Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 9, Number 4 (02-2016)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Antibacterial Effects of Azerbaijan honey on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm

Reza Ghotaslou[1,2], Hojatollah Saghati[3], Alireza Dehnad [3], Behnaz Salahi Eshlaghi[4]

1. Infectious and Tropical Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

2. Departments of Microbiology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

3. High School of Rab- Rashid, Tabriz Iran.

4. Research center of Midwife School, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Article Information

Article history:
Received: 2014/10/27
Accepted: 2015/05/03
Available online:2016/01/10

Article Subject:
Antimicrobial Substances

IJMM 1394; 9(4): 40-46

Corresponding author at:
Dr Reza Ghotaslou

Department of Microbiology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Tel:
+98 411 3364661
Email:
rzgottaslo@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunist pathogen. The infections due to biofilm are difficult to eradicate with current antimicrobial agents. In this study, we investigated the antimicrobial and antibiofilm activity of the honey against 40 *P. aeruginosa* isolates.

Materials and Methods: To assess antimicrobial activity, the MIC and MBC assays were used. Antibiofilm activity of tested honey evaluated using the MTP, Congo Red Agar, and tube methods.

Results: The initial screening demonstrated that 40 of 80 *P. aeruginosa* isolates were biofilm- producer. The honey exhibited a significant antibacterial activity against the planctoninc form of *P. aeruginsa*. The MIC of Polak, Baboneh and Yonjeh honeys against *P. aeruginsa* were ,12.5-25 ,6.25-25 and 12.5-25% w/v ,respectively .The results indicated that the tested honey also had significant antibiofilm activity.

Conclusions: Antibacterial effects of honey are observed in both planctonic and biofilm forms .However ,higher concentrations of honey have needed to inhibit biofilm. These findings indicate the potential antimicrobial of Azerbaijan honey and ,it can be used in the treatment of bacterial infections diseases due to *P. aeruginosa*.

Key Words: Honey, Biofilm, *Pseudomonas aeruginos*

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Ghotaslou R, Saghati H, Dehnad A, Salahi Eshlaghi B. Antibacterial Effects of Azerbaijan honey on Pseudomonas aeruginosa biofilm. Iran J Med Microbiol. 2016; 9 (4) :40-46

www.SID.ir

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران
سال ۹ – شماره ۴ – زمستان ۱۳۹۴
Journal homepage: www.ijmm.ir

مطالعه اثر ضد باکتریایی عسل آذربایجان روی بیوفیلم *سودوموناس ائروژینوزا*

رضا قوطاسلو[۱و۲]، حجت اله سقتی[۳]، علیرضا دهناد[۳]، بهناز صلاحی اشلقی[۴]

۱. مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
۲. گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
۳. موسسه عالی ربع رشید تبریز، تبریز، ایران.
۴. مرکز تحقیقات دانشکده پرستاری و مامائی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۰۵
پذیرش: ۱۳۹۴/۰۲/۱۳
انتشار آنلاین: ۱۳۹۳/۱۰/۲۰
موضوع:
مواد ضد میکروبی
IJMM 1394; 9(4): 40-46

نویسنده مسئول:
دکتر رضا قوطاسلو
گروه میکروبشناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
تلفن: ۰۴۱۱۳۳۳۶۴۶۶۱
پست الکترونیک:
rzgottaslo@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: *سودوموناس ائروژینوزا* یک بیماری زای فرصت طلب است. درمان عفونت های ناشی از بیوفیلم با داروهای جاری مشکل است. در این مطالعه اثر ضد باکتریایی و ضد بیوفیلمی عسل در مقابل ۴۰ ایزوله *سودوموناس ائروژینوزا* بررسی شده است.

مواد و روش ها: اثر ضد میکروبی عسل توسط روش های حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) ارزیابی شد. فعالیت ضد بیوفیلمی عسل مورد تست به روش میکرو پلیت (PTM) و کنگو رد آگار و روش لوله ای انجام گردید.

