



**MALMÖ HÖGSKOLA**  
**Hälsa och samhälle**

# **INTERAKTION MELLAN HONUNG MED MJÖLKSYRABAKTERIER OCH VANLIGA HUMANPATOGENER I SÅR**

SOFIA DANIELSSON

Examensarbete i biomedicinsk  
högskola  
15 högskolepoäng  
Biomedicinska analytikerprogrammet  
Mars-april 2012

laboratorievetenskap Malmö

Hälsa och samhälle  
205 06 Malmö

# INTERAKTION MELLAN HONUNG MED MJÖLKSRYRABAKTERIER OCH VANLIGA HUMANPATOGENER I SÅR

SOFIA DANIELSSON

Danielsson, Sofia. Interaktion mellan honung med mjölksyrabakterier och vanliga humanpatogener i sår. *Examensarbete i Biomedicins laborietvetenskap 15 hp*. Malmö högskola: Hälsa och Samhälle, 2012.

Honung har sedan tusentals år använts vid sårhäkning. Honungens antibakteriella egenskaper tros bland annat komma från 13 mjölksyrabakterier som härstammar från bina som tillverkat honungen. För att i framtiden kunna utveckla ett honungsbandage innehållande dessa mjölksyrabakterier behöver det undersökas hur de olika honungssorterna tillsammans med mjölksyrabakterierna påverkar vanliga humanpatogener i sår. Dessutom om det är ett alternativ att modifiera näringen till mjölksyrabakterierna. När honungsbandaget ligger på såret kommer den tunna honungsfilmerna att spädas ut av sårvätskan, därför kommer det även att undersökas hur honungens, tillsammans med mjölksyrabakterierna, antibakteriella effekt påverkas i olika spädningar.

För att kunna undersöka detta testades olika honungstyper tillsammans med mjölksyrabakterier mot humanpatogener på både fast och i flytande medium. Honungen löstes i både vatten och pollenmedium samt innehöll mjölksyrabakterier.

Resultaten visade att det inte är någon betydande skillnad mellan de olika honungssorterna, men om mjölksyrabakterierna har tillgång till pollen förökar de sig bättre än om de bara har tillgång till honung och vatten. Detta resulterar i att det bildas fler antibakteriella produkter. Det gick också att konstatera att *S. aureus* är känsligare än *E. coli* mot mjölksyrabakterierna.

*Nyckelord:* Honung, mjölksyrabakterier, inhiberingstest, , sårpatogener.

# INTERAKTION MELLAN HONUNG MED MJÖLKSRYRABAKTERIER OCH VANLIGA HUMANPATOGENER I SÅR

SOFIA DANIELSSON

Danielsson, Sofia. Interaction between honey with lactic acid bacteria and common wound pathogens. *Degree Project, 15 Credit Points*. Biomedical Laboratory Science, Malmö University: Health and Society, Department of Biomedical Laboratory Science, 2012.

Honey has been used for thousands of years for wound healing. The antibacterial effects of honey are believed to reside, in among other things, in novel 13 LAB (lactic acid bacteria) that originate in honeybee when they produce their honey. To develop a new honey bandage containing these LAB it's necessary to examine how different honey types with the 13 LAB affects common pathogens in wounds. In addition, if there is an option that also adding pollen medium as a nutrient for the LAB. When the honey bandage comes in contact with wounds honey is diluted by the pus, therefore the study will also include a test on how honey's, together with viable LAB, antibacterial efficacy change in different conditions.

Types of honey together with viable LAB will be tested against human wound pathogens in combinations using both solid and liquid growth media. Honey will be diluted with water or pollen medium and modified by adding viable LAB.

The results showed that there is no significant difference between honey types studied, but if the LAB have access to pollen they will grow better, and therefore produce more antibacterial products, comparing to if they only have access to water and honey. It also showed that honey had an inhibitory effect on the LAB. It was also possible to conclude that *S. aureus* are more sensitive than *E. coli* against the LAB.

*Key words:* , honey, lactic acid bacteria, inhibition tests, , wound pathogens

# INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	1
ABSTRACT	2
INNEHÅLLSFÖRTECKNING	3
INLEDNING	4
Syfte	5
Frågeställning	5
MATERIAL OCH METOD	5
Etiska aspekter	
Pollenmedium	5
Honung	6
Honungstyper som ska testas	6
Föroreningar i mogen honung	6
pH i utspädd honung	6
Hur honung påverkas av kokning	6
Spädningsserier av honungen	6
Bakterierna	6
Beräkning av antalet levande bakterier VC (Viable Count)	6
Mjölksyrabakterierna	6
Humanpatogener	7
Odling av mjölksyrabakterierna	7
Bakterielösning av mjölksyrabakterierna	7
De 13 mjölksyrabakteriernas antibakteriella effekter	7
Mjölksyrabakteriernas förmåga att växa i olika honungslösningar	7
Patogenernas förmåga att växa i pollenhonungsbuljong	7
Inhiberingstester	7
På agarplattor med brunn	7
På agarplattor med filterdisk	8
På agarplattor med agarpuck	8
I buljong	8
RESULTAT	9
Bakterieväxt i honungslösningar	9
Inhiberingstester	10
I buljong	11
DISKUSSION	14
REFERENSER	17

# INLEDNING

Honung tillverkas av honungsbin och består utav nektar som bina samlar in från blommor och växter. Beroende på årstid och placering av bikupan kommer därför den färdiga honungen ha vissa variationer i sitt innehåll. Mellan blomman och bikupan förvarar biet nektarn i sin så kallade honungsmage, som är en del av strupen och är mycket tånjbar. När biet kommer till kupa överförs nektarn till ett nytt bi som i sin tur överför den till en cell i en honungskaka. När det mesta av vattnet har avdunstat tillsätter bina enzymer så att nektarn omvandlas till honung. När honungen är färdig täcks denna över med ett vaxtäck[C].

