανότητα να τα θανατώνουν στις ίδιες συγκεντρώσεις.

4.1.3 *Klebsiella pneumoniae*

Ποικιλία Μελιού	MIC	MBC
Καστανιάς	12,5%	12,5%
Κουμαριάς	12,5%	12,5%
Σουσούρας	12,5%	12,5%
Θυμαρίσιο	12,5%	12,5%
Ελάτης με Θυμάρι	12,5%	12,5%
Γλυκάνισου	12,5%	12,5%
Ελάτης (1)	12,5%	12,5%
Ελάτης (2)	12,5%	12,5%
Manuka	12,5%	12,5 %

Πίνακας 4. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) και ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) έναντι της *Klebsiella pneumoniae*.

Κατά τον Πίνακα 4, για την *K. pneumoniae*, όλα από τα εξεταζόμενα μέλια έδωσαν τιμή MIC ίση με 12.5% v/v, συμπεριλαμβανομένου και του Manuka. Όμοια και για την ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση, και τα οκτώ μέλια έδωσαν τιμή MBC 12.5% v/v.

Έτσι γίνεται φανερό ότι και για την *Klebsiella pneumoniae* και τα οκτώ δείγματα μελιών και το μέλι Manuka έδωσαν τιμή MBC ίδια με τη τιμή MIC. Επομένως, τα μέλια, εκτός από το να αναστέλλουν το βακτήριο, είχαν την ικανότητα να το θανατώνουν στις ίδιες συγκεντρώσεις.

4.1.4 *Acinetobacter baumannii*

Ποικιλία Μελιού	MIC	MBC
Καστανιάς	12,5%	12,5%
Κουμαριάς	12,5%	12,5%
Σουσούρας	12,5%	12,5%
Θυμαρίσιο	12,5%	12,5%
Ελάτης με Θυμάρι	12,5%	12,5%
Γλυκάνισου	12,5%	12,5%
Ελάτης (1)	12,5%	12,5%
Ελάτης (2)	12,5%	12,5%
Manuka	6,25%	6,25 %

Πίνακας 5. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) και ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) έναντι του *Acinetobacter baumannii*.

Όπως εμφανίζεται στον Πίνακα 5, στο *A. baumannii*, μικρότερο MIC εμφάνισαν τα μέλι Manuka, με τιμή MIC 6.25% v/v. Όλα τα υπόλοιπα μέλια που εξετάσθηκαν, έδωσαν τιμή MIC 12,5% v/v. Όσον αφορά την ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση, υπάρχει για μια ακόμη φορά ταύτιση στις τιμές MBC και MIC.

Διαπιστώνεται ότι όλα τα δείγματα μελιών και το μέλι Manuka έδωσαν τιμή MBC ίδια με τη τιμή MIC. Επομένως, τα μέλια, εκτός από το να αναστέλλουν το βακτήριο, είχαν την ικανότητα να το θανατώνουν στις ίδιες συγκεντρώσεις.

4.1.5 *Citrobacter freundii*

Ποικιλία Μελιού	MIC	MBC
Καστανιάς	12,5%	12,5%
Κουμαριάς	12,5%	12,5%
Σουσούρας	12,5%	12,5%

Θυμαρίσιο	12,5%	12,5%
Ελάτης με Θυμάρι	12,5%	12,5%
Γλυκάνισου	12,5%	12,5%
Ελάτης (1)	12,5%	12,5%
Ελάτης (2)	12,5%	12,5%
Manuka	12,5%	12,5 %

Πίνακας 6. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) και ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) έναντι του *Citrobacter freundii*.

Σύμφωνα με τον Πίνακα 6, παρατηρείται ότι στο *Citrobacter freundii* όλα τα μέλια έδωσαν την ίδια τιμή MIC 12,5% v/v. Όμοια και για την ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση, και πάλι όλα τα μέλια έδωσαν τιμή MBC 12.5% v/v.

4.1.6 *Salmonella typhimurium*

Ποικιλία Μελιού	MIC	MBC
Καστανιάς	12,5%	12,5%
Κουμαριάς	12,5%	12,5%
Σουσούρας	12,5%	12,5%
Θυμαρίσιο	12,5%	12,5%
Ελάτης με Θυμάρι	12,5%	12,5%
Γλυκάνισου	12,5%	12,5%
Ελάτης (1)	12,5%	12,5%
Ελάτης (2)	12,5%	12,5%
Manuka	12,5%	12,5 %

Πίνακας 7. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) και ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) έναντι του *Salmonella typhimurium*.