یافته‌ها: غربالگری اولیه نشان داد که از ۸۰ *سودوموناس ائروژینوزا* ۴۰ ایزوله تولید کننده بیوفیلم بودند. نتایج حاصل از تست های انجام شده نشان داد که عسل دارای خاصیت ضد میکروبی روی نوع پلانکتونی سودوموناس ائروژینوزا می باشند. MIC عسل پولک کلیبر، بابونه سهند و یونجه سهند در مقابل ایزوله های *سودوموناس ائروژینوزا* به ترتیب ۲۵- ۶/۲۵ و ۲۵- ۱۲/۵ و ۲۵- ۱۲/۵ v/w ٪ بود. هم چنین عسل فعالیت ضد بیوفیلمی قابل توجهی دارند.

نتیجه‌گیری: اثرات ضد باکتریائی عسل در هر دو شکل آزاد و بیوفیلمی مشاهده شد، گرچه غلظت های بالاتری از عسل برای مهار بیوفیلم نیاز بود. این مطالعه پتانسیل ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی عسل را تایید می کند و می توان از آن در درمان عفونت های باکتریایی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: بیوفیلم، عسل، *سودوموناس ائروژینوزا*

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

سودوموناس ائروژینوزا یک باکتری گرم منفی، متحرک، اکسیداز مثبت از دسته باسیل های گرم منفی غیر تخمیری است. این باکتری یکی از مهم ترین باکتری های ایزوله شده از بیماران می باشد. این باکتری عامل یک سوم از عفونت های ریوی و شایع ترین دلیل مرگ بیماران سیستیک فیبروزیس می باشد. از مکانیسم های بیماریزائی این باکتری توانائی تولید بیوفیلم و مقاومت سطح بالا به اغلب آنتی بیوتیک ها می باشد (۱).

بیوفیلم‌های باکتریائی، تجمعات پیچیده باکتری ها هستند که در یک پوشش گلیکوکالیکس محصور شده و به سطوح مخاطی می چسبند(۲). بیوفیلم ها با عواملی همچون ضدعفونی کننده ها و دارو از بین نمی روند و بر روی سطح باقی مانده و سبب آلودگی و انتقال بیماری های عفونی می گردند (۳). بیوفیلم های میکروبی در ۶۵ درصد عفونت های انسان مانند بیماری های ریشه دندان، پوسیدگی دندان، عفونت های شنت مغزی، مفصل مصنوعی، کاتترهای وریدی، زخم سوختگی، سوندهای ادراری و تنفسی دیده می شوند (۶-۳). گاهی بیماران دارای بیوفیلم به دلیل وخامت اوضاع می میرند (۹-۶). مهمترین خاصیت متمایز بیوفیلم نوع متفاوت رشد آنها بوده که سبب مقاومت داروئی و نیاز به درمان متفاوت و روش های متمایز شناسائی می گردد (۷). این توده ها

www.SID.ir

مانند اسپور باکتری ها به آنتی بیوتیک ها مقاوم بوده (۱۰) و بعضی از محققین ادعا دارند که مقاومت بیوفیلم نسبت به آنتی بیوتیک ها هزار برابر شکل پلانکتونیک است (۱۰- ۹و ۶) و مقاومت داروئی یکی از دلایل اصلی پایداری باکتری ها و ایجاد بیماری های عفونی مزمن می باشند(۱۰و ۲).

عسل یک محلول فوق اشباع قندی با ویسکوزیته بالا است که توسط زنبور عسل بعد از تغییرات در شهد گل های جمع آوری شده به دست می آید. مواد تشکیل دهنده عسل حدود ۲۰۰ ماده مختلف می باشد. زنبور عسل شهد گل ها را جمع آوری کرده و با موادی که خود ساخته ترکیب می کند. سپس عسل در شانه های عسل ذخیره می شود تا عسل کامل به دست آید. استفاده از طب سنتی در درمان عفونت ها از زمان خلقت انسان به کار برده شده است. عسل در اکثر فرهنگ های قدیمی به منظور درمان مورد استفاده قرار گرفته است. عسل دارای خاصیت مهاری بر علیه انواع باکتری ها اعم از هوازی و غیر هوازی گرم مثبت و گرم منفی است. امروزه نیز درمان های مختلفی بر اساس عسل و دیگر محصولات زنبور علیه عفونت های باکتریایی ارائه می گردد(۱۱).

