

بررسی اثر ضد میکروبی چند نوع عسل ایرانی به تنهایی و در ترکیب با سیپروفلوکسازین

بر روی سویه موتان *E. coli*



فریده قلم فرسا^۱، راضیه پوراحمد^{۱*} و بهزاد شارق^۲

^۱ ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، گروه ژنتیک

^۲ ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، گروه بیوشیمی

تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۱۸

چکیده

مقاومت آنتی‌بیوتیکی به عنوان مشکل بالینی در حال رشد و یک تهدید کننده سلامت انسان می‌باشد. عسل یک محصول غذایی منحصر به فرد است که شامل ترکیبات زیست فعال مشتق شده از زنبورها و گیاهان می‌باشد. این ترکیبات زیست فعال می‌توانند با فعالیت ضد میکروبی در ارتباط باشند و توانایی نابودسازی یا مهار رشد برخی از میکروارگانیسم‌های پاتوژن را دارند. سیپروفلوکسازین یک آنتی‌بیوتیک از خانواده فلوروکینولونها است که علیه عفونتهای حاصل از *E. coli* استفاده می‌شود. 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 مهار (MIC) استفاده شد. MIC عسل برای سویه تیپ وحشی و موتان به ترتیب ۷۰ و ۸۰ درصد بود. عسل در غلظت زیر حد مهار (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 می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: عسل، سیپروفلوکسازین، باکتری *E. coli*، پمپ AcrAB-TolC

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۸۳۲۲۲۴۴۰۱، پست الکترونیکی: Razieh_Jaktaji@yahoo.com

مقدمه

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 می‌شوند (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

مقاومت آنتی‌بیوتیکی به عنوان مشکل بالینی در حال رشد و یک تهدید کننده سلامت انسان می‌باشد (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

عسل یک محصول غذایی منحصر به فرد است که شامل ترکیبات زیست‌فعال مشتق شده از زنبورها و گیاهان می‌باشد. این ترکیبات زیست‌فعال می‌توانند با فعالیت ضد میکروبی در ارتباط باشند که توانایی نابودسازی یا مهار رشد برخی از میکروارگانیسم‌های پاتوژن را دارند (۱۷). عامل ضد باکتریایی اصلی در عسل هیدروژن پراکسید است که از طریق فعالیت گلوکزاکسیداز تولید می‌شود (۱۹). گلوکزاکسیداز توسط غدد فوق حلقی زنبور عسل ترشح می‌شود که گلوکز را در عسل به گلوکونیک اسید و هیدروژن پراکسید تبدیل می‌کند (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 سینرژستی دو نوع عسل مصری (اکالپتوس و کنجد) و آنتی‌بیوتیک‌های رایج علیه سویه‌های مرجع کلستریدیوم از جمله کلستریدیوم استوبوتیلیکوم (DSM1731) و کلستریدیوم پرفرژنس (KF3831123) پرداختند. عسل اکالپتوس و عسل کنجد وقتی به تنهایی استفاده شدند فعالیت ضد باکتریایی علیه DSM1731 و KF3831123 نشان دادند. در این مطالعه از آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم، سیپروفلوکساسین، توبرامایسین، سفالکسین و سولفامتوکسازول استفاده شد. نتایج نشان داد که عسل اکالپتوس و کنجد می‌توانند برای توسعه عوامل ضد باکتریایی جدید و بالقوه استفاده شوند که هر کدام می‌توانند جداگانه یا به صورت ترکیب سینرژستی استفاده شوند تا فعالیت ضد باکتریایی آنها را به طور مطمئن افزایش دهند و همچنین بر مشکل رو به رشد مقاومت آنتی‌بیوتیکی غلبه کنند (۱۱).

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

پمپ‌های خارج‌کننده دارو نه تنها باعث افزایش حداقل غلظت مهار (MIC) آنتی‌بیوتیک‌ها می‌گردند، بلکه با کاهش غلظت دارو در داخل سلول منجر به ایجاد سویه‌های جهش‌یافته مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌ها می‌شوند (۲۷).

یکی از انواع این پمپ‌ها، پمپ AcrABToIC می‌باشد که در باکتری‌های گرم منفی یافت می‌شود و یک پمپ مقاومت چند دارویی است که نمونه اولیه خانواده RND می‌باشد (۱۶). AcrABToIC طیف وسیعی از مواد مثل بیوسیدها، رنگها، و دترجنت‌ها را می‌تواند به محیط خارج انتقال دهد و در بیماری‌های زایی و مقاومت چند دارویی نقش دارد (۲۲ و ۲۸). این پمپ سبب مقاومت به کینولونها و مشتقات آن (که آنتی‌بیوتیک‌های با طیف استفاده وسیع می‌باشند) می‌شود (۱۰).

پمپ‌های خارج‌کننده دارو در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی وجود دارند، اما مقاومت به واسطه پمپ‌های خارج‌کننده آنتی‌بیوتیکی به لحاظ شناسایی سوبستراهای متنوع و بیان در پاتوژن‌های مهم و اثر سینرژستی 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 آنتی‌بیوتیکی راهکارهایی برای مقابله با پمپ‌های خارج‌کننده دارو پیدا شود.

بسیاری از پژوهشگران تأکید دارند که عسل حاوی عوامل قوی ضد میکروبی 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 برده‌اند و یکی از بهترین پانسمانها محسوب می‌شود (۲۵).