Όπως εμφανίζεται στον Πίνακα 7, όλα τα μέλια έδωσαν την ίδια τιμή MIC 12,5% v/v. Όμοια και για την ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση, και πάλι όλα τα μέλια έδωσαν τιμή MBC 12.5% v/v.

Διαπιστώνεται για ακόμη μια φορά ότι όλα τα δείγματα μελιών και το μέλι Manuka έδωσαν τιμή MBC ίδια με τη τιμή MIC. Επομένως, τα μέλια, εκτός από το να αναστέλλουν το βακτήριο, είχαν την ικανότητα να το θανατώνουν στις ίδιες συγκεντρώσεις.

4.1.7 *Salmonella infantis*

Ποικιλία Μελιού	MIC	MBC
Καστανιάς	12,5%	12,5%
Κουμαριάς	12,5%	12,5%
Σουσούρας	12,5%	12,5%
Θυμαρίσιο	12,5%	12,5%
Ελάτης με Θυμάρι	12,5%	12,5%
Γλυκάνισου	12,5%	12,5%
Ελάτης (1)	12,5%	12,5%
Ελάτης (2)	12,5%	12,5%
Manuka	12,5%	12,5 %

Πίνακας 8. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) και ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) έναντι της *Salmonella infantis*.

Τέλος, κατά τον Πίνακα 9, για την *Salmonella infantis*, όλα από τα εξεταζόμενα μέλια έδωσαν τιμή MIC ίση με 12.5% v/v, συμπεριλαμβανομένου και του Manuka. Όμοια και για την ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση, και τα οκτώ μέλια έδωσαν τιμή MBC 12.5% v/v.

Έτσι γίνεται φανερό ότι και για την *Salmonella infantis* και τα οκτώ δείγματα μελιών και το μέλι Μανουκα έδωσαν τιμή MBC ίδια με τη τιμή MIC. Επομένως, τα μέλια, εκτός από το να αναστέλλουν το βακτήριο, είχαν την ικανότητα να το θανατώνουν στις ίδιες συγκεντρώσεις.

4.2 Προσδιορισμός της ακριβής ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration)

Έπειτα, με τη μέθοδο της μικροτιτλοποίησης προσδιορίστηκε η ακριβής ελάχιστη συγκέντρωση του μελιού που απαιτείται για την αναστολή της ανάπτυξης των βακτηριακών ειδών. Τα αποτελέσματα των τιμών MIC για τα βακτήρια *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella infantis*, και *Salmonella typhimurium*, φαίνονται στους Πίνακες 9-15.

4.2.1 *Staphylococcus aureus*

Ποικιλία Μελιού	MIC
Καστανιάς	10%
Κουμαριάς	13%
Σουσούρας	14%
Θυμαρίσιο	14%
Ελάτης με Θυμάρι	11%
Γλυκάνισου	6%
Μέλι Ελάτης (1)	14%
Ελάτης (2)	14%
Manuka	5%

Πίνακας 9. Ακριβής τιμή της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) έναντι του *Staphylococcus aureus*.

Συγκρίνοντας τους πίνακες 2 και 9, παρατηρούμε ότι κάποιες τιμές MIC έδωσαν τώρα μεγαλύτερο MIC, από το πρώτο πείραμα με το μικρότερο εύρος αραιώσεων. Για παράδειγμα, το θυμαρίσιο μέλι, ενώ στην αρχή μας έδωσε MIC περίπου στα 12,5% v/v, στο δεύτερο πείραμα έδειξε MIC στα 14% v/v.

4.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Ποικιλία Μελιού	MIC
Καστανιάς	18%
Κουμαριάς	18%
Σουσούρας	16%
Θυμαρίσιο	16%
Ελάτης με Θυμάρι	20%
Γλυκάνισου	20%
Ελάτης (1)	18%
Ελάτης (2)	18%
Manuka	12%

Πίνακας 10. Ακριβής τιμή της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) έναντι της *Pseudomonas aeruginosa*.

Εάν συγκρίνουμε τους πίνακες 3 και 10, παρατηρούμε ότι όλα τα μέλια έδωσαν ένα πολύ μικρότερες τιμές MIC. Για παράδειγμα, το μέλι σουσούρας, ενώ στην αρχή μας έδωσε MIC περίπου στα 25% v/v, στο δεύτερο πείραμα έδειξε MIC στα 16% v/v.

