



## In vitro Evaluation of Antibacterial Efficacy of Natural Honeys in Comparison with Antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*

Vahid Yavarpour<sup>1</sup>, Mehdi Zarabi<sup>1</sup>, Davoud Esmaili<sup>2</sup>, Javad Mohamadnejad<sup>3</sup>

1. Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Research Center of Applied Microbiology, Department of Medical Microbiology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran.

### Article Information

#### Article history:

Received:2014/03/12  
Accepted:2014/05/20  
Available online:2014/05/05

#### Article Subject:

Antimicrobial Substances

IJMM 1393; 8(1): P 34-37

#### Corresponding author at:

Dr. Mehdi Zarabi

Department of Life Science  
Engineering, Faculty of New  
Sciences and Technologies,  
University of Tehran, Tehran,  
Iran

#### Email:

[mzarabi@ut.ac.ir](mailto:mzarabi@ut.ac.ir)

### Abstract

**Background and Aim:** Several studies have been done that showed honey has been therapeutic effects on infection disease like *Pseudomonas* infections. Our aim of this study is evaluation of the antibacterial activity of mono floral and multi floral honeys from different origin of Iran on growth of *Pseudomonas aeruginosa* and compare their activities with artificial honey and antibiotics.

**Materials and Methods:** Antimicrobial effect of honey was determined by disc diffusion and broth dilution method on 5 different concentration of honey.

**Results:** The highest inhibition zone ( $16 \pm 1/52$  mm) was recorded from persimmon honey in disc diffusion method. In this study the minimum inhibitory concentration (MIC) for manna honey and other natural honeys obtained 25% and 12.5% respectively. While *P. aeruginosa* was inhibited at concentration of 50% (ml/ml) of artificial honey.

**Conclusions:** This study showed that honey has a significant antibacterial effect on *P. aeruginosa*. There is a direct link between the concentration of honey and inhibition zone.

**Key Words:** Antibacterial activity ,Honey ,*Pseudomonas aeruginosa* ,Minimum Inhibitory Concentration.

Copyright © 2014 Iranian journal of medical microbiology. All rights reserved.

#### How to cite this article:

Yavarpour V, Zarabi M, Esmaili D, Mohamadnejad J. In vitro Evaluation of Antibacterial Efficacy of Natural Honeys in Comparison with Antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*. Iran J Med Microbiol. 2014; 8 (1) :34-37





## بررسی اثر ضدباکتری عسل طبیعی بر روی سودوموناس آئروژینوزا و مقایسه با پادزیست ها در شرایط آزمایشگاهی

وحید یاورپور کردستانی<sup>۱</sup>، مهدی ضرابی<sup>۱</sup>، داوود اسماعیلی<sup>۲</sup>، جواد محمدنژاد<sup>۳</sup>

۱. گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات میکروبی شناسی کاربردی، گروه میکروبی شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)، تهران، ایران
۳. گروه میکروبی شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**زمینه و اهداف:** مطالعات مختلفی انجام گرفته که نشان دهنده اثرات درمانی عسل بر روی بیماری های عفونی از جمله عفونت های سودوموناسی می باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی فعالیت ضدباکتری عسل های تکگل و چندگل حاصل از گیاهان مختلف ایران بر رشد سودوموناس آئروژینوزا و مقایسه فعالیت آن ها با عسل مصنوعی و پادزیست ها است.

**مواد و روش کار:** فعالیت ضد میکروبی عسل با روش های انتشار دیسک و رقت سازی براث در ۵ غلظت مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته ها و بحث:** بیشترین منطقه مهار (1/52 ± 16) در روش انتشار دیسک برای عسل خرما لو ثبت شده است. در این بررسی حداقل غلظت مهار (MIC) عسل گون گزانگبین و سایر عسل های طبیعی به ترتیب برابر 25٪ و 12/5٪ بدست آمد. در حالیکه عسل مصنوعی در غلظت 50٪ دارای اثر مهارکنندگی بود. این بررسی نشان داد که عسل های مورد مطالعه دارای اثر ضدباکتری قابل توجهی بر سودوموناس آئروژینوزا می باشد و ارتباط مستقیمی بین غلظت آن ها و میزان منطقه مهار وجود دارد.

