بررسی اثر ضد میکروبی چند نوع عسل ایرانی به تنهایی و در ترکیب با سیپروفلوکساسین بر روی سویه‌موتان *E. coli*

فریده قلم فرسا[۱]، راضیه پوراحمد[۱*] و بهزاد شارقی[۲]

[۱] ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، گروه ژنتیک

[۲] ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، گروه بیوشیمی

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۵

چکیده

مقاومت آنتی بیوتیکی به عنوان مشکل بالینی در حال رشد و یک تهدید کننده سلامت انسان می باشد. عسل یک محصول غذایی منحصر به فرد است که شامل ترکیبات زیست فعال مشتق شده از زنبورها و گیاهان می باشد. این ترکیبات زیست فعال می توانند با فعالیت ضد میکروبی در ارتباط باشند و توانایی نابودسازی یا مهار رشد برخی از میکروارگانیسم‌های پاتوژن را دارند. سیپروفلوکسازین یک آنتی بیوتیک از خانواده فلوروکینولونها است که علیه عفونتهای حاصل از *E. coli* استفاده می شود. هدف از این پژوهش بررسی فعالیت ضد میکروبی عسل به تنهایی و در ترکیب با سیپروفلوکسازین بر روی سویه موتان باکتری *E.coli* با افزایش بیان پمپ AcrAB-TolC بود. از روش تهیه رقت متوالی در محیط جامد برای تعیین حداقل غلظت مهاری(MIC) استفاده شد. MIC عسل برای سویه تیپ وحشی و موتان به ترتیب ۷۰ و ۸۰ درصد بود. عسل در غلظت زیر حد مهاری (۳۰ درصد) در ترکیب با سیپروفلوکسازین باعث کاهش ۶۰ و ۵۰ درصدی MIC سیپروفلوکسازین به ترتیب در سویه‌های تیپ وحشی و موتان شد. نتیجه اینکه هر چند عسل به تنهایی فعالیت ضد میکروبی دارد، ترکیب آن با سیپروفلوکسازین این فعالیت را افزایش می دهد.

واژه های کلیدی: عسل، سیپروفلوکساسین، باکتری *E.coli*، پمپ AcrAB-TolC

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۸۳۲۳۲۴۴۰۱، پست الکترونیکی: Razieh_Jaktaji@yahoo.com

مقدمه

مقاومت آنتی‌بیوتیکی به عنوان مشکل بالینی در حال رشد و یک تهدید کننده سلامت انسان می باشد (۲۳). باکتریهای مقاوم تهدید جدی برای سلامتی انسان محسوب می‌شوند، خصوصاً که این مقاومت یک مشکل عمده در بیمارستانها است (۸، ۱۴ و ۱۸). در نتیجه جامعه امروزه با خطر جدی افزایش مقاومتهای آنتی‌بیوتیکی در برابر پاتوژنهای مهم انسانی و کمبود داروهای ضد میکروبی جدید روبه‌رو شده است (۲۶).

یک نوع مکانیسم مقاومت به آنتی‌بیوتیکها پمپ انتشار به خارج است. چندین خانواده از این پمپهای مقاومت چند دارویی وجود دارند (۲۴). ژنهای پمپهای انتشار به خارج در تمام موجودات زنده وجود دارند. در اواخر دهه ۱۹۷۰ مشخص شد که سیستمهای خارج کننده مقاومت چندگانه در میکروبها نیز انتشار دارند. اکنون پنج خانواده از این پمپها در پروکاریوتها شناسایی شده‌اند که سبب ایجاد مقاومت به بسیاری از آنتی‌بیوتیکها می شوند(۱۲ و ۲۹). تعدادی از این پمپهای تخلیه، تنها انتقال یک سوبسترا را بر عهده دارند و باعث ایجاد مقاومت در برابر یک آنتی-بیوتیک ویژه می‌شوند. این در حالی است که گروهی دیگر از آنها باعث انتقال آنتی‌بیوتیکهای متفاوتی شده، لذا

فنوتیپهای مقاومت چند دارویی را ایجاد می‌کنند، که دفاع اساسی و مؤثر در برابر آنتی‌بیوتیکها به وسیله پمپهای مقاومت چند دارویی رخ می‌دهد (۹).