با توجه به مشکلات عمده بیوفیلم ها و مقاومت بالای باکتری ها به آنتی بیوتیک های متداول و هزینه نسبتا بالا و عوارض این داروهای ضد بیوفیلم موجود، اخیرا استفاده از مواد طبیعی مانند عسل برای درمان بیوفیلم مورد توجه قرار گرفته است. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر ضد باکتریایی و ضد بیوفیلمی عسل آذربایجان روی شکل آزاد باکتری (پلانکتونی) و فرم بیوفیلمی *سودوموناس ائروژینوزا* بود.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها

۸۰ *سودوموناس ائروژینوزا* از نمونه های مختلف بیماران شامل زخم، مخاط گلو و ادرار در آزمایشگاه کشت و توسط تست های بیوشیمیایی و روش های استاندارد تعیین هویت شدند. جهت مطالعه اثر عسل روی باکتری ها؛ بعد از شناسایی و تعیین هویت جهت تشخیص تشکیل بیوفیلم مورد آزمایش قرار گرفتند.

تهیه نمونه های عسل

سه نوع عسل شامل عسل بابونه سهند و یونجه سهند و پولک کلیبر تهیه و سپس استوک اصلی به وسیله حل کردن عسل در محیط کشت آبگوشت مولر-هینتون(MHB) (مرک آلمان) آماده شد. جهت تهیه استوک اصلی با غلظت ۱۰۰ درصد v/w ابتدا وزن مورد نظر از عسل اندازه گیری و سپس در محیط کشت MHB حل شد. محلول فوق از صافی گذرانده و جهت استریلیزاسیون محلول از فیلترهای ۰/۴۵ میکرونی (میلی پور ایرلند) استفاده شد. محلول حاصل از فیلتراسیون در لوله های استریل ریخته و در دمای اتاق و دور از نور نگهداری گردید.

محاسبه MIC و MBC

MIC و MBC عسل به روش استاندارد روی فرم پلانکتونی باکتری آزمایش شدند (۱۱و ۲). در این مطالعه برای تشخیص تشکیل بیوفیلم از سه روش کنگو رد آگار(CRA)، روش لوله ای(TM) و میکرو پلیت(MTP) استفاده گردید (۲). تعیین MIC و MBC و MTP در زیر به اختصار توضیح داده می شود.

برای تعیین MIC از روش آبگوشت رقتی در پلیت های ۹۶ تایی ته صاف استفاده شد(۱۱و ۲). ابتد ۱۵۰ میکرولیتر محیط MHB (مرک آلمان) در هر یک از چاهک ها ریخته شد. بعد از تهیه رقت های ۲ برابر و سریالی از عسل مقدار 10^5 cfu/ml از ایزوله های مورد مطالعه در چاهک ها تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. یکی از چاهک ها به عنوان شاهد منفی بدون تلقیح میکروب باقی ماند و آخرین چاهک از هر ستون بدون عسل و تنها با داشتن ایزوله مورد نظر به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت رشد و عدم رشد چاهک ها بررسی شد. رشد باکتری به صورت کدورت، گلوله ای شدن در ته چاهک و تیرگی و ابری شدن بود.

بعد از تعیین مقدار MIC، برای تعیین MBC مقدار ۵۰ میکرولیتر از چاهک های فاقد کدورت برداشته و روی پلیت آگار کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، تعداد کلنی های ظاهر شده روی پلیت ها شمارش و با تعداد کلنی های ظاهر شده از کشت شاهد مقایسه گردید. کمترین غلظت از عوامل ضد میکروبی که اجازه رشد کمتر از ۰.۱٪ درصد از کشت شاهد را بدهد، به عنوان کمترین غلظت باکتری کشی (MBC) در نظر گرفته شد(۱۱و ۲).