**کلمات کلیدی:** فعالیت ضدباکتری، عسل، سودوموناس آئروژینوزا، حداقل غلظت مهار

### تاریخچه مقاله

دریافت: 1393/02/20

پذیرش: 1393/03/15

انتشار آنلاین: 1393/03/20

### موضوع:

مواد ضد میکروبی

IJMM 1392; 8(1): P 34-37

### نویسنده مسئول:

دکتر مهدی ضرابی

گروه مهندسی علوم زیستی،  
دانشکده علوم و فنون نوین،

دانشگاه تهران، تهران، ایران

تلفن: 09121011378

پست الکترونیک

mzarabi@ut.ac.ir

کپی رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

### مقدمه

با وجود اینکه پادزیست ها (آنتی بیوتیک ها)، راه اصلی برای کنترل عفونت هستند، اما یکی از نگران کننده ترین ویژگی های سودوموناس آئروژینوزا حساسیت پادزیستی کم آن است (۵)، که در این بین فشار انتخابی استفاده های آنتی بیوتیکی نامناسب و دوز افزایش یافته مؤثرترین علت می باشد (۳). شیوع سودوموناس آئروژینوزا مقاوم در حال افزایش است و یکی از مشکلات بهداشت عمومی بیشتر کشورهای جهان به حساب می آید (۳) و جدی ترین مشکل در پی توسعه این مقاومت، افزایش محدودیت استفاده های درمانی، عوارض، مرگ و میر و همچنین هزینه های درمان می باشد (۶). در نتیجه بدیع ترین و مؤثرترین روش برای

بیمارهای عفونی از جمله علل عمده مرگ و میر در میان بیماران می باشد که یک بار قابل توجه هم برای بیمار و هم برای سلامت عمومی به حساب می آیند (۱). در این میان سودوموناس آئروژینوزا از حدود 10٪ همه عفونت ها جدا شده است (۲). این میکروارگانیسم جزء باسیل های گرم منفی فرصت طلب است که معمولاً در محیط های متنوع حتی بیمارستان یافت می شود (۳). این امر منجر به عفونت های شدید و تهدیدکننده زندگی در میزبانان دچار نقص ایمنی می شود (۴).

### سویه میکروبی

میکروارگانسیم مورد بررسی در این آزمون، سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 49189) بوده که از دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... تهران، تهیه شده است.

### دیسک‌های آنتی‌بیوگرام

دیسک‌های آنتی‌بیوتیک فورازولیدون، اریترومايسين، سفنازیدیم، پلی‌میکسین B، سفتریاکسون، جنتامایسین، آمپی‌سیلین و ایمی‌پنم، به منظور مقایسه با انواع عسل، از شرکت پادتن طب تهیه گردید.

### تست‌های ضد میکروبی

روش انتشار دیسک (دیسک دیفیوژن): طبق پروتکل CLSI سوسپانسیون استاندارد میکروبی بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (Merck)، کشت داده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوگرام بوسیله پنس بر روی پلیت‌ها قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، نتایج هاله عدم رشد قرائت شد (۹).

### روش رقت‌سازی براث (براث دابلوشن)

جهت تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC)، طبق پروتکل CLSI رقت سریالی دو برابر از انواع عسل طبیعی و مصنوعی در لوله‌های مولر هینتون براث تهیه گردید. سپس به هر کدام از لوله‌ها  $5 \times 10^5$  CFU/ml از سویه میکروبی معادل استاندارد نیم مک‌فارلند به ازای هر میلی‌لیتر محیط براث افزوده شد. نتایج بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون به صورت کدورت میکروبی قابل مشاهده قرائت و ثبت گردید. آخرین رقت که در آن کدورت میکروبی مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت مهارتی (MIC) در نظر گرفته شد (۹).

مقایسه میانگین هاله عدم رشد با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و با حداقل اختلاف معنی‌دار  $p < 0.01$  توسط نرم‌افزار spss 21 انجام گرفته است.