پمپهای خارج کننده دارو نه تنها باعث افزایش حداقل غلظت مهاری (MIC) آنتی بیوتیکها می گردند، بلکه با کاهش غلظت دارو در داخل سلول منجر به ایجاد سویه-های جهش یافته مقاوم به آنتی بیوتیکها در باکتریها می-شوند (۲۷).

یکی از انواع این پمپها ، پمپ AcrABTolC می باشد که در باکتریهای گرم منفی یافت می شود و یک پمپ مقاومت چند دارویی است که نمونه اولیه خانواده RND می باشد (۱۶). AcrABTolC طیف وسیعی از مواد مثل بیوسیدها، رنگها، و دترجنتها را می تواند به محیط خارج انتقال دهد و در بیماری زایی و مقاومت چند دارویی نقش دارد (۲۲ و ۲۸). این پمپ سبب مقاومت به کینولونها و مشتقات آن (که آنتی بیوتیکهای با طیف استفاده وسیع می باشند) می شود (۱۰).

پمپهای خارج کننده دارو در باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی وجود دارند، اما مقاومت به واسطه پمپهای خارج کننده آنتی‌بیوتیکی به لحاظ شناسایی سوبستراهای متنوع و بیان در پاتوژنهای مهم و اثر سینرژیستی آنها با سایر مکانیسمهای مقاومت، حائز اهمیت هستند. بنابراین، سیستمهای دفع دارویی اهمیت زیادی در ایجاد مقاومتهای دارویی داشته و لازم است که مانند سایر مکانیسمهای مقاومت آنتی بیوتیکی راهکارهایی برای مقابله با پمپهای خارج کننده دارو پیدا شود.

بسیاری از پژوهشگران تأکید دارند که عسل حاوی عوامل قوی ضدمیکروبی است (۴). خواص فیزیکی عسل، اثر ضد باکتریایی دارد و از زمانهای قدیم انسانها از خاصیت ضد میکروبی عسل سود جسته و آن را در درمان ناراحتیهای پوستی از قبیل زخمها و سوختگیها به کار برده-اند و یکی از بهترین پانسمانها محسوب می‌شود (۲۵).

عسل یک محصول غذایی منحصر به فرد است که شامل ترکیبات زیست فعال مشتق شده از زنبورها و گیاهان می باشد. این ترکیبات زیست فعال می توانند با فعالیت ضد میکروبی در ارتباط باشند که توانایی نابودسازی یا مهار رشد برخی از میکروارگانیسم های پاتوژن را دارند (۱۷). عامل ضد باکتریایی اصلی در عسل هیدروژن پراکسید است که از طریق فعالیت گلوکزاکسیداز تولید می شود (۱۹). گلوکزاکسیداز توسط غدد فوق حلقی زنبور عسل ترشح می شود که گلوکز را در عسل به گلوکونیک اسید و هیدروژن پراکسید تبدیل می کند (۶). عسل دارای پپتیدی به نام دیفنسین (Defensin) است که فعالیت ضد میکروبی دارد (۵). مطالعات زیادی نشان داده‌اند که فعالیت ضد باکتریایی عسل به طور قابل توجهی به منبع گیاهی آن وابسته است (۱۵). تفاوت موجود در فعالیت ضد باکتریایی عسلهای مختلف ممکن است به خاطر منابع گیاهی، تنوع زنبورها و منشاء جغرافیایی متفاوت آنها باشد (۱ و ۲۰).

Ahmed Hegazi و همکاران در سال ۲۰۱۴ به مطالعه اثر ضد باکتریایی سینرژیستی دو نوع عسل مصری (اکالیپتوس و کنجد) و آنتی بیوتیکهای رایج علیه سویه‌های مرجع کلستریدیوم از جمله کلستریدیوم استوبوتیلیکوم (DSM1731) و کلستریدیوم پرفرژنس(KF3831123) پرداختند. عسل اکالیپتوس و عسل کنجد وقتی به تنهایی استفاده شدند فعالیت ضد باکتریایی علیه DSM1731 و KF3831123 نشان دادند. در این مطالعه از آنتی بیوتیکهای سفوتاکسیم، سیپروفلوکساسین، توبرامایسین، سفالکسین و سولفامتوکسازول استفاده شد. نتایج نشان داد که عسل اکالیپتوس و کنجد می توانند برای توسعه عوامل ضد باکتریایی جدید و بالقوه استفاده شوند که هر کدام می توانند جداگانه یا به صورت ترکیب سینرژیستی استفاده شوند تا فعالیت ضد باکتریایی آنها را به طور مطمئن افزایش دهند و همچنین بر مشکل رو به رشد مقاومت آنتی بیوتیکی غلبه کنند (۱۱).