4.2.3 *Klebsiella pneumoniae*

Ποικιλία Μελιού	MIC
Καστανιάς	13%
Κουμαριάς	14%
Σουσούρας	12%
Θυμαρίσιο	12%
Ελάτης με Θυμάρι	16%
Γλυκάνισου	15%
Ελάτης (1)	15%
Ελάτης (2)	15%
Manuka	8%

Πίνακας 11. Ακριβής τιμή της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) έναντι της *Klebsiella pneumoniae*.

Από τους πίνακες 4 και 11, παρατηρούμε ότι πολλά μέλια, ενώ αρχικά έδωσαν MIC κοντά στο 12,5% v/v, μέσω της ακριβής μέτρησης, αυτά άλλαξαν είτε σε υψηλότερα, είτε πιο χαμηλά. Το μέλι ελάτης, έφτασε το 15% v/v, ενώ το μέλι Manuka 8% v/v MIC.

4.2.4 *Acinetobacter baumannii*

Ποικιλία Μελιού	MIC
Καστανιάς	12%
Κουμαριάς	13%
Σουσούρας	12%
Θυμαρίσιο	12%
Ελάτης με Θυμάρι	12%
Γλυκάνισου	11%
Ελάτης (1)	13%

Ελάτης (2)	13%
Manuka	6%

Πίνακας 12. Ακριβής τιμή της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) έναντι του *Acinetobacter baumannii*.

Εάν συγκρίνουμε τους πίνακες 5 και 12, φαίνεται πως όλα τα μέλια έδωσαν ένα ακριβές MIC πολύ κοντά στην πρώτη μέτρηση. Δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες αποκλίσεις.

4.2.5 *Citrobacter freundii*

Ποικιλία Μελιού	MIC
Καστανιάς	12%
Κουμαριάς	13%
Σουσούρας	13%
Θυμαρίσιο	12%
Ελάτης με Θυμάρι	12%
Γλυκάνισου	15%
Ελάτης (1)	15%
Ελάτης (2)	15%
Manuka	11%

Πίνακας 13. Ακριβής τιμή της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) έναντι του *Citrobacter freundii*.

Συγκρίνοντας τους πίνακες 6 και 13, παρατηρούμε ότι το MIC σε ορισμένες περιπτώσεις αυξήθηκε μέχρι και 2,5 μονάδες όπως το μέλι ελάτης και το μέλι με γλυκάνισο, όπου από περίπου 12,5% v/v, έδωσαν τώρα 15% v/v.

4.2.6 *Salmonella typhimurium*

Ποικιλία Μελιού	MIC
Καστανιάς	14%
Κουμαριάς	13%
Σουσούρας	13%
Θυμαρίσιο	12%
Ελάτης με Θυμάρι	12%
Γλυκάνισου	12%
Ελάτης (1)	13%
Ελάτης (2)	13%
Manuka	11%

Πίνακας 14. Ακριβής τιμή της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) έναντι της *Salmonella typhimurium*.

Από τους πίνακες 7 και 14, διαπιστώνουμε ότι η τιμή του MIC, δεν εμφάνισε μεγάλες αποκλίσεις, καθώς οι τιμές παρέμειναν πολύ κοντά στην αρχική μέτρηση, όπου όλα τα δείγματα είχαν 12,5% v/v MIC.

4.2.7 *Salmonella infantis*

Ποικιλία Μελιού	MIC
Καστανιάς	13%
Κουμαριάς	12%
Σουσούρας	12%
Θυμαρίσιο	12%
Ελάτης με Θυμάρι	13%

Γλυκάνισου	13%
Ελάτης (1)	14%
Ελάτης (2)	14%
Manuka	11%

Πίνακας 15. Ακριβής τιμή της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) έναντι της *Salmonella infantis*.

Τέλος από τους πίνακες 8 και 15, παρατηρούμε ότι όπως και στην *Salmonella typhimurium*, το MIC δεν άλλαξε σημαντικά, αφού καμία τιμή δεν παρεκκλίνει πάνω από 1,5% μονάδα MIC.

5. Συζήτηση

Τα ορεινά της κεντρικής και της βόρειας Ελλάδα χαρακτηρίζονται από υψηλή βοτανική βιοποικιλότητα. Είναι γνωστό ότι η χημική σύνθεση και η βιοδραστικότητα του μελιού επηρεάζονται σημαντικά από τη βοτανική και την εντομολογική προέλευση, καθώς και από το κλίμα και τη γεωγραφική θέση. Επομένως, η διερεύνηση της βιοδραστικότητας των τύπων μελιού που προέρχονται από τα διάφορες περιοχές της Ελλάδος, έχει μεγάλο ενδιαφέρον. Εκτός από τη θρεπτική του αξία, η αντιοξειδωτική δράση του μελιού θεωρείται επίσης σημαντική για την ανθρώπινη υγεία. Η τροποποίηση του οξειδωτικού στρες έχει προταθεί ως ένας από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων το μέλι ασκεί χημειοπροστατευτική δράση κατά του καρκίνου (Badolato et al., 2017).