نگهداری شدند. آنتی بیوتیک استفاده شده در این پژوهش، سیپروفلوکساسین (CIP) با غلظت ۱۰ 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 (۳ و ۲). MIC سیپروفلوکساسین برای این دو سویه از مطالعات پیشین به دست آمد (۳ و ۲)، که در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- نتایج MIC سیپروفلوکساسین

MIC	
سویه / موتان	سیپروفلوکساسین ($\mu\text{g/ml}$)
MG1655	۰/۰۳۵
PM1	۱۲۰

تعیین حداقل غلظت مهار (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 rpm ۱۸۰ قرار گرفتند. از محتوی این لوله‌ها به درون لوله‌های جدید تلقیح شدند و درون 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 یونیکو UNICO) 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

S Karayil و همکاران در سال ۱۹۹۸ اثر ضد باکتریایی عسل را به صورت سینرژستی با ۳ آنتی بیوتیک جتتامایسین، آمیکاسین و سفنازیدیم 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 سینرژستی عسل با آنها بررسی شد. در این مطالعه مشخص شد که این ترکیب سینرژستی 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 سینرژستی 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 سینرژستی آنتی بیوتیکها با عسل و عدم وجود گزارش چاپ شده در زمینه اثر سینرژستی عسل و سیپروفلوکساسین، هدف از این تحقیق بررسی اثر سینرژستی عسل و سیپروفلوکساسین 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

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

جدول ۲- MIC عسل

MIC	ترکیب عسل-% سیپروفلوکسازین ($\mu\text{g/ml}$)	عسل (%)	سویه / موتان
-----		۷۰	MG1655
۵۰-۳۰		۸۰	PM1

بررسی بقای باکتریها به روش تهیه رقت در محیط جامد (Agar dilution method) در ترکیب عسل و سیپروفلوکسازین: میزان بقای باکتریها (Log CFU/ml) بر روی محیطهای کشت جامد حاوی ترکیب عسل و سیپروفلوکسازین 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 $120 \mu\text{g/ml}$ به کمتر از $60 \mu\text{g/ml}$ کاهش یافت. اختلاف معنی داری بین فعالیت عسلها در سویه موتان در غلظتهای مختلف سیپروفلوکسازین دیده نشد ($p > 0.05$). اگرچه اختلاف معنی داری بین فعالیت عسل آویشن و کنار با گون در سویه تیپ وحشی در غلظت 20 ng/ml سیپروفلوکسازین مشاهده شد ($p < 0.05$). سویه تیپ وحشی در حضور ۳۰ درصد عسل گون MIC سیپروفلوکسازین از 25 ng/ml به کمتر از 20 ng/ml 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

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 37°C 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 سیپروفلوکسازین: برای بررسی بقای باکتریها در ترکیب عسل سیپروفلوکسازین، 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 سیپروفلوکسازین، غلظت ۳۰-۴۰ درصد هر سه نوع عسل و سیپروفلوکسازین برای MG1655، محدوده غلظتهای $0-40 \text{ ng/ml}$ و برای PM1، محدوده غلظتهای $0-130 \mu\text{g/ml}$ 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 37°C 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

شدند (۲۳).

جدول ۳- میزان بقای باکتریها (Log CFU/ml) در ترکیب عسل و سیپروفلوکسازین.

Log CFU/ml				سویه
(%)H3	(%)H2	(%)H1	سیپروفلوکسازین (ng/ml)	
۴/۲	۴	۴/۲	۵	MG1655
۰	۰	۲	۲۰	

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.

جدول ۴- میزان بقای باکتریها (Log CFU/ml) در ترکیب عسل و سیپروفلوکسازین.

Log CFU/ml				موتان
(%)H3	(%)H2	(%)H1	سیپروفلوکسازین (µg/ml)	
۴/۲	۳/۳	۴/۴۵	۲۰	PM1
۰	۰	۰	۶۰	

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.

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

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 سابیتیلیس (ATCC6633) بررسی شد. اثر هیدروژن پراکسید بر فعالیت ضد باکتری با اندازه‌گیری 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 می‌توان اطلاعات بیشتری از اهمیت اثر بازدارندگی این ماده به دست آورد.

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 می‌شود) به تنهایی و به صورت ترکیب با سیپروفلوکسازین 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 سیپروفلوکسازین (MIC=۱۲۰ µg/ml) و تیپ وحشی سویه MG1655 مطالعاتی انجام شد و نتایج نشان داد که:

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

دارویی باکتری *E. coli*، همانند یک مهار کننده پمپ عمل می‌کند (۲-۳). با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیق فعلی، عسل به صورت ترکیبی با سیپروفلوکسازین 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 می‌کند.

تشکر و قدردانی

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

علی‌رغم 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 سیپروفلوکسازین بر روی سویه *E. coli* با افزایش بیان پمپ AcrAB-TolC صورت نگرفته است و تحقیق فعلی اولین تحقیق در این راستا می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه محمدی و پوراحمد سیپروفلوکسازین در سویه‌های مقاومت چند

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 زیست‌شناسی 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، شارق ب، فرهادیان ص (۱۳۹۶) اثر عصاره آلکالوئیدی گیاه تلخ‌بیان بر میزان MIC و تجمع داخل سلولی سیپروفلوکسازین در موتانت مقاوم به سیپروفلوکسازین اش‌ریشیا کلی، مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی 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- Klaudung 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 bacterial exit duct for proteins and drugs. *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 fluoroquinolones 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