مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۱، شماره۴ (شماره پیاپی ۴۵)، زمستان ۱۳۸۷، ۹۵-۸۷

تاثیر عصاره اتیل استاتی موم زنبور عسل بر کلونیزاسیون استرپتوکوکوس موتانس

علیرضا شعاع حسنی[۱]، کسری حمدی[۲]، امیر قائمی[۳*]

۱- دانشجوی دکترا تخصصی میکروبیولوژی،گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات فارس،فارس، ایران- باشگاه پژوهشگران جوان، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران

۲- کارشناس ارشد میکربیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران- باشگاه پژوهشگران جوان واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران

۳- مربی، دکترا میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گلستان، ایران - باشگاه پژوهشگران جوان واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت ۸۷/۶/۱۰، تاریخ پذیرش ۸۷/۱۱/۲

چکیده

مقدمه: بیوفیلم استرپتوکوک‌های دهانی به خصوص استرپتوکوکوس موتانس از عوامل اصلی ایجاد پلاک دندانی و پوسیدگی دندان است. مواد طبیعی مهار کننده کلونیزاسیون این باکتری‌ها پر اهمیت هستند. در این پژوهش برای اولین بار اثر عصارهٔ موم زنبور عسل بر تولید گلوکوزیل ترانسفراز که یک آنزیم کلیدی کلونیزاسیون استرپتوکوکوس موتانس می‌باشد مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: در این مطالعه تجربی عصاره‌گیری توسط حلال‌های اتیل استاتی و متانولی با دستگاه عصاره‌گیر کلونجر انجام شد. ابتدا مواد محلول در اتیل استات جدا شدند و پس از تبخیر حلال اول متانول ۷۰ درصد به عنوان حلال خنثی به محلول اضافه شد و جزء باقیمانده نیز توسط آب دو بار تقطیر جدا گردید. حداقل غلظت بازدارندگی این عصاره از رشد استرپتوکوکوس موتانس با روش انتشار در محیط مایع تعیین گردید. از روش تهیهٔ رقت‌های متوالی در محیط نوترینت براث غنی شده با ۱ درصد سوکروز که درون ارلن‌های حاوی لام‌های شیشه‌ای استریل تهیه شده بود جهت ارزیابی بیوفیلم استفاده گردید. تولید آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز نیز با استفاده از الکتروفورز روی ژل ۱۵ درصد پلی اکریلامید مشخص گردید.

نتایج: غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی لیتر از عصارهٔ اتیل استاتی موم باعث توقف کامل تشکیل بیوفیلم گردید و تولید آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز را متوقف نمود. غلظت ۶ میلی‌گرم در میلی لیتر این عصاره توقف رشد باکتری‌ها را به دنبال داشت و غلظت ۳۰ میلی‌گرم در میلی لیتر آن برای استرپتوکوکوس موتانس باکتریساید بود($p < ۰/۰۱$).

نتیجه گیری: عصارهٔ موم زنبور عسل در غلظت‌های کمتر از حد کشندگی قادر به توقف تولید گلوکوزیل ترانسفراز که آنزیم اصلی تشکیل بیوفیلم در استرپتوکوکوس موتانس می‌باشد، بود.

واژگان کلیدی: استرپتوکوکوس موتانس، عصارهٔ اتیل استاتی، گلوکوزیل ترانسفراز، موم زنبور عسل

***نویسنده مسئول:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، کد پستی:۳۳۱-۱۴۱۱۵

Email: ghaemi@modares.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

موم فرآورده‌ای از زنبور عسل (Apis mellifera) است که با مصرف شهد گیاهان، تغلیظ آن، انجام تغییرات آنزیمی و سپس ترشح آن از غدد شکمی زنبورهای کارگر تولید می‌شود. برای تولید ۱ گرم موم نیاز به مصرف ۸-۶ گرم عسل می‌باشد(۱). پروپولیس یا همان صمغ قهوه‌ای رنگ گیاهی نیز به صورت یک مادهٔ چسبناک و رزین مانند در درختان خاصی تولید شده و از سوراخ‌های موجود در تنهٔ آن‌ها به بیرون تراوش می‌کند. زنبورهای عسل این مواد چسبناک را نیز از درختان جمع‌آوری نموده و آن را به کندو می‌آورند تا با موم تولیدی از غدد شکمی خود مخلوط نموده و توسط آن سطح موم‌های قبلی را بپوشانند که در این حالت موم سفید رنگ تولیدی زنبورهای عسل به رنگ قهوه‌ای تغییر می‌یابد(۲). دلیل استفاده از این صمغ سود بردن از خواص ضد قارچی و ضد باکتریایی پروپولیس در حفاظت از کلونی برضد بیماری‌ها می‌باشد. نشان داده شده که پروپولیس از عوامل مهم از بین بردن باسیلوس لاروا که یک عامل بیماری‌زای مهم لارو زنبورها می‌باشد، است(۳). موم زنبور عسل به صورت طبیعی و خام حاوی کتون‌ها، لاکتون‌ها، کینون‌ها، استروئیدها، اسید بنزوئیک، استرها، ویتامین B_3 ، قندها، ۵ درصد پروتئین و تعدادی از اسید آمینه‌های موجود در گردهٔ گل‌ها و یکسری از ترکیبات معدنی از قبیل منیزیم، نیکل، آهن، روی و کلسیم می‌باشد(۴).