Honung har flera antibakteriella egenskaper så som hög sockerhalt och låg surhetsgrad[H]. Dessutom tillsätter bina vid honungstillverkningen ett enzym som tillverkar väteperoxid, detta enzym aktiveras när honungen späds och är som mest aktivt vid honungskoncentrationer mellan 30 % till 50 %[I].

Flera studier har gjorts för att hitta den honungssort som är mest antibakteriell. De flesta försöken visar att alla honungssorter har en viss hämmande effekt på vanliga sårpatogener. Dock är de bara hämmande inte avdödande[P, Q]. En av de honungssorter som har visat sig vara mest effektiv och ha en viss avdödande effekt är den Nya Zeeländska honungssorten Manuka. En av de orsakerna som tros ge Manukahonungen dess antibakteriella effekt är en hög koncentrationen av metylglyoxal. Beroende på hur antibakteriell Manukahonungen är graderas den med så kallad Manukafaktor, ju högre Manukafaktor desto högre antibakteriell effekt[O].

Honung har använts inom sårhäkning sedan 2000 f. kr i bland annat Egypten, Grekland och Indien[F] och än i dag används honungsbandage som en alternativ behandling vid svårhäkta sår. Dagens honungsbandage består av en tunn film av honung som applicerats på ett förband som sedan läggs direkt på såret. När såret sedan vätskar sig späds honungen. Honungen som används är oftast medicinsk behandlat honung av exempelvis Manukanektarng eller artificiellt framtagen honung. All honung som används inom vården filtreras från pollen och bestrålas med gammabestrålning för att döda eventuella bakteriesporer[G]. Det är sen tidigare känt att honung ofta innehåller både jäst och bakteriesporer från bland annat *Bacillus* arter och *Paenibacillus larvae P. larvae* är en vanlig bipatogen som orsakar amerikansk yngelröta. Det är en sjukdom som infekterar bilarverna genom födan och yttrar sig genom att larverna ruttnar inifrån[D].

Ett stort problem vid sårhäkning är bakterietillväxten i såret. Den vanligaste sårpatogenen är *S. aureus* MRSA (Meticillinresistent *Staphylococcus aureus*) är multiresistent stafylokokker som idag är ett stort problem inom sjukvården[J]. Andra multiresistent bakterier är ESBL (extended spectrum betalactamase), det är bakterier som har plockat på sig en betalaktamas plasmid och börja producera betalaktamas vilket leder till att bakterierna blir mer resistent. En av de bakterier som kan utvecklas till en ESBL är *E. coli* (*Escherichia coli*) som också är vanligt förekommande i sår[K]. *E. coli* förökar sig mycket fort och har en delningstid på ca 30 minuter[R]. En annan bakterie mycket vanligt förekommande i sår är *P. aeruginosa* (*Pseudomonas aeruginosa*)[L].

Nyligen upptäcktes 13 nya arter av mjölksyrabakterier i honung och i binas honungsmage[C]. Mjölksyrabakterier är grampositiva och icke sporbildande. De

kan beroende på art vara både kocker och stavar. De mjölksyrabakterierna som hittades i honungen är nio stycken av arten *Lactobacillus* och fyra *Bifidobacterium*. Det som har gett mjölksyrabakterierna sitt namn och är det att alla släkten inom gruppen har gemensamt att de producerar mjölksyra. På grund av att de själva producerar syra är de syratåliga.. De producerar även bakteriedödande proteiner så kallade bakteriociner detta gör att mjölksyrabakterier sedan länge använts i som probiotika[M]. Mjölksyrabakterier hittas i fermentera livsmedel som demjolk, kött, växter och i magtrakten hos däggdjur[N]. De mjölksyrabakterierna som hittades i honungen fungerar som ett naturligt skydd för bina och skyddar bland annat från de mikroorganismer som kan finnas i nektarn och bipatogener så som *P. larvae* [D].

Tidigare försök har visat att dessa 13 nya mjölksyrabakterier har en hög antibakteriell effekt (opublicerade resultat). Målet är att utveckla ett nytt effektivare honungsbandage innehållande antingen mjölksyrabakterier eller de antibakteriella produkter som mjölksyrabakterierna har producerat. För att kunna avgöra vilken honungssort som skall användas till det nya bandaget ska mjölksyrabakteriernas antibakteriella effekt testas i olika honungssorter. Dessutom ska det testas om det kan vara en fördel för mjölksyrabakterierna om de har tillgång till pollen. När bandaget ligger på såret kommer honungen lösas upp av sårvätskan, därför ska det även testas hur vätska påverkar den antibakteriella effekten.

### **Syfte**

Ta reda på hur olika honungstyper tillsammans med 13 olika mjölksyrabakterier påverkar olika humanpatogener som kan finnas i sår, samt i vilken honungskoncentration mjölksyrabakterierna är mest aktiva.

### **Frågeställning**

Hur påverkar honungssorten som en bärare, de 13 mjölksyrabakterierna, vid en *in vitro* studie, vanliga humanpatogener i sår.

## **MATERIAL OCH METOD**

Olika honungstyper tillsammans med mjölksyrabakterier ska testas mot humanpatogener på både fast och i flytande medium. Honungen kommer att lösas i både vatten och pollenmedium samt innehålla mjölksyrabakterier.

### **Etiska aspekter**

Ej relevant då försöket ej inkluderar människor eller djur.