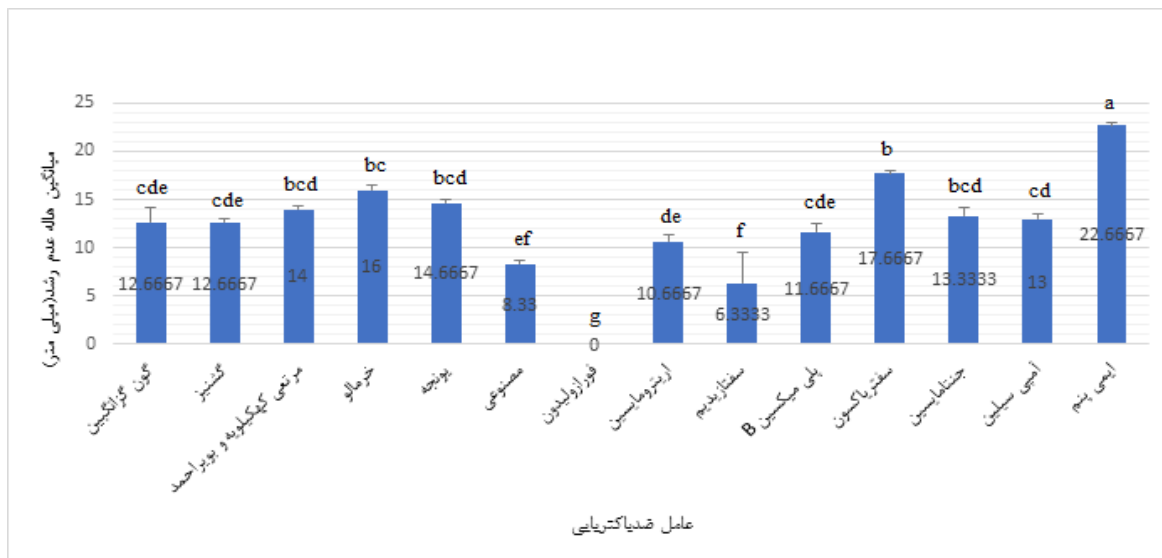
درمان عفونت به صورت فوری مورد نیاز می‌باشد (۴). طب سنتی با تکیه بر محصولات طبیعی نقش مهمی در درمان بیماری‌های عفونی بازی می‌کند (۱). سوءاستفاده از پادزیست‌ها، ظهور باکتری‌های مقاوم، هزینه بالا و عدم دسترسی به برخی از داروهای معمولی فرصتی برای عسل ایجاد کرد تا به عنوان یک عامل درمانی وسیع‌الطیف مورد استفاده قرار گیرد (۷). در واقع فعالیت ضد میکروبی عسل به طور گسترده‌ای با افزایش توسعه باکتری‌های مقاوم ارزش پیدا کرده است (۱).

هدف از این تحقیق بررسی اثر ضد میکروبی عسل‌های مختلف نک‌گل خاص و چندگل از مناطق مختلف ایران بر روی سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا و مقایسه آن‌ها با پادزیست‌های مختلف و تعیین MIC می‌باشد و با توجه به نقش مهم این باکتری در بیماری‌های عفونی، یافتن مواد طبیعی قادر به مهار رشد آن ضروری به نظر می‌رسد.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه عسل

این تحقیق بر روی پنج نمونه عسل طبیعی و یک نمونه عسل مصنوعی انجام گرفته است که انواع طبیعی آن شامل گون‌گزانبین، گشنیز، مرتعی کهکلیویه و بویراحمد، خرمالو و یونجه می‌باشد. عسل مصنوعی نیز از ترکیب ۲۰ گرم فروکتوز، ۱۵ گرم گلوکز، ۴ گرم مالتوز و ۱ گرم ساکارز با ۱۰ میلی‌لیتر آب تهیه شد. عسل‌ها بعد از تهیه و جمع‌آوری در دمای اتاق، دور از نور و رطوبت نگهداری شدند (۸). دیسک‌های عسل از طریق غوطه‌ورسازی دیسک‌های بلانک با قطر ۶ میلی‌متر در رقت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰٪ (حجمی/حجمی) از عسل در آب دو بار تقطیر استریل برای تست انتشار دیسک و رقت‌های سریالی دو برابر (۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶ و ۱/۳۲) از عسل در مولر هینتون براث برای تست رقت‌سازی براث تهیه شد (۹).