آزمون میکروپلیت (MTP)

برای انجام روش MTP از غلظت MIC ۱/۲, ۱/۴, ۱/۸ محلول عسل استفاده شد. بعد از آماده شدن چاهک و تلقیح 10^5 cfu/ml هر ایزوله، میکرو پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت محتویات هر چاهک به آرامی برداشته و با ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین سه دفعه شسته شد. جهت تثبیت بیوفیلم ۲۰۰ میکرولیتر استات سدیم ۲ درصد به هر یک از چاهک ها اضافه و سپس ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۱/۰ درصد به چاهک ها افزوده شده و به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه گردیدند. بعد از گذشت این مدت چاهک ها به وسیله آب شسته شده و اجازه خشک شدن در دمای اتاق داده شد. رنگ چسبیده به سطح توسط اتانول ۹۵٪ خارج و OD بیوفیلم چسبیده رنگ آمیزی شده توسط اتوریدر میکرو الیزا (بلژیک ELISA autoreader) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. جهت حصول اطمینان آزمایش ها سه بار تکرار گردید(۲).

www.SID.ir

آنالیز داده ها

داده های بدست آمده از مطالعه بوسیله روش های آماری توصیفی (فراوانی - درصد) و آزمون رابطه دقیق فیشر و کای دو با استفاده از نرم افزار SPSS-۱۶ مورد بررسی و تجزیه تحلیل آماری قرار گرفت. در این مطالعه مقدار p کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار بود.

نتایج

از میان ایزوله های تعیین هویت شده ۴۰ ایزوله تشکیل دهنده بیوفیلم قوی انتخاب شدند. نتایج بررسی تشکیل بیوفیلم ۸۰ نمونه *سودوموناس ائروژینوزا* با استفاده از تست های CRA، TM و MTP در جدول ۱ نشان داده شده است. در این تحقیق از سه روش آزمایش استفاده شده برای تولید بیوفیلم و با توجه به نتایج به دست آمده ۷۲ درصد از ایزوله های *سودوموناس ائروژینوزا* توسط تستMTP و با استفاده از تست های TM وCRA به ترتیب ٪۵۹ و ٪۲۱ به عنوان تشکیل دهنده بیوفیلم شناسایی شدند. با توجه به این داده ها MTP یک روش حساس تری در تشخیص تشکیل بیوفیلم می باشد($p<۰,۰۵$).

جهت تعیین MIC و MBC عسل از غلظت ۵۰۰و ۲۵۰ و ۱۲۵و۶۲/۵و۳۱/۲و۱۵/۶ و ۷/۸ میلی گرم در میلی لیتر در مقابل ۴۰ ایزوله *سودوموناس ائروژینوزا* استفاده شد. نتایج این تست در جدول ۲ آورده شده است.

میانگین درصد مهار بیوفیلم ایزوله های سودوموناس ائروژینوزا با غلظت های MIC ۱/۲،MIC ۱/۴ و MIC ۱/۸ عسل یونجه سهند به ترتیب ۶۴ و ۴۰ و ۸ درصد و بابونه سهند به ترتیب ۶۲ و ۳۶ و ۵ درصد و در مقابل همین غلظت ها از عسل پولک کلیبر به ترتیب ۶۹ و ۴۴ و ۶ درصد بود.

از نظر آماری تفاوت معنی داری بین درصد مهاری غلظت های MIC ۱/۲ عسل پولک کلیبر و یونجه سهند ($p=۰/۳۷۷$)، غلظت MIC ۱/۸ عسل پولک کلیبر و بابونه سهند ($p=۰/۱۵۴$) و غلظت های MIC ۱/۲،MIC ۱/۴ و MIC ۱/۸ عسل های یونجه و بابونه با سطح معنی داری به ترتیب ۰/۲۷۰ و ۰/۳۵۸ و ۰/۶۹۶ وجود نداشت. در کل از نظر آماری تفاوت معنی داری بین درصد مهاری غلظت های مختلف عسل پولک کلیبر و یونجه سهند و بابونه سهند ($p=۰/۱$) وجود نداشت.

بحث

فعالیت آنتی باکتریایی عسل توسط محققین زیادی گزارش شده و عسل طبیعی دارای فعالیت های ضد باکتریایی وسیع الطیف در برابر باکتری های بیماری زا است (۱۳-۱۱). در این مطالعه نیز اثرات ضد میکروبی عسل بخوبی اثبات شد و با مطالعات فوق کاملا هم خوانی دارد.