### **Pollenmedium**

För att tillverka ca 150 ml pollenmedium blandas 40 g pollen med 226 ml kranvatten som sedan får stå under omrörning i 1,5 timme. Därefter justeras pH till 6.2. Lösningen autoklaveras i 120 °C i 15 minuter. Den klara vätskan (pollenmediet) separeras från pollenet.

## **Honung**

All honung utom Manukahonungen, som är nyzeeländsk, är svensk honung från södra Sverige.

### *Honungstyper*

Rapshonung (maj), hallonhonung (juni), lindhonung (juli), ljunghonung (augusti), bladhonung (september) och Manukahonung med Manukafaktor +10.

### *Föroreningar i mogen honung*

För att undersöka förekomsten av bakteriesporer eller jästsvamp i honungen späds alla honungssorterna med sterilt vatten i koncentrationerna 50 %, 25 %, 12,5 % och 6,3 %. Honungslösningarna inkuberas sedan i 35°C i fem dygn. De olika honungslösningarna odlas sedan ut på icke selektiva agarplattor som inkuberas både aerobt och anaerobt, plattorna kontrolleras sedan varje dag fem dagar framåt för att eventuell växt skall upptäckas. Om det förekommer växt i honungslösningarna måste honungen sterilfiltreras innan tillsats av mjölksyrabakterierna sker.

### *pH i utspädd honung*

Raps-, ljunghonung- och Manukahonung späds med både sterilt vatten och med pollenmedium till en koncentration på 6,3 %. Lösningarnas pH mäts sedan med en pH meter.

### *Hur honung påverkas av kokning*

I agarplattor av MH (Müller Hinton) (30.0% beef infusion, 1.75% casein hydrolysate, 0.15% stärkelse, 1.7% agar) stansas en brunn med diameterna 8,2 mm ut. På ytan av plattan stryks en bakteriesuspension med grumlighet 0,5 McF (McFarland) ut med hjälp av en steril bomullspinne ut. Bakterierna som används i detta försök är *E. coli* med ESBL och MRSA. I brunnarna tillsätts 160 µl av Manukahonung och rapshonung löst i sterilt vatten i koncentrationen 50 %, både okokt honung och honung som kokats i 30 minuter.

### *Spädningsserier av honungen*

Alla honungssorter späds i koncentrationerna 50 %, 25 %, 12,5 % och 6,3 %. Som lösningsmedium används sterilt vatten respektive pollenmedium. Till dessa spädningsserier tillsätts sedan bakterier. Även en negativ kontroll i form av en spädningsserie som inte inkluderar bakterier görs.

## **Bakterier**

I alla försök används alla 13 mjölksyrabakterierna tillsammans, däremot används alltid patogenerna var för sig och antalet kan variera från försök till försök.

### *Beräkning av antal levande bakterier VC (Viable Count)*

Detta är nödvändigt för att vid slutresultatet veta hur många bakterier som var levande.

### *Mjölksyrabakterierna*

Alla mjölksyrabakterierna är frysta isolat av 2:a generationen från den 20/1 2012. Mjölksyrabakterierna som används är *Bifidobacterium* Bin2, *Lactobacillus* Bin4, *Bifidobacterium* Bin7, *Lactobacillus* Biut2, *Lactobacillus* Bma5, *Bifidobacterium* Bma6, *Lactobacillus* Fhon2, *Lactobacillus* Fhon13, *Lactobacillus* Hma2,

*Bifidobacterium* Hma3, *Lactobacillus* Hma8, *Lactobacillus* Hma11 och *Lactobacillus* Hon2

### **Humanpatogener**

Patogenerna kommer från kliniska isolat, de patogener som används vid de olika försöken är MRSA som kommer från en svalgodling, *P. aeruginosa* och *E. coli* med ESBL som båda kommer från urinodlingar.

### **Odling av mjölksyrabakterierna**

Mjölksyrabakterierna odlas upp anaerobt på separata agarplattor (MRS + 0,1 % L-cystein + 2 % fruktos + 1.0 % agar) i 3 dagar i 35°C i luft.

### **Bakterielösning av mjölksyrabakterierna**

Denna lösning görs i samband med att den ska blandas med honungen. Bakterierna som har växt separat i pollenbuljong i två dygn blandas och centrifugeras, supernatanten avlägsnas och pelleten med bakterier löses upp i tre ml sterilt vatten.

### **De 13 mjölksyrabakteriernas antibakteriella effekter**

Detta testas genom att en filterdisk indränkt i en 6,3 % honungslösning, av både raps- och Manukahonung både med och utan de 13 mjölksyrabakterierna, placeras på en MRS-agarplatta. Därefter hålls en agarlösning innehållande MRSA respektive *E. coli*, över MRS-agarplattan. Plattorna inkuberas över natten och eventuella zoner mäts.

### **Mjölksyrabakteriernas förmåga att växa i olika honungslösningar**

För att undersöka om bakterierna har förmåga att växa i en honungslösning, eller om de även behöver pollen, görs två spädningsserier. En med honung och bakterier lösta i vatten och en med honung och bakterier lösta i pollenmedium. Spädningsserierna görs med honungskoncentrationerna 50 %, 25 %, 12,5 % och 6,3 %.

### **Patogenernas förmåga att växa i pollenhonungsbuljong**

För att ett inhiberingstest med buljong ska vara möjligt måste de tre patogenerna kunna föröka sig i buljongen som i detta fall är pollenmedium innehållande honung i koncentrationen 6,3 %. Honungssorterna som används är raps-, ljung- och Manukahonung.

En koloni av varje patogen tillsätts till 1 ml av varje pollenhonungsbuljong och inkuberas sedan över natten i 35°C. Eventuell växt i rören kontrolleras visuellt.