گزارشاتی از اثرات سینرژیستی بین پروپولیس و آنتی بیوتیک‌ها وجود دارد و خاصیت باکتریسایدی و یا باکتریوستاتیکی پروپولیس‌ها وابسته به مقدار و غلظت عصارهٔ به کار رفتهٔ آن می‌باشد. برخی اوقات نیز نشان داده شده که اثر پروپولیس‌ها بهتر از داروهای مورد استفاده بوده است(۵). در اروپا و افریقای شمالی خاصیت پروپولیس در بهبود زخم‌ها از سال‌ها قبل شناخته شده بود و مطالعات تاریخی نشان می‌دهد که در قرن دوازدهم میلادی از آن برای درمان زخم‌ها و عفونت‌های دهان و گلو استفاده می‌گردیده است(۶). خاصیت درمانی موم زنبور عسل در بهبود زخم‌ها و سوختگی‌ها براساس صفات ضد میکربی، حذف رطوبت و ممانعت از عملکرد اکسیژن استوار است. این خواص باعث تمیز و مرطوب ماندن زخم‌ها، آلوده نشدن توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها و محفوظ ماندن در برابر اثرات مخرب اکسیژن می‌گردد. پمادها و آنتی بیوتیک‌های جدید نیز چنین عملی را انجام می‌دهند ولی از طرفی باعث صدمه به بافت‌ها و ایجاد اسکار یا پوسته پوسته شدن گستردهٔ زخم‌ها نیز می‌شوند(۱۰-۷). از فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکربی موم‌های آغشته به پروپولیس می‌توان در صنایع غذایی نیز بهره گرفت زیرا برخلاف بسیاری از نگهدارنده‌های مواد غذایی نه تنها دارای اثر جهش زایی و سرطانزایی نیست بلکه می‌تواند برای سلامت انسان مفید نیز باشد(۱۱). استرپتوکوک‌های دهانی جزء مهمی از مجموعهٔ پلاک‌های دندانی هستند و از مهم‌ترین اعضای این مجموعه استرپتوکوکوس موتانس است که نقش مهمی در پوسیدگی دندان دارد(۱۲). مکانیسم اولیهٔ اتصال استرپتوکوکوس موتانس ایجاد هوموپلیمرهای گلوکان از سوکروز توسط گلوکوزیل ترانسفراز است(۱۳) که نشان داده شده اصلی‌ترین عامل بیماری‌زایی برای این گونهٔ استرپتوکوکی در پوسیدگی دندان می‌باشد(۱۴). گلوکوزیل ترانسفراز، دو واکنش اصلی را کاتالیز می‌کند که شامل شکستن سوکروز به گلوکز و فروکتوز (فعالیت سوکرازی) و انتقال واحدهای گلوکز در موقعیت C-3/ C-6 برای تولید گلوکان (فعالیت ترانسفرازی) می‌باشد(۱۵).

هدف از این مطالعه تعیین اثر موم زنبور عسل بر روی استرپتوکوکوس موتانس و بیان آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز توسط آن بوده است. از آنجا که گلوکوزیل ترانسفراز جزء مهم‌ترین آنزیم‌های استرپتوکوکی برای تولید پلیمرهای گلوکان از گلوکز می‌باشد و نقش اصلی را در ایجاد اتصال و تشکیل بیوفیلم ایفا می‌کند یافتن موادی که قادر به توقف این روند باشند ضروری به نظر می‌رسد.

روش کار

این آزمایش یک تحقیق تجربی- آزمایشگاهی می‌باشد. مادهٔ اصلی مورد استفاده در این پژوهش، موم زنبور