مقایسه MIC و MBC عسل های مورد تست در مقابل ایزوله های *سودوموناس ائروژینوزا* نشان می دهد که هرسه نوع عسل دارای اثر ضد باکتریایی خوبی در مقابل ۴۰ ایزوله *سودوموناس ائروژینوزا* می باشند. در این تحقیق هیچکدام از عسل ها در غلظت های کمتر از۶/۲۵ درصد اثر ضد میکروبی نشان ندادند. میانگین

جدول۱: نتایج تشکیل بیوفیلم ۸۰ *سودوموناس ائروژینوزا* جدا شده با استفاده از روش های MTP، TM و CRA

(%) CRA	(%) TM	(%) MTP	شدت تشکیل بیوفیلم
(۲۱)۱۷	(۱۰) ۸	(۴۶) ۳۷	قوی
۰	(۴۹)۳۹	(۲۶)۲۱	متوسط
(۷۹)۶۳	(۴۱) ۳۳	(۲۸) ۲۲	ضعیف/ندارد

جدول۱: نتایج تشکیل بیوفیلم ۸۰ *سودوموناس ائروژینوزا* جدا شده با استفاده از روش های MTP، TM و CRA

نوع عسل	MBC (w/v)	تعداد (درصد)	MIC (w/v)	تعداد (درصد)
عسل یونجه	۵۰٪	۳۵ (۸۷/۵)	۲۵٪	۳۶ (۹۰)
	۲۵٪	۵ (۱۲/۵)	۱۲/۵٪	۴ (۱۰)
عسل بابونه	۵۰٪	۳۸ (۹۵)	۲۵٪	۳۸ (۹۵)
	۲۵٪	۲ (۵)	۱۲/۵٪	۲ (۵)
عسل پولک	۵۰٪	۱۳ (۳۲/۵)	۲۵٪	۱۲ (۳۰)
	۲۵٪	۱۷ (۴۲/۵)	۱۲/۵٪	۱۵ (۳۷/۵)
	۱۲/۵٪	۱۰ (۲۵)	۶/۲۵٪	۱۳ (۳۲/۵)

Archive of SID
www.SID.ir

MIC عسل ها ۱۶/۹۶ درصد بود؛ کمترین ۶/۲۵ و بیشترین ۲۵ درصد بودند. بیشترین اثر مهاری (کمترین MIC) مربوط به عسل پولک کلیبر بود و عسل های یونجه و بابونه سهند در رتبه بعدی قرار داشتند. بر اساس داده های آماری تفاوت معنی داری بین MIC و MBC عسل یونجه و عسل بابونه وجود نداشت(p بیشتر از۰/۰۵) در این مطالعه شاید مهار رشد باکتری ها توسط عسل وابسته به مقدار و وزن عسل است (P کمتر از۰/۰۵). مهار بیوفیلم در حضور عسل ۶/۲۵ درصد نشانگر کاهش توده بیوفیلم با رقت های بالاتر و قدرت ضد میکروبی بالا می باشد. از طرفی MBC عسل روی ایزوله های مورد مطالعه در تمامی موارد یک غلظت بالاتر از MIC بودند. میانگین MBC عسل ها۳۳/۹۲ درصد بود؛ کمترین MBC ۱۲/۵ درصد و بیشترین ۵۰ درصد بودند.

مطالعات زیادی روی اثرات ضد میکروبی عسل در قسمت های مختلف جهان صورت گرفته است. Khosravi و همکاران اثر ضد باکتریایی سه نوع عسل ایران را بررسی کرده و گزارش کردند، فعالیت ضد باکتریایی خوبی دارند. بر اساس گزارش آن ها MIC عسل چهارمحال بختیاری، تهران و پاییزه کوهستان های شمال ایران در مقابل *سودوموناس ائروژینوزا* به ترتیب ۷۰ و ۶۷ و ۷۱ درصد v/v می باشد(۱۲) و MIC این مطالعه نسبت به مطالعه ما، بالاتر بود. Tajik و همکاران اثر پنج نوع عسل تجاری تولید شده در مراتع ارومیه را آزمایش کرده و کمترین MIC را در برابر *سودوموناس ائروژینوزا* با مقدارw/v ۴۰ ٪ برای عسل مراتع ترگه ور به دست آوردند(۱۳). بر اساس مطالعات Cooper و همکاران MIC عسل در مقابل *سودوموناس ائروژینوزا* ۱۷درصد w/v بود (۱۴). Complin و همکاران فعالیت ضد باکتریایی عسل مانوکا را در برابر یک سویه استاندارد (ATCC ۹۰۲۷) و یک سویه بالینی *سودوموناس ائروژینوزا* بررسی کرده و MIC به ترتیب w/v، ۱۵/۳ و۲۵/۶ درصد به دست آوردند(۱۵). بر اساس تحقیقات Aled Robert و همکاران در انگلستان MIC و MBC عسل مانوکا در برابر *سودوموناس ائروژینوزا* به ترتیب ۱۲ و ۱۶ درصد بود (۱۶).