Πρόσφατες μελέτες σχετικά με τις αντιβακτηριακές ιδιότητες διαφόρων τύπων μελιού που παράγονται στην Ελλάδα έχουν αναφέρει παρόμοια αντιβακτηριακή δράση σε σύγκριση με το μέλι Manuka (Stagos et al., 2018). Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της αντιβακτηριακής και βακτηριοκτόνου δράσης διαφόρων τύπων μελιού της Στερεάς Ελλάδος και του Αγίου Όρους, έναντι επτά κλινικών παθογόνων και παθογόνων τροφίμων: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *S. infantis* και *S. typhimurium*. Χρησιμοποιήθηκαν 8 τύποι μελιού, τα οποία εξετάστηκαν για την αντιβακτηριακή τους δράση σε σύγκριση με το μέλι Manuka, το οποίο έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζει ανασταλτική δράση έναντι 60 βακτηριακών ειδών συμπεριλαμβανομένων αερόβιων και αναερόβιων, Gram- θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων (Mandal and Mandal, 2011).

Για την εκτίμηση της αντιβακτηριακής δράση των μελιών χρησιμοποιήθηκε η *in vitro* μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*Minimum Inhibitory Concentration*) με την χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (*microtiter plates*) και για την διάκριση τους σε αυτά με βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνο δράση χρησιμοποιήθηκε η *in vitro* μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (*Minimum Bactericidal Concentration*).

Από τα οκτώ διαφορετικά μέλια, αυτό που εμφάνισε το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, ήταν το μέλι γλυκάνισου, καθώς φάνηκε να έχει παραπλήσια δράση με το μέλι Manuka έναντι του βακτηρίου *S. aureus* (MIC 6% v/v). Παράλληλα, η δραστικότητα του έναντι του *A. baumannii*, ήταν υψηλότερη σε σχέση με τα υπόλοιπα επτά μέλια της έρευνας. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε έντονη δράση του έναντι των υπόλοιπων βακτηρίων.

Τα τέσσερα από τα οκτώ μέλια, καστανιάς, κουμαριάς, σουσούρας και το θυμαρίσιο έδωσαν παραπλήσιες τιμές MIC (14-11% v/v), αλλά κάθε φορά υψηλότερες σε σχέση με το μέλι Manuka για τα περισσότερα βακτήρια. Παρόμοιες τιμές MIC εμφάνισαν και τα μέλια ελάτης με το μέλι ελάτης με θυμάρι, οι οποίες κυμαίνονταν από 15-11% v/v για τα περισσότερα βακτήρια.

Εξαιρεση στα παραπάνω αποτελέσματα, αποτελεί η *P. aeruginosa*, η οποία φάνηκε να έχει μεγάλη αντοχή έναντι της αντιβακτηριακής δράσης και των οκτώ μελιών. Συγκεκριμένα οι τιμές MIC των οκτώ μελιών κυμαίνονται στα 20% για το μέλι ελάτης με θυμάρι καθώς και για το μέλι γλυκάνισου, στα 18% v/v για τέσσερα μέλια, τα δύο μέλια ελάτης, το μέλι καστανιάς και κουμαριάς, και 16% v/v τα μέλια σουσούρας και το θυμαρίσιο. Ακόμη και το μέλι Manuka εμφάνισε την μεγαλύτερη τιμή MIC (12,5% v/v) σε σχέση με τα υπόλοιπα βακτήρια της έρευνας, γεγονός που αποκαλύπτει την μεγάλη αντοχή της *P. aeruginosa*.

Αναφορικά με τον προσδιορισμό της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης και τα οκτώ καθώς και το μέλι Manuka εμφάνισαν τιμή MBC ίδια με τη τιμή του MIC. Καταλήγουμε έτσι στο συμπέρασμα, ότι όλα τα μέλια που μελετήθηκαν παρουσιάζουν βακτηριοκτόνο δράση. Συνεπώς, όλα τα δείγματα των μελιών ανεξαρτήτως της βοτανικής τους προέλευσης, έδειξαν ότι όχι μόνο αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων, αλλά έχουν και την ικανότητα να τα θανατώνουν.