Archive of SID
www.SID.ir

عسل بود که در فصل بهار از یک زنبورداری محلی در ارتفاعات شهرستان لاهیجان واقع در شمال ایران تهیه گردید. عصاره گیری توسط حلال‌های اتیل استاتی و متانولی توسط دستگاه عصاره‌گیر کلونجر(Clevenger) تهیه شده توسط شرکت کلونجرِ امریکا انجام شد(۱۶). موم‌های جمع‌آوری شده به قطعات پنج میلی‌متری بریده شده و پس از شستشو در آب دوبار تقطیر در دمای آزمایشگاه خشک شدند. در مرحلهٔ اول تمام مواد محلول با افزودن ۵ میلی لیتر اتیل استات جدا شده و زمانی که حلال اول در دستگاه تبخیر گردید، متانول ۷۰ درصد به عنوان حلال خنثی به محلول اضافه گردید. جزء باقیمانده که قسمت نامحلول در اتیل استات بود توسط آب دو بار تقطیر جدا گردید و عصارهٔ حاصل پس از فیلتر شدن توسط فیلتر ۰/۴۴ میکرون تا زمان استفاده در یک فالکن استریل و در یخچال ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت بررسی اثر ضد میکربی غلظت‌های مختلف عصارهٔ اتیل استاتی موم زنبور عسل و تاثیر آن بر تشکیل بیوفیلم، سویهٔ استاندارد استرپتوکوکوس موتانس ATCC 25175 تهیه شده از بانک میکربی مرکز تحقیقات ایران، مورد آزمایش قرار گرفت. برای کشت اولیه از نوترینت براث (مرک، آلمان) استفاده شد. جهت تشکیل بیوفیلم از همین محیط به اضافهٔ ۱ درصد سوکروز در ارلن مایر و برای ارزیابی قابلیت ضد میکربی عصاره از محیط مولر هینتون آگار (دیفکو، فرانسه) به اضافهٔ ۵ درصد خون دفیبرینهٔ گوسفند استفاده گردید. برای سنجش اثر ضد میکربی، ابتدا از روش تهیهٔ رقت‌های سریالی حاوی ۳۰-۱ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره استفاده شد و پس از تعیین غلظت باکتریوستاتیکی و باکتریسایدی عصاره از روش انتشار چاهک طبق راهکار کربی بائر جهت تعیین قطر هالهٔ ممانعت از رشد استفاده گردید(۱۷). چاهک‌هایی با قطر ۵ میلی‌متر روی پلیت‌های مولر هینتون آگار ایجاد شد و به ترتیب به ۱ تا۳۰ میکرولیتر از عصاره‌ها آغشته شد. از کشت ۸ ساعتهٔ استرپتوکوکوس موتانس در نوترینت براث، توسط سواب بر روی پلیت‌های مولر هینتون آگار حاوی ۵ درصد خون دفیبرینهٔ گوسفند کشت پر داده شد و تا حصول نتیجه به مدت ۱۸ ساعت در ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. برای کنترل مثبت از پنی سیلین ۱۰ میکروگرم و جهت کنترل منفی از سرم فیزیولوژی استریل استفاده شد. جهت مشاهدهٔ تعداد سلول‌های زنده در غلظت‌های باکتریوستاتیک و باکتریساید عصاره، نمونه‌برداری از ارلن‌های تیمار شده با غلظت‌های مذکور هر ۱۰ دقیقه به مدت دو ساعت انجام گردید و این نمونه‌ها به منظور شمارش تعداد سلول‌های زنده روی پلیت های مولر هینتون آگار کشت داده شدند. جهت ارزیابی تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس از روش تهیهٔ رقت در محیط مایع استفاده شد(۱۸). از کشت ۱۸ ساعتهٔ میکروارگانیسم در نوترینت براث به کمک اسپکتروفتومتر Shimadzo UV 120-01 سوسپانسیون‌هایی با $OD_{600} = 1$ ساخته شد که حاوی 10^6 سلول در هر میلی لیتر می‌باشد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌ها به ارلن‌های حاوی لام‌های شیشه‌ای استریل که دارای محیط نوترینت براث حاوی ۱ درصد سوکروز بودند و با رقت‌های صفر تا ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصارهٔ موم تیمار شده بودند، تلقیح گردید. این ارلن‌ها در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شدند و روزانه به مدت دو هفته جهت رویت بیوفیلم مورد بررسی قرار گرفتند. لام‌های شیشه‌ای موجود در ارلن‌های شاهد و تیمار شده با جریان ملایم سرم فیزیولوژی استریل شسته شده و تعداد باکتری‌های موجود بر سطح آن‌ها شمارش گردیدند. برای سنجش معنی‌دار بودن تعداد سلول‌های متصل در بیوفیلم از آزمون کای دو ($p<۰/۰۱$) استفاده گردید. تمام اطلاعات بر اساس سه بار تکرار در هر مرحلهٔ آزمایش ارائه گردید و میانگین اندازه‌گیری‌ها در سه تکرار با استفاده از فرمول کای ۲ بیان شد. بررسی تولید آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز با الکتروفورز پروتئین تام استرپتوکوکوس موتانس روی ژل ۱۵ درصد پلی اکریلامید انجام شد. سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های صفر تا یک میلی‌گرم عصاره از محیط استخراج شدند و در ۳ میلی‌لیتر Tris HCl 30mM (pH.8) شناور گردیدند، این سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه در g× ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردید و رسوب آن در ۲۰۰ میکرولیتر سوکروز