ماتریکس بیوفیلم با ممانعت از ورود مواد ضد میکروبی نقش مهمی در برابر عوامل درمانی داشته و علاوه بر این وجود فنوتیپ مقاوم، ناهمگونی سرعت رشد و متابولیک، پاسخ به استرس عمومی و ژن های اختصاصی مقاومت نقش مهمی را در مقاومت دارویی بیوفیلم دارند(۲). مکانیسم های مقاومت ذاتی همچون پمپ های افلوکسی دارو، نفوذپذیری پایین غشا، غیر فعال سازی دارو، نیز در مقاومت دارویی فرم بیوفیلمی دخیل هستند(۱۷). هم اکنون با توجه به عوارض عدیده ناشی از مصرف داروها و نیز مقاومت دارویی به خصوص در رابطه با داروهای شیمیایی توجه برخی از پژوهشگران به مواد با منشا طبیعی معطوف شده است. عسل به عنوان ماده شفا بخش در انواع عفونت های موضعی و عفونت های باکتریایی مورد مصرف قرار می گیرد. عسل می تواند در کنار سایر داروهای شیمیایی به دلیل داشتن ترکیبات ضد باکتریایی و به علت اسیدیته زیاد و داشتن مواد قندی با اثرات اسموتیکی بالا که مانع رشد باکتری ها می گردد و هم چنین وجود مهارکننده هایی مانند پراکسید هیدروژن، فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک که توسط زنبور عسل از گیاهان مختلف وارد عسل می گردد، در درمان انواع بیماری های عفونی مورد استفاده قرار می گیرد(۱۹-۱۸). اثرات ضد بیوفیلمی عسل های قسمت های مختلف جهان توسط محققین بررسی و نتایج مطالعات آنها در دسترس می‌باشد، اما نتایج جستجو در منابع اطلاعاتی نشان داد که تاکنون هیچ تحقیقی از اثرات ضد بیوفیلمی عسل آذربایجان در مقابل باکتری ها انجام نشده است. Complin و همکاران فعالیت ضد بیوفیلمی عسل مانوکا را در برابر یک سویه استاندارد و یک سویه بالینی *سودوموناس ائروژینوزا* بررسی کرده و۴۳/۳ و ۴۸/۳ درصد به دست آوردند (۱۵). Okhiria و همکاران اثر ضد بیوفیلمی عسل را مطالعه و به این نتیجه رسیدند که مواجهه عسل مانوکا ۴۰٪ موجب کاهش قابل توجه در توده ی بیوفیلم *سودوموناس ائروژینوزا* می گردد (۱۹). بر اساس تحقیقات Merckoli و همکاران در نروژ، عسل در مقابل پنج پاتوژن مهم زخم های پوستی، دارای فعالیت مهاری روی بیوفیلم های تشکیل شده بودند و طبق نتایج آن ها عسل medi و عسل جنگل نروژ در غلظت های به ترتیب ۱۲و ۲۵ درصد، موجب مرگ باکتری های بیوفیلمی می شوند(۲۰). Alandegni و همکاران در ایتالیا از مطالعه روی عسل به این نتیجه رسیدند که ۹۱٪ از بیوفیلم های *سودوموناس ائروژینوزا* مورد مطالعه حساس به عسل می باشند (۲۱). در این مطالعه از نظر فعالیت ضد بیوفیلمی عسل ها، مهار تشکیل بیوفیلم توسط هر سه نوع عسل در غلظت های ۱/۲, ۱/۴, ۱/۸ MIC مشاهده شد. اثر مهاری بیشتر از ۶۰ ٪ در غلظت ۱/۲ MIC هر سه نوع عسل مورد تست در برابر بیوفیلم *سودوموناس ائروژینوزا* ثبت شد. اثر مهارکنندگی عسل پولک کلیبر و یونجه سهند در غلظت ۱/۲ MIC ، نسبت به عسل بابونه سهند بیشتر می باشد. در غلظت ۱/۴ MIC و ۱/۸ MIC به ترتیب قدرت مهاری عسل پولک کلیبر و یونجه سهند بیشتر بود. در مقایسه با اثرات ضد بیوفیلمی عسل گزارش شده از نقاط مختلف جهان، اثر ضد بیوفیلمی عسل آذربایجان نسبت به عسل مانوکا بالاتر و نسبت به عسل ایتالیا کمتر است. در این مطالعه عسل پولک خاصیت ضدمیکروبی و ضد بیوفیمی بالاتر از عسل یونجه و بابونه سهند داشت و احتمالا عسل پولک حاوی مواد با خاصیت ضد میکروبی بیشتری است و نیاز به تحقیق بیشتری با کمک آزمون های تجزیه شیمیائی دقیقی است تا بتوان ماهیت آنها را تشخیص داد. تفاوت مشاهده شده در قدرت ضد باکتریایی عسل های مورد تست بستگی به نوع منطقه جغرافیایی، منبع گیاهی، فصل جمع آوری عسل و شرایط جمع آوری و شرایط ذخیره سازی آن و سن زنبور دارد. ماهیت ضد باکتریایی عسل به عوامل مختلفی چه به صورت واحد و چه به صورت سینرژیک وابسته است. در کل نصف باکتری ها (۴۰ از ۸۰ *سودوموناس ائروژینوزا*) دارای قدرت تولید بیوفیلم در عرض ۲۴ ساعت بودند،