S Karayil و همکاران در سال ۱۹۹۸ اثر ضد باکتریایی عسل را به صورت سینرژیستی با ۳ آنتی بیوتیک جنتامایسین، آمیکاسین و سفتازیدیم بر روی ۱۵ سویه باکتریایی (۷ سودوموناس آئروژینوزا و ۸ سویه های کلبسیلا) بررسی کردند. این سویه‌های باکتری نسبت به این آنتی بیوتیکها مقاومت نشان دادند بنابراین اثر سینرزیستی عسل با آنها بررسی شد. در این مطالعه مشخص شد که این ترکیب سینرژیستی بر روی سویه‌های سودوموناس اثر دارد ولی بر روی سویه‌های کلبسیلا تأثیری ندارد (۱۳).

اگرچه آنتی بیوتیکهای فراوانی در حال حاضر وجود دارند، با این حال مقاومت به آنتی بیوتیکها در سراسر جهان در حال افزایش است و تعداد خیلی کمی از آنتی بیوتیکها در حال توسعه هستند. فعالیت بالقوه عسل علیه باکتریهای مقاوم و طبیعی و بی ضرر بودن آن منجر به استفاده از آن در درمان شده است.

اثر سینرژیستی آنتی بیوتیکها با عسل در برابر باکتریهای مقاوم و جهش یافته، منجر به انتخاب درمان جدید بیماریهای عفونی، با این رویکرد که عمل آنتی بیوتیکهای موجود که باکتریها نسبت به آنها مقاومت پیدا کرده‌اند و همچنین باکتریهای جهش یافته و با القای افزایش بیان پمپ تخلیه، به کمک عسل بهبود یابند می باشد.

با توجه به گزارشات فراوان در زمینه اثر سینرژیستی آنتی بیوتیکها با عسل و عدم وجود گزارش چاپ شده در زمینه اثر سینرژیستی عسل و سیپروفلوکسازین، هدف از این تحقیق بررسی اثر سینرژیستی عسل و سیپروفلوکسازین بر روی مهار سویه *E. coli* با افزایش بیان پمپ AcrAB-TolC بود.

مواد و روشها

عسلهای آویشن، گون و کنار از استان چهارمحال و بختیاری تهیه گردیدند. نمونه‌ها پس از جمع آوری، در ویالهای شیشه‌ای در دمای ۴ درجه سانتی گراد دور از نور نگهداری شدند. آنتی بیوتیک استفاده شده در این پژوهش، سیپروفلوکساسین(CIP) با غلظت۱۰ mg/ml بود، که به شکل پودر از شرکت سیگمای آمریکا خریداری شد. در این پژوهش از تیپ وحشی(MG1655) و یک موتان(PM1) مربوط به باکتری *E. coli* که دارای افزایش بیان پمپ بود استفاده شد (۲و۳). MIC سیپروفلوکساسین برای این دو سویه از مطالعات پیشین به دست آمد (۲و۳)، که در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- نتایج MIC سیپروفلوکساسین

سویه / موتان	MIC سیپروفلوکساسین (μg/ml)
MG1655	۰/۰۳۵
PM1	۱۲۰

تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) عسل: از هر کدام از باکتریها (MG1655 و PM1) از استوک اصلی بر روی محیط کشت LB آگار به صورت خطی کشت داده شد و پلیتها به مدت ۱۶ الی ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد درون انکوباتور ثابت قرار گرفتند. یک کلونی از این باکتریهای کشت داده شده درون لوله آزمایش محتوی محیط کشت LB مایع تلقیح شد. سپس لوله‌های آزمایش به مدت ۱۶ الی ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد درون انکوباتور شیکر در دور ۱۸۰ rpm قرار گرفتند. از محتوی این لوله‌ها به درون لوله‌های جدید تلقیح شدند و دورن انکوباتور شیکر با شرایط ذکر شده در بالا قرار گرفتند تا به فاز لگاریتمی(OD=۰/۴-۰/۶) برسند، سپس میزان جذب(OD) آن‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Visible (مدل 2100 کمپانی یونیکوUNICO) در طول موج ۶۰۰nm اندازه گیری شد. غلظت‌های مختلف سه نوع عسل(آویشن، گون و کنار)۱، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درصد تهیه شدند و به ارلنهای حاوی محیط کشت اضافه شدند و سپس این محیطهای حاوی عسل در پلیتهای مورد نظر توزیع گردیدند از کشتهای باکتری که به فاز لگاریتمی رسیده بود سری