Archive of SID
www.SID.ir

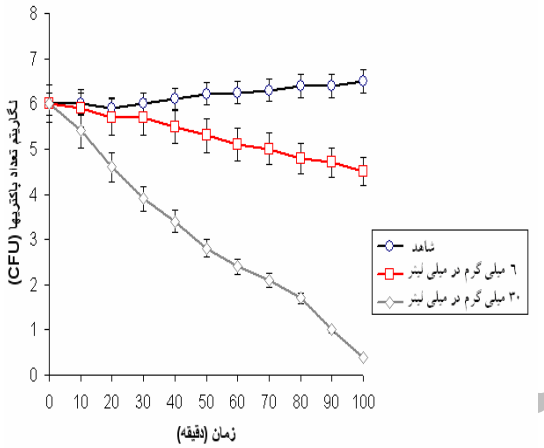
محلول در Tris HCl شناور شد، این سلول ها در سرم فیزیولوژی به صورت سوسپانسیون در آمده و به مدت ۳۰ دقیقه به همراه ۳۰ میکروگرم لیزوزیم روی یخ قرار گرفتند و پس از آن ۳۰ ثانیه نیز در سونیکاتور قرار داده شدند. این سوسپانسیون به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰ ×g سانتریفیوژ شده و پروتئین‌های محلول و نامحلول آن با استفاده از سمپلر از سطح لوله‌ها برداشته شد. این نمونه با بافر نمونهٔ 3LUG طبق روش Ausable (۱۹) مخلوط گردید و تا زمان الکتروفورز در فریزر ۱۸- درجهٔ سانتی گراد نگهداری شد. الکتروفورز نمونه روی ژل ۱۵ درصد SDS PAGE طبق پروتکل لاملی(۲۰) انجام شد. شناسایی نهایی گلوکوزیل ترانسفراز توسط وسترن بلات با آنتی بادی پلی کلونال GTF I (Glucosyltransferase I) صورت گرفت.

نتایج

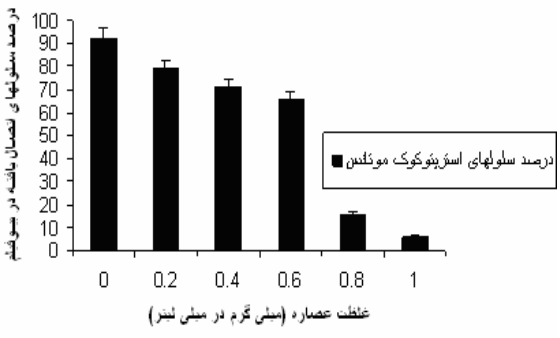
قطر منطقهٔ مهار رشد برای استرپتوکوکوس موتانس در غلظت ۶ میلی‌گرم در میلی لیتر از عصارهٔ اتیل استاتی موم زنبور عسل ۲±۱۷ میلی‌متر بود که خاصیت باکتریوستاتیکی نشان می‌داد و در غلظت ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از این عصاره، قطر ناحیهٔ عدم رشد ۲±۴۲ میلی‌متر بود که اثر باکتریسایدی در این غلظت به وضوح مشخص بود. این مقادیر از نظر فعالیت ضد باکتریایی در مقایسه با نمونهٔ کنترل مثبت یعنی پنی سیلین که هاله‌های عدم رشدی به اندازهٔ ۳۳ میلی‌متر ایجاد می‌کند، قابل ملاحظه است. شکل ۱ تعداد باکتری‌های زنده مانده در محیط تیمار شده با غلظت‌های ۶ و ۳۰ میلی گرم در میلی‌لیتر از این عصاره را تا ۱۰۰ دقیقه پس از تلقیح اولیه نشان می‌دهد که نتیجهٔ کاملاً معنی داری ($p<۰/۰۱$) می‌باشد.

در بررسی ارلن‌های تلقیح شده با این میکروارگانیسم، تشکیل بیوفیلم بر جدارهٔ داخلی ارلن و لام‌های شیشه‌ای درون ارلن‌ها پس از ۱۸ ساعت کاملاً واضح بود. نتایج کشت میکروارگانیسم‌های تیمار شده با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره که پس از شستشو با سرم فیزیولوژی قادر به اتصال روی لام‌های شیشه‌ای بودند در مقایسهٔ با نمونهٔ تیمار نشده کاهش زیادی نشان می‌داد($p<۰/۰۱$) که نتایج آن در شکل ۲ دیده می‌شود.

غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی لیتر از این عصاره قادر به مهار سنتز آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز در شرایط آزمایشگاهی بود. البته در غلظت ۰/۸ میلی‌گرم در میلی لیتر هنوز تولید GTF I بر روی ژل پلی اکریلامید مشاهده گردید(شکل ۳). که تایید کنندهٔ نتیجهٔ حاصل از تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس بود.