### **Inhiberingstester**

För att avgöra mjölksyrabakteriernas antibakteriella effekt, tillsammans med honungen, görs ett antal inhiberingstester.

### **På agarplattor med brunn**

Patogenerna, som växer i en MH-buljong, stryks ut med hjälp av en steril bomullspinne på hela ytan av en MH-platta. I mitten av plattan stansas en brunn med diametern 8,2 mm ut. I denna brunn tillsätts 160 µl av honungs- och bakterielösningen. Plattorna inkuberas i 35°C över natten. Allt görs i triplikat. Dagen efter mäts och antecknas diametern på eventuella zoner som har bildats runt brunnen.



### *På agarplattor med filterdisk*

MRSA respektive *E. coli* stryks i en grumlighet på 0,5 och 5 McF stryks med en steril bomullspinne ut på ytan av en MH-platta. På plattan placeras sedan en filterdisk indränkt i en honungslösning, med 6,3 % honung, av antingen raps- eller Manukahonung. Både honung med och utan mjölksyrabakterier testades. Plattorna inkuberas sedan över natten i 35°C.

### *På agarplattor med agarpuck*

Detta test utförs enligt samma princip som *Inhiberingstest på agarplattor med brunn*. Undantaget är att istället för att tillsätta honungslösningarna i flytande form framställs en agarplatta med 1 % agar utav honungslösningarna. Honungsplattorna gjuts både med och utan mjölksyrabakterierna. Ur dessa honungsplattor stansas sedan en agarpuck ut, som sedan placeras i brunnen i MH-plattan. Plattorna inkuberas sedan i 35°C i luft över natten. Eventuella zoner mäts med ett skjutmått.

För att testa om det blir bättre resultat om mjölksyrabakterierna får växa till sig innan de kommer i kontakt med patogenerna, inkuberas honungsplattorna med mjölksyrabakterier även över natten, för att dagen efter sättas till en MH-platta med patogener på ytan. Plattorna inkuberas sedan i 35°C i luft över natten. Eventuella zoner mäts med ett skjutmått.

### *I buljong*

Patogen blandas med fysiologisk 5 ml sterilt vatten tills en grumlighet på 1 McF uppnås, de patogener som används är *E. coli*, *S. aureus* och *P. aueruginosa*. Där efter görs en VC på lösningarna. De tretton mjölksyrabakterierna blandas samman i 5 ml sterilt vatten, vortexas noga och späds till 3 McF. 100 µl av varje bakterielösning tillsätts sedan i 1 ml av en pollenbuljong med en honungskoncentration på 6,3 %. De honungssorter som används är rapshonung, ljunghonung och Manukahonung.

Även ett test där inte mjölksyrabakterierna är närvarande, utan bara de produkter de har producerat, görs. Detta genom att tillsätta en loop av varje mjölksyrabakterie till 1 ml sterilt vatten som sedan vortexas tills alla bakterier löst sig. 100 µl av denna lösning överförs sedan till tre rör innehållande 10 ml pollenbuljong med en honungskoncentration på 6,3 % var. Även här är det rapshonung, ljunghonung och Manukahonung som används. Rören inkuberas i 35°C efter 48 timmar centrifugeras rören så att supernantanten, där alla produkter från mjölksyrabakterierna finns, kan avlägsnas och sparas. 1 ml av respektive supernantant överförs sedan till ett ependorfrör. Till supernantanten sätts sedan 50 µl av samma patogenlösningar som använts tidigare.

Som en kontroll görs även nio lösningar, de tre patogenerna lösta i de tre honungssorterna, innehållande 1 ml pollenbuljong med en honungskoncentration på 6,3 % och 100 µl av patogenbakterielösningen.

Alla lösningarna inkuberas i 35°C över natten. Dagen efter görs en VC på patogenerna. Alla prover utom kontrollerna görs i duplikat.

# RESULTAT

Honungen visade sig innehålla föroreningar i form av *Bacillus pumilus* och *Paenibacillus* mest växt förekom i lind- och Manukahonung. Men även i bladhonung förekom sparsam växt. Vid kontroll om honungens antibakteriella effekt påverkades av 30 minuters kokning gav de kokta honungen lika stora och tydliga zoner som den okokta honungen, detta oberoende på honungssort.

Honungen visade sig ha ett högre och jämnare pH när det var utspädd med pollenmedium jämfört med när det var spädd i vatten (se tabell 1).

Tabell 1. pH i utspädd honung .

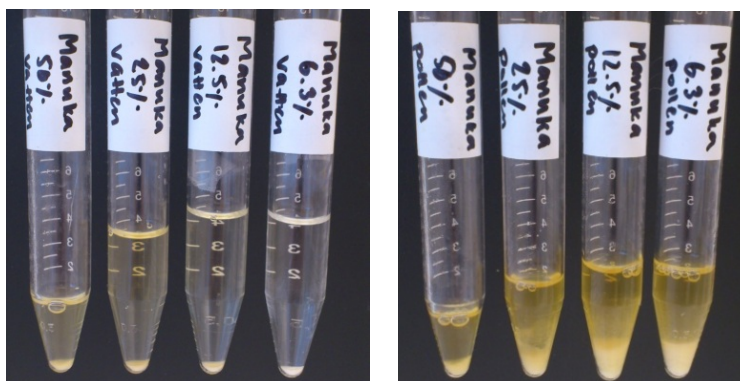
Honungssort	pH	
	Pollenmedium	Vatten
Raps	5,48	4,1
Ljung	5,48	4,61
Manuka	5,49	4,03

Inhiberingstestet som testade de 13 mjölksyrabakteriernas gemensamma antibakteriella effekt visade tydligt att de har en stark antibakteriell effekt på både *E. coli* och *S. aureus*. På alla plattor där filterlapparna innehöll bakterier bildades 2 cm i diameter stora klara zoner runt filterlappen, runt de filterlappar som inte innehöll bakterier växte patogenerna ända in till filterlappen.