Οι λόγοι για την διαφορετική ευαισθησία των βακτηρίων στα μέλια διαφορετικής φυτικής και γεωγραφικής προέλευσης δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Μια πρόσφατη μελέτη σχετικά με την επίδραση του μελιού Manuka στην *P. aeruginosa* απέδωσε την δράση του μελιού στην απώλεια της δομής των κυττάρων καθώς και έντονες αλλαγές

στο κυτταρικό σχήμα του βακτηρίου, ακολουθούμενες από εκτεταμένη κυτταρική λύση (Henriques et al., 2011).

Αξίζει να αναφερθεί πως κανένα από τα υπό μελέτη δείγματα μελιών δεν εμφάνισε αντιβακτηριακή ικανότητα μεγαλύτερη από αυτή του μελιού Manuka., Άλλο ένα σημαντικό στοιχείο της έρευνας, είναι ότι τα δύο μέλια ελάτης, δεν εμφανίζουν μεταξύ τους ουσιαστικά καμία διαφορά στις τιμές MIC που παρουσιάζουν. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ίσως μια σταθερή αντιβακτηριακή δράση των μελιών ανεξάρτητα του μήνα περισυλλογής τους και της περιεκτικότητας τους σε λοιπές βοτανικές προσμίξεις.

Συμπερασματικά, είναι φανερό πως δημιουργούνται νέες προοπτικές για τη θεραπευτική δράση του μελιού. Τα περισσότερα από τα βακτήρια που μελετήθηκαν, όπως για παράδειγμα ο *S. aureus* και η *P. aeruginosa*, αποτελούν ισχυρά παθογόνα και συνδέονται με την υγειονομική περίθαλψη, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ισχυρή αντιβακτηριακή δράση που εμφάνισαν τα δείγματα μελιών της έρευνας έναντι αυτών των βακτηρίων, θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια εναλλακτική θεραπεία. Ωστόσο, είναι αναγκαία η πραγματοποίηση περαιτέρω πειραμάτων για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων. Θα ήταν επίσης σημαντικό, να εξεταστούν τα μέλια αυτά και σε άλλα παθογόνα βακτήρια κλινικής σημασίας, καθώς επίσης και να γίνουν επιπλέον μελέτες για να αποδειχθεί και η *in vivo* αντιβακτηριακή τους δράση.

Επιπροσθέτως, τα αποτελέσματα της δράσης των μελιών που εξετάστηκαν στη παρούσα μελέτη έναντι σε βακτήρια σημαντικά για τα τρόφιμα όπως η *S. infantis* και η *S. typhimurium*, είναι πολύ ελπιδοφόρα. Συγκεκριμένα, η ανασταλτική και η βακτηριοκτόνος δράση των μελιών μπορούν να αποτελέσουν ενθαρρυντικά δεδομένα για τη πιθανή χρήση τους ως φυσικά συντηρητικά στη βιομηχανία τροφίμων, καθώς και για την αντιμετώπιση τροφικών δηλητηριάσεων που προκαλούνται από βακτήρια τροφίμων.

Συνολικά, τα υπό μελέτη μέλια έδωσαν εφάμιλλη αντιβακτηριακή ικανότητα από το διεθνώς αναγνωρισμένο μέλι Manuka, γεγονός που μπορεί να τα καταστήσει ως

προϊόν υψηλής προστιθέμενης αξίας συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη της οικονομίας της χώρας μας.