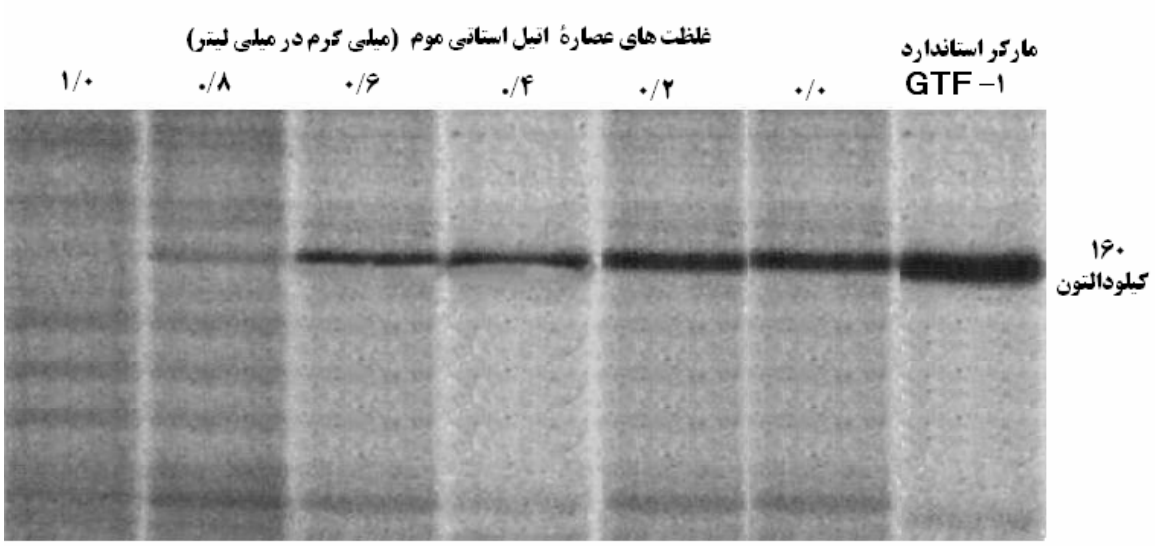


شکل ۱. حساسیت استرپتوکوکوس موتانس در شرایط آزمایشگاهی به عصاره‌های ۶ و ۳۰ میلی گرم در میلی لیتر عصارهٔ اتیل استاتی موم زنبور عسل در مقایسه با نمونهٔ شاهد ($p<۰/۰۱$).



شکل ۲. درصد باکتری‌های موجود در بیوفیلم بر روی لام‌های شیشه‌ای تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصارهٔ اتیل استاتی موم زنبور عسل در محیط نوترینت براث حاوی ۱ درصد سوکروز ($p<۰/۰۱$).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۳. مارکر سمت راست نشان دهندهٔ جایگاه آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز با وزن ملکولی حدود ۱۶۰ کیلودالتون است که در وسترن بلات با آنتی بادی پلی کلونال GTF-I مشخص گردیده است.

بحث

در راه پیشرفت‌های جدید برای شناخت کامل پوسیدگی‌های دندانی و محو کامل آنها یافتن راهکارهای جدیدی برای کاهش موارد پلاک‌های دندانی و عوامل ایجاد کنندهٔ آنها ضرورت دارد. در این مطالعه اثر عصارهٔ موم که یک فرآوردهٔ طبیعی زنبور عسل است بر روی تولید آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز باکتری استرپتوکوکوس موتانس که از مهم‌ترین عوامل ایجاد پوسیدگی‌های دندان است، مورد بررسی قرار گرفت.

بسیاری از مواد آلی دارای فعالیت ضد باکتریایی توسط حلال های مختلف، از موم زنبور عسل استخراج گردیده‌اند. اغلب این‌ها ترکیبات فنلی (فلاوونوئیدها و اسیدهای فنلی) می‌باشند که در اصل منشاء گیاهی دارند(۲۵-۲۱). پژوهش ها در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از عصاره‌های موم نشان دهندهٔ فعالیت ضد باکتریایی این ماده با طیف بسیار گسترده‌ای می‌باشد(۲۸-۲۶)؛ هرچند که بیشترین فعالیت آن در باکتری‌های گرم مثبت و مخمرها گزارش گردیده است.

مطالعات ما نشان داد که عصارهٔ اتیل استاتی موم زنبور عسل در غلظت ۶ میلی گرم در میلی لیتر اثر باکتریوستاتیک روی استرپتوکوکوس موتانس دارد و هاله‌های ممانعت از رشدی معادل ۲±۱۷ میلی‌متر بر روی محیط حاوی این باکتری ایجاد می‌نماید(شکل ۱). از طرف دیگر فعالیت باکتریسایدی این عصاره در غلظت ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر روی استرپتوکوکوس موتانس به وضوح مشخص بود و تا منطقهٔ ۲±۴۲ میلی‌متری چاهک حاوی این غلظت از عصاره هیچ گونه رشدی دیده نمی‌شد($p<۰/۰۱$).