رقتهای متوالی تهیه گردید و به محیطهای کشت جامد حاوی غلظتهای مختلف عسل به صورت spot(لکه)، منتقل شدند. پلیتهای کشت داده شده درون انکوباتور ثابت به مدت ۱۶ الی ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند، و در نهایت از پلیتهای حاوی غلظتهایی از عسل که در رقتهای متوالی و کشت اصلی باکتری فاقد کلنی و یا تعداد محدود کلنی بود برای تعیین میزان MIC استفاده شد. این آزمایش برای هر نمونه عسل دو بار انجام شد.

بررسی بقای باکتریها به روش تهیه رقت در محیط جامد(Agar dilution method) در ترکیب عسل سیپروفلوکساسین: برای بررسی بقای باکتریها در ترکیب عسل سیپروفلوکساسین، هر کدام از باکتریها (MG1655 و PM1)، مطابق روش ذکر شده در قسمت قبل کشت داده شدند و سپس میزان جذب(OD) آنها با روش ذکر شده در قسمت قبل اندازه گیری شد. سری رقتهای متوالی از کشت باکتریها بعد از رسیدن به فاز لگاریتمی تهیه گردید. برای بررسی بقای باکتریها در ترکیب عسل و سیپروفلوکساسین، غلظت ۴۰-۳۰ درصد هر سه نوع عسل و سیپروفلوکسازین برای MG1655، محدوده غلظتهای ng/ml ۴۰-۰ و برای PM1، محدوده غلظتهای µg/ml ۱۳۰- ۰ تهیه شدند. بر روی تمام پلیتها، رقتهای متوالی (از رقت صفر تا ۶) از کشت باکتری به صورت spot (لکه)، منتقل شدند. سپس پلیتها در انکوباتور ثابت به مدت ۱۶ الی ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمادهی شدند، و در نهایت رشد آنها بررسی شد و تعداد کلنیهای قابل شمارش رقتهای مختلف شمارش گردید(۲۱). هر آزمایش دو بار تکرار شد.

آنالیز آماری: از آنجائی که هر آزمایش مربوط به شمارش کلنی ها دو بار انجام شد ، میانگین نتایج و انحراف معیار آنها با استفاده از اکسل محاسبه گردید. برای مقایسه نتایج مربوط به عسلهای مختلف از آزمون تی اکسل استفاده شد.

نتایج

MIC عسل و ترکیب عسل و سیپروفلوکساسین: نتیجه MIC عسل و ترکیب عسل و سیپروفلوکساسین در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول۲- MIC عسل

سویه / موتان	MIC	
	عسل(٪)	ترکیب عسل٪- سیپروفلوکساسین (µg/ml)
MG1655	۷۰	------
PM1	۸۰	۵۰ -۳۰

بررسی بقای باکتریها به روش تهیه رقت در محیط جامد(Agar dilution method) در ترکیب عسل و سیپروفلوکساسین: میزان بقای باکتریها (Log CFU/ml) بر روی محیطهای کشت جامد حاوی ترکیب عسل و سیپروفلوکساسین در جدول های ۳ و ۴ ارائه شده است. همان طوری که از جداول مشاهده می شود ترکیب عسل با سیپروفلوکسازین باعث کاهش MIC سیپروفلوکسازین در سویه تیپ وحشی و موتان شد. در سویه موتان در حضور ۳۰ درصد عسل (هر سه نوع) MIC سیپروفلوکسازین از µg/ml ۱۲۰ به کمتر از µg/ml ۶۰ کاهش یافت. اختلاف معنی داری بین فعالیت عسلها در سویه موتان در غلظتهای مختلف سیپروفلوکسازین دیده نشد (p> ۰/۰۵). اگرچه اختلاف معنی داری بین فعالیت عسل آویشن و کنار با گون در سویه تیپ وحشی در غلظت ng/ml ۲۰ سیپروفلوکسازین مشاهده شد (p< ۰/۰۵). سویه تیپ وحشی در حضور ۳۰ درصد عسل گون MIC سیپروفلوکسازین از ng/ml ۳۵ به کمتر از ng/ml ۲۰ کاهش یافت.