www.SID.ir
Archive of SID

اما تولید بیوفیلم یک شکل نبودند و حساسیت مختلفی به عسل داشتند. دلیل این امر شاید کشت مجدد باکتری ها در آزمایشگاه و نداشتن ژن تولید کننده بیوفیلم و یا عدم بیان آن و نوع مطالعه در آزمایشگاه باشد. معمولا ادعا شده که تولید بیوفیلم در موجود زنده (*in vivo*) بیشتر از شرایط آزمایشگاه است(۱۷). در این تحقیق به منظور شناسائی تولید بیوفیلم با سه روش غربال گری شدند. با توجه به نتایج و درصد های به دست آمده روش MTP یک روش حساس در تشخیص تشکیل بیوفیلم می باشد، و این امر در مطالعات قبلی هم گزارش شده است (۲۱ و ۱۱).

می توان نتیجه گرفت که هر سه نوع عسل آذربایجان دارای اثر ضد باکتریایی و ضد بیوفیلمی نسبتا قوی می باشند و بیشترین اثر ضد باکتریائی مربوط به عسل پولک کلیبر بود. عسل می تواند به عنوان یک ماده طبیعی، ارزان قیمت، بسیار مفید و موثر در درمان بیماری های عفونی خصوصا در بخش سوختگی، مراقبت های ویژه و بیماران سیستیک فیبروزیس مورد استفاده قرار گیرد. به دلیل عدم گزارش در مورد اثر ضد بیوفیلمی عسل آذربایجان پیشنهاد می شود اثرات آن در حالت پلانکتونی و بیوفیلمی باکتری های دیگر و قارچ ها بررسی گردد. با کمک علوم نوین مانند بیوتکنولوژی داروئی اثر ترکیبی عسل با گیاهان دارویی، پمادها و صابون ها و مواد ضد عفونی کننده و آنتی بیوتیک ها سنجیده شود. تغییرات بیان ژن در باکتری های تیمار شده با عسل و در *in vivo* بر روی ایزوله های بالینی و هم بر روی سویه های استاندارد بررسی همه جانبه ای صورت گیرد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با کمک مالی مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی تبریز صورت گرفته و قسمتی از آن پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی داروئی(آقای حجت الله سقتی) بود. از آقایان امیر جاهد اورنگ و حسین بیژن پور کارکنان آزمایشگاه بیمارستان شهید مدنی تبریز که در تهیه نمونه های باکتریائی کمک نموده اند کمال تشکر را داریم.