6. Βιβλιογραφία

1. Abeshu, M. and Gelata, B. (2016). Medicinal uses of honey. *Biology and Medicine*, 8(2).
2. Adams, C., Manley-Harris, M. and Molan, P. (2009). The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydrate Research*, 344(8), pp. 1050-1053.
3. Alvarez-Suarez, J.M., Gasparrini, M., Forbes-Hernández, T.Y., Mazzoni, L., Giampieri, F. (2014) The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey. *Foods*. 3(3):420-432. doi: 10.3390/foods3030420.
4. Alzahrani, H., Alsabehi, R., Boukraa, L., Abdellah, F., Bellik, Y. and Bakhotmah, B. (2012). Antibacterial and Antioxidant Potency of Floral Honeys from Different Botanical and Geographical Origins. *Molecules*, 17(9), pp. 10540-10549.
5. Anthimidou, E., Mossialos, D. (2013). Antibacterial activity of Greek and Cypriot honeys against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in comparison to manuka honey. *Journal of Medicinal Food*. (16) 42–47. doi: 10.1089/jmf.2012.0042
6. Atrott, J., Henle, T. (2009). Methylglyoxal in Manuka honey—correlation with antibacterial properties. *Czech Journal of Food Sciences*. (27) 163–165.
7. Badolato, M., Carullo, G., Cione, E., Aiello, F., Caroleo, M.C. (2017) From the hive: Honey, a novel weapon against cancer. *Eur J Med Chem*. 142:290–299. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.07.064.
8. Bonté, F., Desmoulière, A. (2013). Le miel: Origine et composition *Actualités Pharmaceutiques*, (531) 18-21
9. Boucher, H.W., Corey, G.R. (2008) Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 46:344–9
10. Bueno-Costa, F., Zambiasi, R., Bohmer, B., Chaves, F., Silva, W., Zanusso, J. and Dutra, I. (2016). Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *LWT - Food Science and Technology*, 65, pp. 333-340

11. Carter, D.A., Blair, S.E., Cokcetin, N.N., Bouzo, D., Brooks, P., Schothauer, R., Harry, E.J. (2016) Therapeutic Manuka honey: No longer so alternative. *Frontiers of Microbiology*. 7:569. doi: 10.3389/fmicb.2016.00569
12. Chatterjee, S., Maiti, P., Dey, R., Kundu, A., Dey, R. (2014) Biofilms on indwelling urologic devices: microbes and antimicrobial management prospect. *Annals of Medical and Health Science Research*. 4(1):100-4
13. Chow, J. (2002) Probiotics and prebiotics: a brief overview. *J Ren Nutr* 12:76–8
14. Cooper, R. (2014). Honey as an effective antimicrobial treatment for chronic wounds: is there a place for it in modern medicine? *Chronic Wound Care Management and Research*, 1, pp. 15–22.
15. Cortes, G., Borrell, N., Astorza, B., Gomez, C., Sauleda, J. and Alberti, S. (2002). Molecular Analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of Klebsiella pneumonia in a murin model of pneumonia. *Infection and Immunity*, 70(5), pp. 2583-2590.
16. Cortes, M., Vigil, P. and Montenegro, G. (2011). The medicinal value of honey: a review on its benefits to human health, with a special focus on its effects on glycemic regulation. *Ciencia e Investigacion Agraria*, 38(2), pp. 303-317.
17. Coulston, A.M. (2000) Honey...how sweet it is! *Nutr Today* 35:96–100
18. da Silva, P., Gauche, C., Gonzaga, L., Costa, A. and Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, pp. 309-323.
19. Darouiche, R.O. (2004) Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med*. 350(14):1422-9.
20. De-Melo, A., Almeida-Muradian, L., Sancho, M. and Pascual-Mate, A. (2017). Composition and properties of Apis mellifera honey: A review. *Journal of Apicultural Research*, 57(1), pp. 5-37.
21. Dimitrova, B., Gevrenova, R., Anklam, E. (2007) Analysis of phenolic acids in honeys of different floral origin by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Phytochem Anal* 18: 24–32 14.
22. Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H., Peters, G. (2001) Nasal carriage as a source of Staphylococcus aureus bacteremia. *N Engl J Med*. 344(1):11-6.

23. Escriche, I., Sobrino-Gregorio, L., Conchado, A., Juan-Borrás, M. (2017) Volatile profile in the accurate labelling of monofloral honey. The case of lavender and thyme honey. *Food Chem.* 226:61-68. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.01.051.b
24. Escuredo, O., Dobre, I., Fernández-González, M., Seijo, M.C. (2014) Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chem.* 149:84-90 doi: 10.1016/j.foodchem.2013.10.097
25. Fabrega, A., Vila, J. (2013) Salmonella enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), pp. 308–341.
26. 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
27. Gart, E., Suchodolski, J., Welsh, T., Alaniz, R., Randel, R. and Lawhon, S. (2016). Salmonella typhimurium and multidirectional communication in the gut. *Frontiers in Microbiology*, 7.
28. Giammanco, A., Cala, C., Fasciana, T. & Dowzicky, M.J. (2017). Global Assessment of the Activity of Tigecycline against Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens between 2004 and 2014 as Part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. *mSphere* 2, doi:10.1128/mSphere.00310-16
29. Girolamo, F.D., A. D'amato, P.G. (2012). Righetti Assessment of the floral origin of honey via proteomic tools *Journal of Proteomics*, 75, pp. 3688-3693
30. González-Paramás, A.M., Gómez-Bárez, J.A., Cordon Marcos, C. et al (2006) HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). *Food Chem* 95:148–156
31. Gordon, R.J., Lowy, F.D. (2008) Clin Pathogenesis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. *Infect Dis.* 46 Suppl 5():S350-9.
32. Harding, C.M., Hennon, S.W., Feldman, M.F. (2018) Uncovering the mechanisms of Acinetobacter baumannii virulence. *Nat Rev Microbiol.* 16(2):91–102. doi:10.1038/nrmicro.2017.148