## Bakterieväxt i honungslösningar

Redan efter ett dygn synes tydliga resultat, i lösningarna innehållande vatten hade bakterierna förökat sig så pass mycket att en pellet var synlig på botten av röret (se figur 1). Dock var alla pelletar lika stora oberoende på honungssort eller honungskoncentration.

I rören innehållande pollenmedium var tillväxten av bakterier avsevärt större, här fanns också en tydlig skillnad mellan honungskoncentrationerna, ju högre koncentration honung desto mindre pellet med bakterier (se figur 1). Efter ett dygn var det en liten variation mellan de olika honungstyperna i de lägsta koncentrationerna, både i storlek och utseende på pelletarna. Efter två dagar hade denna variation försvunnit och det gick inte längre att urskilja någon skillnad mellan de olika honungssorterna.



Figur 1. Bakterietillväxt, efter två dygn, av mjölksyrabakterier i Manukahonung i koncentrationerna 50 %, 25 %, 12,5 % och 6,3 % löst i sterilt vatten (till vänster) och i pollenmedium (till höger).

De tre patogenerna visade sig också kunna både överleva och föröka sig i en lösning bestående av pollenmedium med en honungskoncentration på 6,3 %. Det syntes ingen skillnad mellan de olika honungssorterna.

### Inhiberingstester

Vid inhiberingstestet med brunnar testades alla honungssorter i alla koncentrationer tillsammans med mjölksyrabakterierna mot *P. aeruginosa* och *E. coli*. På de plattor med *P. aeruginosa* bildades inga zoner alls och på plattorna med *E. coli* bildades stora otydliga och ofta dubbelzoner runt brunnarna. Vid mätning av dessa otydliga zoner fanns det en tendens till att ju högre honungskoncentration desto större zon. På plattorna med Manukahonungen i koncentrationen 50 % syntes en dryg mm klar kant runt brunnen.

När en filterdisk ersatte brunnen blev resultatet att inga zoner alls bildades oberoende på patogen eller honungssort.

Vid inhiberingstest med agarpuck på plattorna med *E. coli* bildades det få klara zoner, men av de som bildades var de största zonerna runt puckar som innehöll pollenmedium och hade en honungskoncentration på 6,3 % (se tabell 2).

Tabell 2. Zondiameter i mm på agarplattor strukna med *E. coli*.

Honungssort	Pollen/vatten	Honungskoncentration	LAB	Klar zon (mm)
Raps	pollen	50%	nej	12
Raps	pollen	50%	T0	-
Raps	pollen	50%	T24	12
Raps	pollen	6,30%	nej	-
Raps	pollen	6,30%	T0	-
Raps	pollen	6,30%	T24	18
Raps	vatten	50%	nej	-
Raps	vatten	50%	T0	-
Raps	vatten	50%	T24	11
Raps	vatten	6,30%	nej	-
Raps	vatten	6,30%	T0	-
Raps	vatten	6,30%	T24	-
Manuka	pollen	50%	nej	-
Manuka	pollen	50%	T0	-
Manuka	pollen	50%	T24	-
Manuka	pollen	6,30%	nej	-
Manuka	pollen	6,30%	T0	-
Manuka	pollen	6,30%	T24	17
Manuka	vatten	50%	nej	-
Manuka	vatten	50%	T0	-
Manuka	vatten	50%	T24	11
Manuka	vatten	6,30%	nej	-
Manuka	vatten	6,30%	T0	-
Manuka	vatten	6,30%	T24	-

T = tiden i timmar agarplattorna med mjölksyrabakterierna har fått växa till sig innan de placerades på plattorna bestrukna med patogener.

Samma test gjordes också med *S. aureus*, här bildades det fler klara zoner men samma mönster som för *E. coli*. Störst zoner blev det när bakterierna haft tillgång till pollen och haft möjlighet att växa till sig ett dygn. Även en låg honungskoncentration ökade storleken på zonerna (se tabell 3).

Tabell 3. Zondiameter i mm på agarplattor strukna med *S. aureus*.

Honungssort	Pollen/vatten	Honungskoncentration	LAB	Klar zon (mm)
Raps	pollen	50%	nej	12
Raps	pollen	50%	T0	16
Raps	pollen	50%	T24	16
Raps	pollen	6,30%	nej	-
Raps	pollen	6,30%	T0	17
Raps	pollen	6,30%	T24	25
Raps	vatten	50%	nej	12
Raps	vatten	50%	T0	13
Raps	vatten	50%	T24	-
Raps	vatten	6,30%	nej	-
Raps	vatten	6,30%	T0	13
Raps	vatten	6,30%	T24	-
Manuka	pollen	50%	nej	10
Manuka	pollen	50%	T0	17
Manuka	pollen	50%	T24	14
Manuka	pollen	6,30%	nej	-
Manuka	pollen	6,30%	T0	15
Manuka	pollen	6,30%	T24	24
Manuka	vatten	50%	nej	15
Manuka	vatten	50%	T0	16
Manuka	vatten	50%	T24	17
Manuka	vatten	6,30%	nej	-
Manuka	vatten	6,30%	T0	12
Manuka	vatten	6,30%	T24	-

T = tiden i timmar agarplattorna med mjölksyrabakterierna har fått växa till sig innan de placerades på plattorna bestрукna med patogener.