بحث

در قرن بیستم با توسعه تعداد زیادی استراتژی موفقیت آمیز در جهت پیشگیری و کنترل بیماریهای عفونی، این ذهنیت ترویج شد که مبارزه علیه بیماریهای عفونی به پایان رسیده است. اما این خوشبینی کوتاه مدت بود چرا که عفونتهای جدید و مقاوم به دارو شیوع پیدا کرده و همه گیر

شدند(۲۳).

جدول۳- میزان بقای باکتریها(Log CFU/ml) در ترکیب عسل و سیپروفلوکساسین.

سویه	Log CFU/ml			
	سیپروفلوکساسین(ng/ml)	H1(۳۰٪)	H2(۳۰٪)	H3(۳۰٪)
MG1655	۵	۴/۲	۴	۴/۲
	۲۰	۲	۰	۰

H1: مخفف عسل آویشن،H2 : مخفف عسل گون، H3: مخفف عسل کنار. اعداد ارائه شده میانگین دو تکرار آزمایش است و میزان انحراف معیار از ۵ درصد کمتر بود.

جدول۴- میزان بقای باکتریها(Log CFU/ml) در ترکیب عسل و سیپروفلوکساسین.

موتان	Log CFU/ml			
	سیپروفلوکساسین(µg/ml)	H1(۳۰٪)	H2(۳۰٪)	H3(۳۰٪)
PM1	۲۰	۴/۴۵	۳/۳	۴/۲
	۶۰	۰	۰	۰

H1: مخفف عسل آویشن،H2 : مخفف عسل گون، H3: مخفف عسل کنار. اعداد ارائه شده میانگین دو تکرار آزمایش است و میزان انحراف معیار از ۵ درصد کمتر بود.

با توجه به نقش برجسته‌ای که پمپ انتشار به خارج AcrAB-TolC در ایجاد MDR در باکتری *E.coli* دارد(۲۶)، بنابراین راهبردهای ضد میکروبی دیگری مورد نیاز هستند، لذا در این تحقیق به بررسی اثر بازدارندگی عسل به عنوان یک عامل ضد میکروبی بر مهار پمپ AcrAB_TolC(که سبب مقاومت دارویی می شود) به تنهایی و به صورت ترکیب با سیپروفلوکساسین بر روی سویه *E.coli* با افزایش بیان پمپ AcrAB_TolC پرداخته شد.

در این پژوهش بر روی یک موتان مضاعف PM1 (*gyrA, marA*) دارای پمپ بیش بیان شده AcrAB-TolC (۲ و ۳) و مقاومت بالا نسبت به سیپروفلوکساسین (MIC=۱۲۰µg/ml) و تیپ وحشی سویه MG1655 مطالعاتی انجام شد و نتایج نشان داد که:

۱) عسل به تنهایی دارای اثر ضد میکروبی کمی می باشد. MIC عسل در موتان مقاوم (۸۰ درصد) و در تیپ وحشی(۷۰ درصد) بود.

۲) عسل در غلظت زیر حد مهاری ۳۰ درصد به صورت ترکیب با سیپروفلوکساسین موجب کاهش مقاومت به سیپروفلوکساسین در سویه تیپ وحشی و موتان مقاوم شد که احتمال اثر سینرژیستی میان عسل و سیپروفلوکساسین را پیشنهاد می کند.

در سال ۲۰۰۶، Katrina Brudzynski اثر هیدروژن پراکسید بر فعالیتهای ضد باکتریایی عسلهای کانادایی را بررسی نمود. در این مطالعه با ارزیابی تهیه رقت در محیط جامد فعالیت ضد باکتریایی ۴۲ عسل کانادایی علیه دو سویه باکتری *E. coli* (ATCC14948) و باسیلوس سابتیلیس(ATCC6633) بررسی شد. اثر هیدروژن پراکسید بر فعالیت ضد باکتری با اندازه گیری میزان هیدروژن پراکسید قبل و بعد از حذف آن توسط کاتالاز و همچنین توسط ارتباط آن با میزان فعالیت ضد باکتریایی مشخص شد(۷). بنابراین با بررسی میزان هیدروژن پراکسید در عسلهای مصرف شده در این تحقیق می توان اطلاعات بیشتری از اهمیت اثر بازدارندگی این ماده به دست آورد.