33. Henderson, T., Nigam, P.S., Owusu-Apenten, R.K., et al. (2015). A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey. *Food Chem.* 174:119–123.
34. Henriques, A.F., Jenkins, R.E., Burton, N.F., Cooper, R.A (2011) The effect of manuka honey on the structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 30:167–171.
35. Hillitt, K.L., Jenkins, R.E., Spiller, O.B., Beeton, M.L. (2017). Antimicrobial activity of Manuka honey against antibiotic-resistant strains of the cell wall-free bacteria *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum*. *Lett Appl Microbiol.*;64:198–202. doi: 10.1111/lam.12707.
36. Iglesias, M.T., Martián-Alvarez, P.J., Polo, M.C., Lorenzo, C., Gonzalez, M., Pueyo, E.N. (2006) Changes in the free amino acid contents of honeys during storage at ambient temperature. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 54, pp. 9099-9104
37. Johnston, M., McBride, M., Dahiya, D., Owusu-Apenten, R., Nigam, P.S. (2018) Antibacterial activity of Manuka honey and its components: An overview. *AIMS Microbiol.* Nov 27;4(4):655-664. doi:10.3934/microbiol.2018.4.655
38. Karabagias I.K., Badeka, A., Kontakos, S., Karabournioti, S., Kontominas M.G. (2014). Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. *Food Chemistry*, 146, pp. 548-557
39. Kato, Y., Fujinaka, R., Ishisaka, A., et al. (2014) Plausible authentication of Manuka honey and related products by measuring leptosperin with methyl syringate. *J Agr Food Chem.* 62:6400–6407.
40. Kluytmans, J., van Belkum, A., Verbrugh, (1997) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *H Clin Microbiol Rev.* 10(3):505-20
41. Krusna, N., Kowsalya, A., Radha, S. and Narayanan, R. (2007). Honey as a natural preservative of milk. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45(5), pp. 459–464.
42. 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.

43. 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.
44. Lee, H., Churey, J. and Worobo, R. (2008). Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1–2), pp.240–244.
45. M. Madejczyk, D. Baralkiewicz Characterization of Polish rape and honeydew honey according to their mineral contents using ICP-MS and F-AAS/AES *Analytica Chimica Acta*, 617 (2008), pp. 11-17
46. M. Sak-Bosnar, N. Sakac Direct potentiometric determination of diastase activity in honey *Food Chemistry*, 135 (2012), pp. 827-831
47. Martos I, Ferreres F, Yao L et al (2000) Flavonoids in monospecific Eucalyptus honeys from Australia. *J Agric Food Chem* 48:4744–4748 12.
48. Mato, I.S., Huidobro, J.F., Simal-Lozano J.S., Sancho, M.T. (2006). Rapid determination of nonaromatic organic acids in honey by capillary zone electrophoresis with direct ultraviolet detection *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, pp. 1541-1550
49. Mavric, E., Wittmann, S., Barth, G., et al. (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
50. Mayer-Hamblett, N., Rosenfeld, M., Gibson, R.L., Ramsey, B.W., Kulasekara, H.D., Retsch-Bogart, G.Z., Morgan, W., Wolter, D.J., Pope, C.E., Houston, L.S., Kulasekara, B.R., Khan, U., Burns, J.L., Miller, S.I., Hoffman, L.R. (2014) *Pseudomonas aeruginosa* in vitro phenotypes distinguish cystic fibrosis infection stages and outcomes. *Am J Respir Crit Care Med*. 190(3):289-97
51. Missio da Silva P., Gauche, C., Gonzaga, L.V., Oliveira-Costa, A.C., Fett, R. (2016) Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem*. 196:309-323
52. Molan PC, Betts JA (2004) Clinical usage of honey as a wound dressing: an update. *J Wound Care* 13:353–356 15.