### I buljong

I buljongerna med supernatanten överlevde inga bakterier oberoende på honungssort eller bakterieart.

När patogenerna fick växa ostört utan kontakt med mjölksyrabakterier eller dess anitbakteriella produkter, visade det sig att Manukahonungen hämmade tillväxten av MRSA jämfört med de andra honungssorterna. Däremot var det Manukahonungen som inhiberade *E. coli* minst. Raps- och ljunghonungen skiljde sig inte avsevärt åt (se tabell 5).

I buljongerna där mjölksyrabakterierna fick växa tillsammans med patogenerna syntes tydliga resultat på att mjölksyrabakterierna antingen hämmade tillväxten eller dödade patogenerna. Känsligast var *S. aureus* som minskade i antal, jämfört med *E. coli* som hämmades (se tabell 6 och figur 2).

Tabell 4. Antal bakterier som sätts till respektive prov.

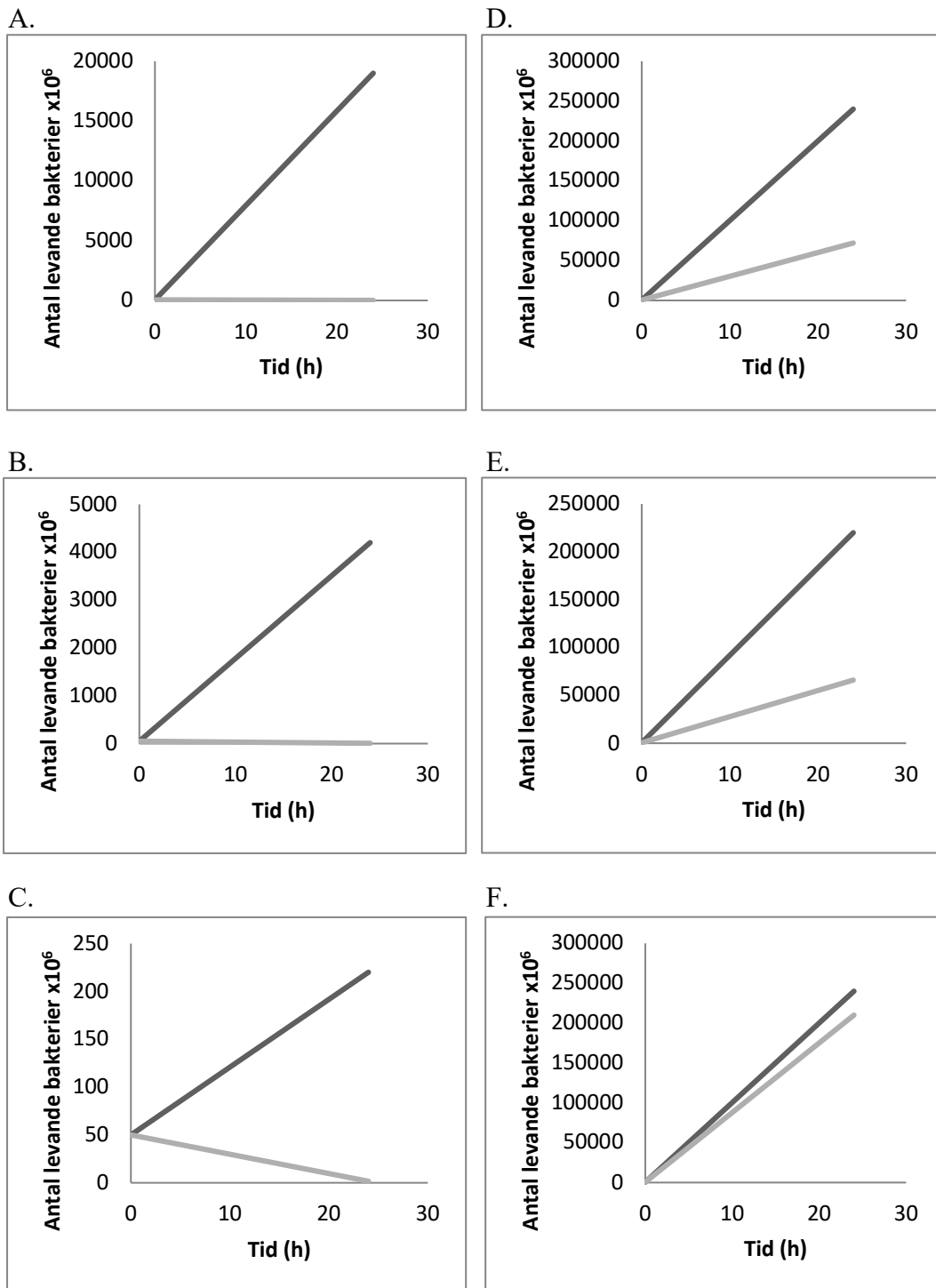
<b>Bakterie</b>	<b>Antal tillsatta bakterier</b>
Mjölksyrabakterier	$5 \times 10^9$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$5 \times 10^7$
<i>Eschericia coli</i>	$5 \times 10^8$

Tabell 5. Antal bakterier i respektive prov efter att de vuxit ostörda i pollenhonungbuljongen i 24 timmar.

<b>Patogen</b>	<b>Honungssort</b>	<b>Antal bakterier</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Raps	$1,9 \times 10^{10}$
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ljung	$4,2 \times 10^9$
<i>Staphylococcus aureus</i>	Manuka	$2,2 \times 10^8$
<i>Eschericia coli</i>	Raps	$2,4 \times 10^{11}$
<i>Eschericia coli</i>	Ljung	$2,2 \times 10^{11}$
<i>Eschericia coli</i>	Manuka	$2,4 \times 10^{11}$

Tabell 6. Antal bakterier i respektive prov efter att de vuxit i pollenhonungsbuljongen tillsammans med mjölksyrabakterier i 24 timmar.