علی رغم تحقیقات گسترده‌ای که در زمینه فعالیت ضد باکتریایی عسل به تنهایی و به صورت ترکیبی با مواد دیگر صورت گرفته است، ولی تاکنون مطالعه‌ای در مورد فعالیت عسل به تنهایی و به صورت ترکیب با سیپروفلوکساسین بر روی سویه *E. coli* با افزایش بیان پمپ AcrAB-TolC صورت نگرفته است و تحقیق فعلی اولین تحقیق در این راستا می باشد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه محمدی و پوراحمد سیپروفلوکساسین در سویه‌های مقاومت چند دارویی باکتری *E. coli*، همانند یک مهار کننده پمپ عمل می کند (۲-۳). با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیق فعلی، عسل به صورت ترکیبی با سیپروفلوکساسین در سویه‌های مقاومت چند دارویی باکتری *E. coli*، اثر بازدارندگی خوبی را داراست. بنابراین جداسازی دقیق تر ترکیبات عسل راهی به سوی ساخت داروهای ترکیبی جدید باز می کند.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه شهرکرد به خاطر حمایت مالی این تحقیق تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

۱- زهری ص، اصغری ع، دادخواه م (۱۳۹۲) تنوع جمعیتهای زنبور عسل براساس نشانگرهای موفولوژیکی و ریز ماهواره (microsatellite) در استان اردبیل، مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران) ۲۶: ۴۷۱-۴۶۲.

۲- محمدی پ، پوراحمد ر (۱۳۹۵) اثر عصاره گیاه *تلخ‌بیان* بر مهار پمپ AcrAB–TolC در باکتری *E. coli* ، *دو ماهنامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران*، ۳۲: ۷۸۴-,۷۹۴

۳- محمدی پ، پوراحمد ر، شارقی ب، فرهادیان ص (۱۳۹۶) اثر عصاره آلکالوئیدی گیاه تلخ بیان بر میزان MIC و تجمع داخل سلولی سیپروفلوکسازین در موتانت مقاوم به سیپروفلوکسازین اشریشیا کلی، مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران) پذیرفته شده و در نوبت چاپ.

4- Aghayiee MA, Mirnezami Ziyabari H (1384) Honey Health, publishing Yyzh.

5- Alaux C, Ducloz F, Crauser D, Leconte Y(2010) Diet effects on honey bee immunocompetence**.** Biol.Lett, 6:562-565.

6- Alnaimat S, Wainwright M, Albrid K (2012) Antibacterial potential of honey from different origins:A comparison with Manuka honey**.** J Microbial Biotechnol Food Sci, 1:1328-1338.

7- Brudzynski K, (2006) Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. Canadian Journal of Microbiology, 52(12): 1228-1237.

8- Carattoli A (2008) Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. Clin Microbiol Infect 14(Suppl 1): 117–123.

9- De Villiers BJ1 VVS, Van Zyl RL, Van Wyk BE (2010) Antimicrobial and antimalarial activity of *Cussonia* species (Araliaceae). Journal of Ethnopharmacology, 129**:**189-196.

10- Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea MH, Itoh T, and Tomizawa JI (1977) Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity**.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:4772–4776.

11- Hegazi A, Sherein I, El-Moez A, Abdou AM and Abd Allah F, (2014). Synergistic Antibacterial Activity of Egyptian Honey and Common Antibiotics against Clostridium Reference Strains. Int J Curr Microbiol App Sci 3(8) 312-325.

12- Hirakawa H, Takumi- Kobayashi A, Theisen U, Hirata T, Nishino K, Yamaguchi A (2008) AcrS/EnvR represses expression of the *acrAB* multidrug efflux genes in *Escherichia coli.* Journal of Bacteriology, 190: 6276- 6279.

13- Karayil S, Deshpande SD, Koppikar GV (1998) Effect of honey on multidrug resistant organisms and its synergistic action with three common antibiotics. Journal of Postgraduate Medicine 44 (4): 93-6.

14- Khanna T, Friendship R, Dewey C, Weese JS (2008) Methicillin resistant Staphylococcus aureus colonization in pigs and pig farmers. Vet Microbiol 128: 298–303.