Reference

1. Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza Sh. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilms. PLOS pathogens 2008;4(1): 1-11.

2. Ghotaslou R, Salahi B. Effects of oxygen on In-vitro biofilm formation and antimicrobial resistance of Pseudomonas aeruginosae." Pharm Sci 2013;19(3):96.

3. Parsek MR, Greenberg EP. Socio-microbiology: the connections between quorum sensing and biofilms. Trends Microbiol 2005, 13(1):27–33.

4. Wagner VE, Iglewski BH. Pseudomonas aeruginosa biofilms in CF infection. Clin Rev Allergy Immunol 2008, 35(3): 124-34.

5. Geesey GG, Richardson WT, Yeomans HG, Irvin RT, Costerton JW. Microscopic examination of natural sessile bacterial populations from an alpine stream. Can J Microbiol 1977; 23(12):1733–36.

6. Adal KA, Farr BM. Central venous catheter-related infections: a review. Nutr 1996;12(3):208–13.

7. Archibald LK, Gaynes RP. Hospital acquired infections in the United States: the importance of interhospital comparisons. Nosocom Infec 1997; 11(2):245–55.

8. Dickinson M, Bisno AL. Infections associated with prosthetic devices: clinical considerations. Int J Artif Organs 1993;16(11):749–54.

9. Kolter R, SiegeleDA, Tormo A. The stationary phase of the bacterial life cycle. Annu Rev Microbiol 1993;47(1):855–74.

10. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. Annu Rev Microbiol 1995;49(1):711–45.

11. Mirsalehiyan A, Tahmasebi G, Mirafshar S, Razaghi M, Abrishamy A. In vitro Antibacterial activity of some Iranian Honeys. Med J Tab Uni Med Sc 2006; 28(13):113-119.(In Persian).

12. Khosravi-Darani K, Khaksar R, Esmaeili S, Seyed-Reihani F, Zoghi A, Shahbazizadeh S. Antifungal and Anti-bacterial Synergistic Effects of Mixture of Honey and Herbal Extracts. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences 2013;15(8), 30-33.(In Persian).

13. Tajik H, Shokohi SJF, Elahi S. Assessment of Antimicrobial Efficacy of Commercial Urmia's Honeys. IJFST 2007; 4(2):39-45.(In Persian).

Archive of SID

www.SID.ir

14. Cooper R, Jenkin L, Cooper S. Inhibition of biofilm of Pseudomonas aeruginosa by medi honey in vitro. J Wound Care 2014; 23(3): 93-96.

15. Camplin A, Maddocks E. Manuka honey treatment of biofilms of Pseudomonas aeruginosa results in the emergence of isolates with increased honey resistance. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2014;13(19): 1-5.

16. Roberts A, Maddocks S, Cooper R. Manuka honey is bactericidal against Pseudomonas aeruginosa and results in differential expression of oprF and algD. Microbiol 2012;158: 3005–3013.

17. Ghotaslou R, Salahi-Eshlaqghi B. Biofilm of Pseudomonas aeruginosa and new preventive measures and anti- biofilm agents. J Rafsanjan Univ Med Sci 2013; 12(9): 747-68. (In Persian).

18. Taghavizad R. The Healing Effect of Honey as Stated in Quran and Hadith. Quran Med 2011;1(2):3-8.

19. Okhiria OA, Henriques AFM, Burton NF, Peters A, Cooper RA. Honey modulates biofilms of Pseudomonas aeruginosa in a time and dose dependent manner. J Api-Prod ApiMed Sci 2009;(1): 6 – 10.

20. Merckoll P, Jonassen T, Vad ME, Jensson SL, Melby KK. Bacteria, biofilm and honey: A study of the effects of honey on 'planktonic' and biofilm-embedded chronic wound bacteria. Scand J Infect Dis 2009;41(5): 341-347.

21. Alandejani T, Marsan J, Ferris W, Slinger R, Chan F. Effectiveness of honey on Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa biofilms. Otolaryngo–Head and Neck Surg 2009;141(1):114-118.

Archive of SID

www.SID.ir