<b>Patogen</b>	<b>Honungssort</b>	<b>Antal bakterier</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Raps	$6,4 \times 10^6$
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ljung	$5,4 \times 10^6$
<i>Staphylococcus aureus</i>	Manuka	$1,6 \times 10^6$
<i>Eschericia coli</i>	Raps	$7,2 \times 10^{10}$
<i>Eschericia coli</i>	Ljung	$6,6 \times 10^{10}$
<i>Eschericia coli</i>	Manuka	$2,1 \times 10^{11}$



Figur 2. Visar hur patogenerna växer i pollenhonungsbuljong ostört (mörkgrå linje) respektive tillsammans med mjölksyrabakterier (ljusgrå linje). Figur A-C visar *S. aureus*, där är startvärdet  $5 \times 10^7$ . Figur D-F visar *E. coli* och där är startvärdet  $5 \times 10^8$ . Figur A och D är rapshonung, figur B och E är ljunghonung och figur C och F är Manukahonung.

## DISKUSSION

Ursprungsplanen med inhiberingstest med brunn var att efterlikna ett tidigare försök som finns beskrivet i en tidigare publicerad artikel[P], dock med mindre korrigeringar. Bland annat hade de i detta försök inte tagit hänsyn till föroreningar som kan finnas i honungen och vara med att påverka resultatet. När jag testade att späda honungen och odlade ut den på agarplattor visade det sig mycket riktigt att det fanns växt av bakterier som funnits i honungen i sporform. Därför sterilfiltrerades alla honungslösningar innan de användes i försöken.

Det fanns även flera luckor i metodbeskrivningen i den nämnda artikeln, bland annat fanns inte agarhalten eller tjockleken på plattorna som användes angivna. Detta ledde till att när brunnarna var utstansade med samma diameter som i det tidigare försöket fyllde den angivna volymen med prov bara halva brunnen, därför dubblades provvolymen i varje brunn. Dagen efter när resultaten lästes av gick det snabbt att konstatera att bakterierna inte haft möjlighet att producera antibakteriella ämnen. Nästan alla brunnar var helt uttorkade. De otydliga och dubbelzoner som gick att utläsa var alla ett resultat av honungens antibakteriella effekt då de överensstämde med resultaten i den nämnda artikeln. Där de nämns som inhiberande zoner. Det som var målet var att få stora klara zoner, där patogenerna inte bara hämmades utan dog. Klar zon syntes endast på en av plattorna och det var plattan med Manukahonung med den högsta koncentrationen honung. Detta stämmer bra överens med publicerade arbeten där det visat att Manukahonung har en hög antibakteriell effekt[O].

På grund av det dåliga resultatet beslutades att inte fortsätta med resterande bakterier utan analysera vad som gått fel och åtgärda det. Troligtvis har mjölksyrabakterierna dött på grund av uttorkning när honungslösningen absorberats in i agarplattan. Då det tidigare inte har beskrivits några försök på agar plattor med brunn som inkluderar levande bakterier behövdes en helt ny metod. Lösningen blev att gjuta plattor av honungslösningen både med och utan mjölksyrabakterier. Detta genom att tillsätta 1 % agar i lösningarna. För att kunna göra detta behövde honungen kokas så att agarn löste upp sig. Därför gjordes ett test om det gick att koka honungen utan att det påverkade dess antibakteriella egenskaper. Det visade sig att den antibakteriella effekten inte minskade. Ur dessa plattor stansades sedan en puck med samma dimensioner som brunnen i agarplattan. Pucken placerades sedan i brunnen i hopp om att den skulle behålla fuktigheten bättre så att mjölksyrabakterierna skulle kunna överleva. Det gjordes även plattor där mjölksyrabakterierna fick ett försprång i form av att växa till sig ett dygn innan de kom i kontakt med patogenerna. För att minska ned antalet prover användes bara två sorters honung i detta försök. Manukahonung som idag är mycket använd i terapeutiska syften och dessutom en honungssort som inte tidigare visat resultat på att ha speciellt läkande egenskaper, nämligen raps.

Resultaten blev inte optimala men betydligt bättre än det tidigare försöket. På plattorna strukna med *E. coli* syntes bara ett fåtal klara zoner jämfört med plattorna med *S. aureus* där det syntes klara zoner runt nästan varje brunn. Gemensamt var att de största zonerna fanns runt brunnarna med pollen lösning och 6,3 % honung och där mjölksyrabakterierna fått ett försprång. Detta är ett klart bevis på att det är mjölksyrabakterierna som orsakat den klara zonen inte honungen. Vid ett tidigare försök hade det klart visat att mjölksyrabakterierna tillväxer bättre när de har tillgång till pollen än bara vatten och honung. Dessutom

att de trivs bättre om honungskoncentrationen är låg. Därför är det rimligt att anta att det är i dessa plattor som det fanns flest mjölksyrabakterier och ju fler mjölksyrabakterier ju fler antibakteriella produkter. Om det funnits mer tid är jag övertygad om att detta försök gått att utveckla så att resultaten blivit ännu bättre. Puckarna hade även här torkat, kanske skulle agarkoncentrationen justerats för ett bättre resultat.

Det som togs med från föregående försök, inför buljongtestet, var honungssorterna, dessutom lades ytterligare en honungssort till, ljunghonung. Ljunghonungen skiljer sig mycket från de övriga svenska honungssorterna både i färg och i konsistens, där den är mer lik Manukahonungen. Dessutom behölls samma bakterier. Inför buljongtesten användes bara de lösningar som visat bäst resultat hittills nämligen lösningar innehållande pollen och som har en honungskoncentration på 6,3 %.