15- Klauding J, Albert S, Bachanova K, Simuth J (2005). Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee Apis mellifera. Insect Biochem Mol.Biol.35:11-22.

16- Koronakis V, Eswaran J, Hughes C (2004) Structure and function of TolC**:** The bacterialexitductforproteinsanddrugs**.** Annu Rev Biochem, 73:467–89.

17- Kwakman PHS, Van den Akker JPC, Guclu A, Aslami H, Binnekade JM, et al. (2008) Medical-grade honey kills antibiotic-resistant bacteria in vitro and eradicates skin colonization. Clin Infect Dis 46: 1677–1682**.**

18- McEwen SA, Fedorka-Cray PJ (2002) Antimicrobial use and resistance in animals. Clin Infect Dis 34(Suppl 3): S93–S106.

19- Molan PC, Cooper RA (2000). Honey and sugar as dressing for wounds and ulcers**.** Trop. Doctor 30:249-251.

20- Montenegro G, Salas F, Pena RC, Pizarro R (2009) Actividad antibacteriana y antifungica de mieles monoflorales de Quillaja saponaria especie endemic de chile. Int J Exp Bot 78:141-146.

21- National Committee for clinical Laboratory Standards (2002) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eighth informational supplement M100S12. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Vilanova, Pa.

22- Nikaido H, Takatsuka Y (2009) Mechanisms of RND multidrug efflux pumps**.** Biochim Biophys Acta, 1794: 769–81.

23- Phillips O (2004) Antibacterial agents: patent highlights January to June**.** Current Opinion in Investigational Drugs, **5:**799-808.

24- Piddock LJ (2006) Multidrug-resistance efflux pumps—not just for resistance. Nat Rev Microbiol, 4: 629–36.

25- Saadatmand SJ (1377) The therapeutic properties of honey, publication of Agricultural Sciences.

26- Szmolka A, Nagy B (2013) Multidrug resistant commensal Escherichia coli in animals and its impact for public health. Frontiers in Microbiology, 4: 1-13.

27- Vila J, Marti S, Sanchez-Cespedes J (2007) Porins, efflux pumps and multidrug resistance in Acinetobacter baumannii. J Antimicrob Chemother, 59**:**1210-1215.

28- Webber MA, Bailey AM, Blair JM (2009) The global consequence of disruption the AcrAB-TolC efflux pump in *Salmonella enterica* includes reduced of expression of SPI-1 and other attributes required to infect the host. J Bacteriol , 191: 4276–85.

29- Yasufuku T, Shigemura K, Shirakawa T, Matsumoto M, Nakano Y, Tanaka K, Arakawa S, Kinoshita S, Kawabata M, Fujisawa M (2011) Correlation of over expression of efflux pump genes with antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains clinically isolated from urinary tract infection patients. Journal of Clinical Microbiology, 49: 189- 194.

Antimicrobial effect of several Iranian honeys alone and in combination with ciprofloxacin on an *E. coli* mutant strain

Ghalamfarsa F.[1], Pourahmad R.[1] and Shareghi B.[2]

[1] Dept. of Genetics, Faculty of Science, University of Shahrekord, Shahrekord, I.R. of Iran

[2] Dept. of Biochemistry, Faculty of Science, University of Shahrekord, Shahrekord, I.R. of Iran

Abstract

Antibiotic resistance is a growing problem and human health treat. Honey is a unique food product containing bioactive compounds derived from bees and plants. These bioactive compounds are related to antimicrobial activity and enable to destroy or inhibit growth of some pathogenic microorganisms. Ciprofloxacin is a member of fluroquinolones that used against infections caused by *E. coli*. The aim of this research was to study the antimicrobial activity of honey alone and in combination with ciprofloxacin on *E. coli* mutant strain with increased AcrAB-TolC pump expression. Agar dilution method was used to measure minimum inhibitory concentration (MIC). MIC of honey was 70% and 80% in wild type and mutant strain, respectively. Honey in concentration lower than MIC in combination with ciprofloxacin caused 60% and 50% decrease in MIC of ciprofloxacin in wild type and mutant strain, respectively. In conclusion, although honey possesses antimicrobial activity alone, its combination with ciprofloxacin increases this activity.

Key words: Honey, Ciprofloxacin, *E.coli*, AcrAB-TolC pump