نمودار ۱: مقایسه اثر ضدباکتری انواع عسل و پادزیست ها

## یافته ها و بحث

در روش انتشار دیسک اثر ضدباکتری انواع عسل، وابسته به غلظت بوده و همراه با افزایش غلظت عسل ها قطر هاله عدم رشد نیز افزایش یافته است و تمامی عسل ها در غلظت ۱۰٪ بالاترین فعالیت ضدباکتری را از خود نشان دادند. در این رابطه عسل های خرمالو < یونجه < مرتعی کهکیلویه و بویر احمد < گون گزانگبین = گشنیز < مصنوعی به ترتیب دارای بیشترین منطقه مهارتی بر روی کشت سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا بوده اند.

بررسی اثر مهارکنندگی رشد انواع عسل در روش رقت سازی براث نشان داد که حداقل غلظت مهارتی ۱۲/۵٪ برای عسل های گشنیز، خرمالو، یونجه و مرتعی کهکیلویه و بویر احمد، و حداقل غلظت ۲۵٪ برای عسل گون گزانگبین و غلظت ۵۰٪ برای عسل مصنوعی می باشد.

بررسی و مقایسه فعالیت ضد میکروبی انواع عسل با پادزیست ها در این تحقیق نشان دهنده اختلاف معنی دار آنتی بیوتیک ایمی پنم با سایر پادزیست ها و انواع عسل از لحاظ آماری بود. در حالیکه بین آنتی بیوتیک سفتریاکسون و عسل های خرمالو، یونجه و مرتعی کهکیلویه و بویر احمد تفاوت آماری معنی داری قابل مشاهده نبود. در این مطالعه پادزیست های جنتامایسین، آمی سیلین، پلی مایکسین B و اریتروماسین با هیچ کدام از عسل های طبیعی از لحاظ تأثیر ضدباکتری تفاوت معنی داری نشان ندادند (نمودار ۱).

فعالیت ضد میکروبی عسل از لحاظ درمانی بسیار ارزشمند می باشد و ممکن است به دلیل مکانیسم های متعددی باشد که دارای اثرات سمی بر روی باکتری هاست و متابولیسم و ساختار آن ها را تحت تأثیر قرار می دهد. خواص عسل از جمله محتوای قند بالا، اسیدیته، فعالیت کم آب، تولید

پراکسید هیدروژن، مواد فرار با منشأ گیاهی یا دیگر اجزای ناشناس غیرپراکسیدی به طور مجزا یا هم افزایی از فعالیت مهارکنندگی عسل بر رشد باکتری حمایت می کند (۹).

بر مبنای این نتایج، عسل های طبیعی اثر مهارتی متفاوتی بر رشد سودوموناس آئروژینوزا نشان داده اند که با گزارش تیومین و همکارانش که در سال ۲۰۰۵ مطالعه ای بر روی فعالیت ضدباکتری انواع عسل محلی مالزی انجام دادند، متفاوت بود (۱۰).

نتایج بدست آمده از روش انتشار دیسک نشان داد که عسل های طبیعی در تمامی غلظت های مورد سنجش باعث مهارت رشد سودوموناس آئروژینوزا می شود و با افزایش غلظت، میزان این منطقه افزایش یافته است. در حقیقت وابستگی معنی داری بین غلظت ها و قطر هاله عدم رشد وجود دارد، که مشابه نتایج تحقیق آیانویو در سال ۲۰۱۱ بود (۱۱).