Även i artikeln gjordes ett inhiberingstest i buljong, där olika honungstyper i olika koncentrationer blandades med patogener. Efter 24 timmar mättes proven med en spektrofotometer för att se om antalet bakterier ökat eller minskat. Det som inte tog hänsyn till var om patogenerna hade näring nog att överleva. Kanske var det näringsbrist som dödade patogenerna inte honungen. Därför var det första som gjordes inför inhiberingstestet i buljong var att kontrollera att patogenerna överhuvudtaget kunde växa i de olika lösningarna som skulle användas. Detta konstaterades endast visuellt då en mer exakt mätning av bakterietillväxten skulle göras i själva försöket. I mitt försök gick det inte att mäta resultaten spektrofotometriskt då mina prover innehåller både patogener och mjölksyrabakterier. Istället gjordes här en VC på selektiva plattor för att avgöra antalet patogener.

I försöket där supernatanten från mjölksyrabakterierna användes kunde inga patogener överleva, detta troligen på grund av att all näring redan förbrukats av mjölksyrabakterierna. Det hade varit intressant att i undersöka vad som skett om ny näring tillsats tillsammans med patogenerna.

Näringsbrist kan även ha varit ett problem i försöket med *E. coli* tillsammans med mjölksyrabakterierna. Med tanke på *E. colis* delningstid[R] borde det efter 24 timmar finnas  $1,4 \times 10^{23}$  men då det i mitt försök endast ökade till  $2,4 \times 10^{11}$  är det rimligt att anta att näringen har tagit slut. Då även mjölksyrabakterierna tillsattes mer än dubblades antalet bakterier som skulle konkurrera om näringen. Detta kan ha lett till att *E. coli* inte förökade sig lika mycket som i kontrollprovet. Och att det inte berodde på mjölksyrabakteriernas antibakteriella effekter. För att detta ska kunna avgöras med säkerhet krävs flera nya tester.

Det intressantaste resultatet är försöket där *S. aureus* blandades med mjölksyrabakterierna. Här syntes det tydligt en minskning av antalet patogener jämfört med antalet som tillsattes. Skillnader mellan honungssorterna kan bero på slumpen. För att få ett mer korrekt resultat kan det behövs göras fler tester där fler än två kopior av varje honungssort testas.

Sammanfattningsvis går det utefter dessa tester inte att urskilja några betydande skillnader mellan de olika honungssorterna i avseende på dess antibakteriella effekt tillsammans med mjölksyrabakterierna. Däremot går det att fastställa att mjölksyrabakterierna trivs och förökar sig betydligt bättre när de har tillgång till



pollen. Även att mjölksyrabakterietillväxten hämmas vid högre koncentrationer av honung. Om ett nytt honungsbandage innehållande mjölksyrabakterier ska utvecklas vore det bra för mjölksyrabakterierna om det innehöll pollen, dock visar testerna att även patogener trivs i pollenmedium. Detta kan innebära att patogenerna i såret ökar i antal om de kommer i kontakt med pollen. En lösning kan vara att bara använda de antibakteriella ämnen som mjölksyrabakterierna tillverkar.

## REFERENSER

- A. Majno G (1975) *Man and wound in an ancient world*. Cambridge, MA: Harvard university Press.
- B. Molan PC (1992) The antibacterial activity of honey. *Bee World*, 1992, 5-28.
- C. Olofsson TC, Vásques A (2008) Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Current microbiology*, 57, 356-363.
- D. Forsgren E, Olofsson TC, Vásquea A, Fries I (2010) Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larve. *Apidologie* 41, 99-108.
- E. Nathan C (2004) Antibiotics at the crossroads. *Nature*, 431, 899-902.
- F. Ousey K & McIntosh, C (2009) Topical antimicrobial agents for the treatment of chronic wounds. *British journal of community nursing*, 14(9), S6
- G. Anderson, D (2003) Wound dressings unravelled. *In Practice*, (25), 70-83.
- H. Cooper R A & Jenkins L (2009) A Comparison Between Medical Grade Honey and Table Honeys in Relation to Antimicrobial Efficacy. *Wounds*, 21(2), 29-36.
- I. Bang L, Bunting C, Molan P (2003) The effect of dilution on the rate of hydrogen peroxide production in honey and its implications for wound healing. *The journal of alternative and complementary medicine*. 9, 267-273.
- J. Enright M, Robinson A, Randle G (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 7687.
- K. Jacoby G, Han P (1995) Detection of Extended-Spectrum b-Lactamases in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* *Journal of clinical microbiology*, 34, 908-911.
- L. Jones E-J, Greenwood JE (2003) What's new in burn microbiology? James Laing Memorial Prize Essay *Burns* 29,15-24.
- M. De Vuyst L, Vendamme E J (1994) *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, Glasgow: Chapman & Hall.
- N. Carr FJ, Chill D, Maida N (2002) The lactid acid bacteria: a literature survey. *Crit. Riv. Microbiol.* 28, 281-370
- O. Mavric E, Wittermann S, Barth G, Henle T (2008) Identificaton and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Mol. Nutr.food res.* 52, 483-489

- P. Sherlock O, Dolan A (2010) Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC complementary and alternative medicine*. 10:47
- Q. Voidarou C, Alexopoulos A, Plessas S (2011) Antibacterial activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Anaerobe* 17, 375-379
- R. Ingley WJ, Poole RK (1984) The respiratory chain of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 48, 222-271