کوهن و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که موم زنبور عسل قادر به از بین بردن هلیکوباکتر پایلوری در شرایط بالینی می‌باشد(۲۹). نوسترو و همکاران نیز در سال ۲۰۰۵ ثابت کردند که موم زنبور عسل قادر به مقابله و از بین بردن عفونت‌های مزمن واژنی و هرپس تناسلی می‌باشد(۳۰) هم‌چنین ایمهوف و همکاران در سال ۲۰۰۵ نقش ضد میکربی موم را در عفونت‌های دستگاه تنفسی و عفونت پریودنتال نشان دادند و مشخص گردید که خاصیت ضدمیکربی این مواد بسته به ناحیهٔ جغرافیایی زندگی زنبورها و هم‌چنین نوع روش عصاره گیری متفاوت می‌باشد(۳۱). در سال ۲۰۰۵، نوری و ال- وایلی نشان دادند که مخلوط عسل، روغن زیتون و موم زنبور عسل (با نسبت‌های ۱ :۱: ۱) در

Archive of SID
www.SID.ir

درمان اگزما، پسوریازیس و درماتیت بسیار مفید است و قادر به ممانعت از رشد استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکنس جدا شده از انسان نیز می‌باشد(۳۲).

در سال ۱۹۹۶، کرول و همکاران نشان دادند که اشریشیا کلی و تعدادی از گونه‌های کلاستریدیوم، استافیلوکوکوس و استرپتوکوکوس که در عفونت‌های فوقانی دستگاه تنفس نیز یافت می‌شوند و به پنی سیلین مقاوم هستند تحت تاثیر عصارهٔ موم زنبور عسل قرار می‌گیرند. هم‌چنین این محققین نشان دادند که فعالیت آنتی بیوتیک‌هایی مانند استرپتومایسن، نئومایسین و تتراسایکلین تحت تاثیر پروپولیس موجود در موم افزایش می‌یابد از اینرو جهت کسب نتایج بهتر، به جای جایگزین کردن آن با آنتی بیوتیک‌ها می‌توان این ماده را به همراه آنتی بیوتیک‌ها مصرف نمود(۳۳). مطالعات دیگری نشان داد که مواد موجود در موم باعث ممانعت از رشد استرپتوکوکوس نومونیه و همووفیلوس انفولانزا می‌شود ولی روی باکتری‌های روده‌ای اثری ندارد. اثر ضد میکربی عصارهٔ موم بر روی استرپتوکوکوس موتانس نیز بسیار قابل توجه و جالب می‌باشد(۳۴). همان طور که در مقدمه ذکر گردید موم زنبور عسل حاوی مقدار زیادی قند نیز می‌باشد که درصد زیادی از آن را گلوکز و فروکتوز تشکیل می‌دهد. این قندها قادرند به مقدار زیادی آب را به خود جذب کنند و زمانی که وارد محیط شوند قسمت‌های اطراف خود را به صورت سوپ غلیظی در آورند که دارای فعالیت آبی کمتری باشد. از اینرو جذب آب از قسمت خارجی باکتری‌ها نیز می‌تواند مانع از رشد آن‌ها گردد. از طرفی غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی لیتر از عصارهٔ موم زنبور عسل قادر به توقف رشد استرپتوکوکوس موتانس نبود ولی در این غلظت تولید گلوکوزیل ترانسفراز را متوقف نمود (شکل ۳). شلینگ و بون در سال ۱۹۹۲ و یاماشیتا و همکاران در سال ۱۹۹۳ نشان دادند که سنتز گلوکان توسط استرپتوکوکوس موتانس دارای اهمیت زیادی در بیان ژن‌های بیماری‌زایی این میکروارگانیسم می‌باشد. گلوکوزیل ترانسفراز به عنوان دکستران سوکراز یا سوکروز ۶ گلوکوزیل ترانسفراز شناخته می‌شود که یک پروتئین ۱۶۲ کیلودالتونی است(۱۴، ۳۵). هم‌چنین مطالعهٔ ما از تشکیل بیوفیلم در همین غلظت نشان داد که تولید گلوکوزیل ترانسفراز رابطهٔ مستقیم و محکمی با قدرت اتصال سلول‌ها به یکدیگر و به سطوح دارد (شکل ۲) به طوری که سلول‌ها در حداقل غلظت عصاره دارای حداکثر تمایل برای تشکیل بیوفیلم بودند($p<0/01$) (شکل ۲).