یافته های بدست آمده از روش رقت سازی براث در مطالعه حاضر نشان دهنده میزان حداقل غلظت مهارتی در محدوده ۱۲/۵-۲۵٪ (میلی لیتر/ میلی لیتر) برای عسل های طبیعی بود. که نتایج حدوداً مشابهی در تحقیقات دیگران بدست آمد که نشان داد این میزان برای عسل ها در محدوده ۱۰-۲۰٪ می باشد (۱۲). نتایج بررسی Sherlock و همکارانش بر روی سودوموناس آئروژینوزا در سال ۲۰۱۰ نیز در توافق با نتایج حاصل از این تحقیق بود، به طوریکه میزان MIC عسل طبیعی ۱۲/۵٪ و برای عسل مصنوعی ۵۰٪ گزارش شد (۱۳).

نتایج حاکی از این واقعیت است که عسل های طبیعی مورد بررسی در این مطالعه اثر ضدباکتری قابل توجهی بر رشد سویه سودوموناس آئروژینوزا دارند و با افزایش غلظت انواع عسل، این اثر بیشتر می گردد. مقایسه میزان منطقه مهارتی در غلظت های بالای عسل مصنوعی با انواع

### تشکر و قدردانی:

نویسندگان بررسی حاضر از کلیه کارکنان مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و مرکز کنترل کیفی بهداشت مواد غذایی و میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و همچنین جناب آقای دکتر حسن ممتاز و دکتر امیر شاکریان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

### تعارض منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

عسل طبیعی در این بررسی گویای این مطلب می‌باشد که خواص فیزیکی عسل از جمله میزان قند بالا تا حدودی مسئول خواص ضد میکروبی آن است.

در این تحقیق، به آنالیز بیوشیمیایی عسل پرداخته نشده است. ولی با توجه به قدرت ضدباکتری بالاتر عسل‌های طبیعی نسبت به عسل مصنوعی می‌توان انتظار داشت که منشأ این مواد عمدتاً به فلور گیاهی منطقه‌ای که عسل از آنجا جمع‌آوری گشته، برمی‌گردد.

## References

- Girija S. Singh and Surendra N. Pandeya., Natural products in discovery of potential and safer antibacterial agents. Opportunity Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry. 2011;pp 63-101
- Bereket W, Hemalatha K, Getenet B, Wondwossen T, Solomon A, Zeynudin A, et al. Update on bacterial nosocomial infections. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2012;16(8):1039-44.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature. 2000;31;406(6799):959-64.
- Kumari S, Harjai K, Chhibber S. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO specific bacteriophages isolated from sewage samples. Am J Biomed Sci. 2009;1:91-102.
- Forozesh Fard M, Irajian G, Moslehi Takantape Z, Fazeli H, Salehi M, Rezanian S. Drug resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients at Isfahan AL Zahra hospital, Iran (2009-2010), Iran J microbiol. 2012; 4(2): 94-97
- Saga T, Yamaguchi K. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. JMAJ. 2009;52(2):103-08.
- Khairy EA, Hedia RH, Dorgham SM, Effat M. Comparative studies on antimicrobial activities (AMA) of different types of honey using bacteria from animal origin. International Journal of Microbiological Research. 2013;4(1):50-5.
- Fidaleo M, Zuurro A, Lavecchia R. Antimicrobial Activity of some Italian Honeys against Pathogenic Bacteria. CHEMICAL ENGINEERING. 2011;24:1015.
- Fritsche TR, McDermott PF, Shryock TR, Walker RD, Morishita TY. Agar dilution and disk diffusion susceptibility testing of *Campylobacter* spp. J Clin Microbiol. 2007;45(8):2758-9; author reply 9.
- Song JJ, Salcido R. Use of honey in wound care: an update. Adv Skin Wound Care. 2011;24(1):40-4.
- Tumin N, Halim N, Shahjahan M, Noor Izani N, Sattar MA, Khan A, et al. Antibacterial activity of local Malaysian honey. Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2005;3(2):1-10.
- Mullai V, Menon T. Bactericidal activity of different types of honey against clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Altern Complement Med. 2007;13(4):439-41.
- Sherlock O, Dolan A, Athman R, Power A, Gethin G, Cowman S, et al. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Complement Altern Med. 2010;10(1):47.