53. Molan, P. (1992) The antibacterial nature of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World*, 73(1):5-28
54. Mundo, M., Padilla-Zakour, O. and Worobo, R. (2004). Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *International Journal of Food Microbiology*, 97(1), pp. 1–8.
55. 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.
56. Parsek, M.R., Singh, P.K. (2003) Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 57:677-701
57. Patton, T., Barrett J., Brennan J. and Moran N. (2006). Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey. *Journal of Microbiological Methods*, 64(1), pp. 84-95.
58. Patzold, R., Bruckner, H. (2006) Gas chromatographic detection of D-amino acids in natural and thermally treated bee honeys and studies on the mechanism of their formation as result of the Maillard reaction. *Eur Food Res Technol* 223:347–354 16.
59. Pérez, A.R., Iglesias, M.T., Pueyo, E. et al (2007) Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys. *J Agric Food Chem* 55:360–365 17.
60. Pérez, R.A. (2002) Analysis of volatiles from Spanish honeys by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 50:2633–2637
61. Rezaei, M., Akya, A., Elahi, A., Ghadiri, K. and Jafari, S. (2016). The clonal relationship among the *Citrobacter freundii* isolated from the main hospital in Kermanshah, west of Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 8(3), pp. 175–180.
62. S.A. Won, C. Li, J. Kim, H. Rhee Immunological characterization of honey major protein and its application *Food Chemistry*, 113 (2009), pp. 1334-1338
63. Santas, L. (1983), Insects producing honeydew exploited by bees in Greece. *Apidologie* 14(2):93-103.
64. 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), pp. 1-5.
65. Stagos, D., Soultisiotis, N., Tsadila, C., Papaeconomou, S., Arvanitis, C., Ntontos, A., Mossialos, D. (2018). Antibacterial and antioxidant activity of different types of honey derived from Mount Olympus in Greece. *International journal of molecular medicine*, 42(2), 726–734. doi:10.3892/ijmm.2018.3656
66. Szveda, P. (2017). Antimicrobial activity of honey. *Honey Analysis*. InTech, pp. 215-232.
67. 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.
68. Terrab, A., Gonzále, M.M.L., González, A.G., et al (2003). Characterisation of Moroccan unifloral honeys using multivariate analysis. *Eur Food Res Technol* 218:88–95
69. Thrasyvoulou, A. (1986). The use of HMF and diastase activity as criteria of quality of Greek honey. *Journal of Apicultural Research*, 25:186-195.
70. Thrasyvoulou, A. and Manikis, I. (1995). Some physicochemical and microscopic characteristics of Greek unifloral honeys. *Apidologie*, 26:441-452.
71. Thrasyvoulou, A., Manikis, I. and Tsellios, D. (1994). Liquefying crystallized honey with ultra-sonic waves. *Apidologie*, 25:297-302.
72. Tomas-Barberán, F.A., Martos, I., Ferreres, F. et al (2001). HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *J Sci Food Agric* 81:485–496 13.
73. Tornuk, F., Karaman, S., Ozturk, I., Toker, O.S., Tastemur, B., Sagdic, O., et al. (2013). Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Industrial Crops and Products*, 46, pp. 124-131
74. Tsen, H., Hu, H., Lin, J., Huang, C. and Wang, T. (2000). Analysis of the Salmonella typhimurium isolates from food- poisoning cases by molecular subtyping methods. *Food microbiology*, 17(2), pp. 143-152.

75. 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.
76. Wang, Y., Huang, T., Yang, Y., Kuo, S., Chen, C., Liu, C., Liu, Y., Chen, T., Chang, F., Wu, S., How, C. and Lee, Y. (2018). Biofilm formation is not associated with worse outcome in *Acinetobacter baumannii* bacteraemic pneumonia. *Scientific Reports*, 8(1).
77. Weinstein, H.J. (1959) Control of nasal staphylococcal-carrier states. *N Engl J Med* Jun 25; 260(26):1308-10.
78. 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.
79. Zumla and Lulat (1989), Honey- a remedy rediscovered, *Journal of the Royal Society of Medicine* 82, 384-385
80. Θρασυβούλου Α. και Μανίκης Ι.(1990) Κατηγορίες Ελληνικού μελιού
Μελισσοκομική Επιθεώρηση 4 (6): 158-160.
81. Μπίκος Θ. (1991) Όλα για το μέλι. Έκδοση του ιδίου. σελ. 263-270.
82. Τσέλλιος Δ. και Θρασυβούλου Α. (1989) Μελισσοκομικοί χειρισμοί και
μελισσοκομικά φυτά 2(7-8): 208-210
83. Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. Πληροφορίες για τη
Μελισσοκομία.