نتیجه گیری

عصارهٔ اتیل استاتی موم زنبور عسل در غلظت‌های کمتر از حد کشندگی با جلوگیری از تولید گلوکوزیل ترانسفر از مانع از تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس می‌گردد و در غلظت های بالاتر دارای اثر باکتریسایدی روی آن می‌باشد که حاصل آن عدم ایجاد پلاک‌های دندانی و در نتیجه پوسیدگی دندان خواهد بود. با جدا کردن مواد موثر موجود در موم زنبور عسل از قبیل پروپولیس می‌توان تعداد میکروارگانیسم‌های پاتوژن را به مقدار زیادی کاهش داد و از آن برای جلوگیری از کلونیزاسیون باکتری‌ها و به خصوص مهار تشکیل بیوفیلم که خود باعث مقاومت سلول‌ها به مواد ضد میکربی و آنتی بیوتیک‌ها می‌شود و امکان ایجاد سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها را فراهم می‌آورد بهره گرفت. از آنجا که عصارهٔ موم دارای اثر قابل توجهی روی استرپتوکوک‌های فلور دهانی بود پیشنهاد می‌گردد که اثر این عصاره بر روی رشد، تقسیم و اگرسین‌های سایر باکتری‌های ساکن دهان که باعث پوسیدگی دندان می‌گردند از جمله پروتلا، باکتروئیدس، بیفیدوباکتریوم، لاکتوباسیلوس و ... بررسی گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از زحمات ریاست محترم باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران، جناب آقای دکتر محمد اطیابی جهت تامین

Archive of SID
www.SID.ir

مالی این پژوهش و از آقای هادی شعاع حسنی به دلیل کار آماری داده‌ها کمال سپاسگذاری را دارند.

منابع

1. Aparna AR, Rajalakshmi D. Honey - its characteristics, sensory aspects and applications. Food Reviews International 1999; 15(4): 455-471.
2. Crane E. Sources of honey, in Crane. Ed, Honey Heinemann, London. 1975; p. 1-16.
3. Willix DJ, Molan PC, Harfoot CG. A comparison of the sensitivity of wound infecting species of bacteria to the antibacterial activity of manuka honey and other honey. J of Applied Bacteriology 1992; 73: 388-394.
4. Castro-Vazquez L, Perez-Coella MS, Cabezudo MD. Analysis of volatile compounds of rosemary honey. Chromatographia J 2003; 57: 227-233.
5. Mincione B and Leuzzi U. Honey In: Macrae R, Robinson RK, Sadler M. editors, Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. London: Academic Press. 1993. p. 2382-2387.
6. International Honey Commission. Honey Quality and International Regulatory Standards, Bee Department, Federal Dairy Institute, Bern. 2002.
7. Ashoor A. The Hospital of Honey - Medical Treatment by Honey. Al Quran Library, Cairo. 1985.
8. Nzeako BC, Hamdi J. Antimicrobial potential of honey on some microbial isolates. Medical Sciences Journal 2000; 2: 75-79.
9. Cooper RA. How does honey heal wounds? In: Munn P, Jones R, editors, Honey and Healing. International Bee Research Association, Cardiff: 2001. p. 27-34.
10. Aysan E, Ayar E, Aren A, Cifter C. The role of intraperitoneal honey administration in preventing post operative peritoneal adhesions. European J of Obstet & Gynecol and Reproductive Biology 2002; 104 (2): 152-155.
11. Somal NA, Coley KE, Molan PC, Hancock BM. Susceptibility of Helicobacter pylori to the antibacterial activity of manuka honey. J of Royal Society of Medicine 1994; 87: 9-12.
12. Hamilton IR, Bowden GH. Oral microbiology, Encyclopedia of microbiology. San Diego, Academic Press. 2000. p. 466-480.
13. Kuramitsu HK. Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. Critical Review of Oral Biological Medicine 1993; 4: 159-176.
14. Yamashita Y, Bowen WH, Burne RA, Kuramitsu HK. Role of the Streptococcus mutans gtf genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. Infection and Immunity J 1993; 61: 3811-3817.
15. Eto A, Saido TC, Fukushima K, Tomioka S, Imai S, Nisizawa T, Hanada N. Inhibitory effect of a self-derived peptide on Glucosyltransferase of Streptococcus mutans. J of Biological Chemistry 1999; 274(22): 15797-15802.
16. Accelerated solvent extraction (ASE) sample preparation techniques for food and animal feed Samples. Technical Note 209, LPN 1781, 2006. Dionex Corporation, Sunnyvale, CA.
17. National Health Protection Agency. Susceptibility testing. National Standard Method 2006; BSOP 45 Issue 2.
18. Shoae Hassani A, Amirmozafari N, Ordouzadeh, N, Hamdi K, Nazari R, Ghaemi A. Volatile component of Camellia sinensis inhibit growth and biofilm formation of oral streptococci in vitro. Pakistan Journal of Biological Sciences 2008; 11(10): 1336-1341.
19. Ausable FM. Current Protocols in Molecular Biology, editors. F.M. Wiley Press. 1989. p. 1-2.
20. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-685.
21. Russell KM, Molan PC. The identification of some antibacterial constituents of New Zealand manuka honey. J of Agricultural Food Chemistry 1988; 38: 10-13.
22. Bogdanove S, Rieder K, Ruegg M. Determination of pinocembrin in honey using HPLC. J of Apic Research 1989; 28: 55-57.

Archive of SID

www.SID.ir

23. Wahdan HA. Causes of the antimicrobial activity of honey. J of Infec disease 1998; 26: 167-176.
24. Weston RJ, Mitchell KR, Allen KL. Antibacterial phenolic components of New Zealand honey. Food Chem J 1999; 64: 295-301.
25. Weston RJ, Brocklebank LK, Lu Y. Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys. Food Chemistry J 2000; 70: 427-435.
26. Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. Phytotherapy Research J 2001; 15: 561-571.
27. Trusheva B, Popova M, Naydenski H, Tsvetkova I, Gregorio Rodriguez J, Bankova V. New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. Fitoterapia J 2004; 75: 683-689.
28. Popova M, Silica S, Kaftanoglu O, Bankova V. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. Phytomedicine 2005; 12: 221-228.
29. Cohen HA, Varsano I, Kahan E, Sarrell EM, Uziel Y. Effectiveness of an herbal preparation containing echinacea, propolis, and vitamin C in preventing respiratory tract infections in children. Archives in Pediatrics Adolescent Medicine 2004; 158: 217-221.
30. Nostro A, Cellini L, Di Bartolomeo S. Antibacterial effect of plant extracts against Helicobacter pylori. Phytotherapy Research 2005; 19: 198-202.
31. Imhof M, Lipovac M, Kurz Ch, Barta J, Verhoeven HC, Huber JC. Propolis solution for the treatment of chronic vaginitis. International J of Gynecology 2005; 89: 127-132.
32. Noori S, Al Waili. Mixture of Honey, Beeswax and Olive Oil Inhibits Growth of Staphylococcus aureus and Candida albicans. Archives of Medical Research 2005; 36(1): 10-13.
33. Krol W. Inhibition of neutrophils chemiluminescence by ethanol extracts of propolis (EEP) and its phenolic components. J of Ethnopharmacology 1996; 55: 19-25.
34. Inderst R. Special Effects of natural substance combinations for basal regulation. alternative medicine 2004; 16(2): 48-52.
35. Schilling KM, Bowen WH. Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for Streptococcus mutans. Infection and Immunity J 1992; 60: 284- 95.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Arak University of Medical Sciences
Winter 2009; 11(4): 87-95

Original Article

In vitro Reduction in Colonization of Streptococcus mutans by Honey Beeswax Ethyl Acetate Extract

Shoae Hassani AR[1], Hamdi K[2], Ghaemi A[3*]

1- PhD Student of Micrbiology, Microbiology Department, Young Researchers Club, Fars Sceinces & Research Tehran Azad University, Tehran, Iran.
2- MSc of Micrbiology, Biology Department, Young Researchers Club, Tehran, Science & Research Azad University, Tehran, Iran.
3- Instructor, Microbiologist, Microbiology Department, Young Researchers Club, Golestan Medical Sceinces University, Tehran, Iran.

Received 31 Aug, 2008 Accepted 21 Jan, 2008

Abstract

Background: Dental plaque is composed of bacterial derived extracellular polysacharide known as glucan which is synthesized by Streptococcus mutans. Natural substances that could inhibit the plaque formation of the bacteria have a significant importance. This investigation has evaluated the honey beeswax extract effect on the Gft production, the key enzyme of S. mutans colonization factor for the first time.

Methods and Materials*:* In this experimental study extraction of the sample conducted with ethyl acetate and methanol solutions in the Clevenger extractor. The ethyl acetate soluble fraction was separated in the first step and after the evaporation of the first solute, the 70% methanol as inactive solvent was added and the water mixture was used as a second solution, then materials were separated with dH_2O. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the honey beeswax extract was assessed by Broth diffusion method. Examination of cell adherence (Biofilm Inhibitory Concentration, BIC) was calculated by colony counts from surface scratching of glass slides in the bacterial media that supplied with 1% sucrose. Glucosyltransferase expression was detected by 15% SDS poly acrylamide gel electrophoresis.

Results*:* Concentration of 1mg/ml of ethyl acetate honey beeswax extract was inhibited completely biofilm and it was prevented the production of glucosyltransferase enzyme. The concentration of formation 6 mg/ml of the extract had bacteriostatic effect and 30 mg/ml concentration of this extract had bactericidal for S. mutans ($P<0.01$).

Conclusion: The sub- bacterial concentrotion honey beeswax extract was able to block the major enzyme that contributes to S. mutans biofilm formation.

Key words: Streptococcus mutans, Ethyl acetate extract, Glucosyltransferase, Honey eeswax

*Corresponding author;
Email: ghaemi@modares.ac.ir
Address: Nov 14115-331, Virology Departmant, Faculty of Medicaine, Tarbiat Modares University, Tehran, Itan.

Archive of SID
www.SID.ir