



Antibacterial Effects of Azerbaijan honey on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm

Reza Ghotaslou^{1,2}, Hojatollah Saghati³, Alireza Dehnad³, Behnaz Salahi Eshlaghi⁴

1. Infectious and Tropical Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

2. Departments of Microbiology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

3. High School of Rab- Rashid, Tabriz Iran.

4. Research center of Midwife School, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Article Information

Article history:

Received: 2014/10/27

Accepted: 2015/05/03

Available online: 2016/01/10

Article Subject:

Antimicrobial Substances

IJMM 1394; 9(4): 40-46

Corresponding author at:

Dr Reza Ghotaslou

Department of Microbiology,
School of Medicine, Tabriz
University of Medical Sciences,
Tabriz, Iran.

Tel:

+98 411 3364661

Email:

rzgottaslo@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunist pathogen. The infections due to biofilm are difficult to eradicate with current antimicrobial agents. In this study, we investigated the antimicrobial and antibiofilm activity of the honey against 40 *P. aeruginosa* isolates.

Materials and Methods: To assess antimicrobial activity, the MIC and MBC assays were used. Antibiofilm activity of tested honey evaluated using the MTP, Congo Red Agar, and tube methods.

Results: The initial screening demonstrated that 40 of 80 *P. aeruginosa* isolates were biofilm-producer. The honey exhibited a significant antibacterial activity against the planktonic form of *P. aeruginosa*. The MIC of Polak, Baboneh and Yonjeh honeys against *P. aeruginosa* were 12.5-25, 6.25-25 and 12.5-25% w/v, respectively. The results indicated that the tested honey also had significant antibiofilm activity.

Conclusions: Antibacterial effects of honey are observed in both planktonic and biofilm forms. However, higher concentrations of honey have needed to inhibit biofilm. These findings indicate the potential antimicrobial of Azerbaijan honey and, it can be used in the treatment of bacterial infections diseases due to *P. aeruginosa*.

Key Words: Honey, Biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Ghotaslou R, Saghati H, Dehnad A, Salahi Eshlaghi B. Antibacterial Effects of Azerbaijan honey on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. Iran J Med Microbiol. 2016; 9 (4) :40-46



مطالعه اثر ضد باکتریایی عسل آذربایجان روی بیوفیلیم سودوموناس ائروژینوزا

رضا قوطاسلو^۱، حجت اله سقّتی^۲، علیرضا دهناد^۳، بهناز صلاحی اشلقی^۴

۱. مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
۲. گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
۳. موسسه عالی ربع رشید تبریز، تبریز، ایران.
۴. مرکز تحقیقات دانشکده پرستاری و مامائی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: سودوموناس ائروژینوزا یک بیماری زای فرصت طلب است. درمان عفونت های ناشی از بیوفیلیم با داروهای جاری مشکل است. در این مطالعه اثر ضد باکتریایی و ضد بیوفیلیمی عسل در مقابل ۴۰ ایزوله سودوموناس ائروژینوزا بررسی شده است.

مواد و روش ها: اثر ضد میکروبی عسل توسط روش های حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) ارزیابی شد. فعالیت ضد بیوفیلیمی عسل مورد تست به روش میکرو پلیت (PTM) و کنگو رد آگار و روش لوله ای انجام گردید.

یافته ها: غربالگری اولیه نشان داد که از ۸۰ سودوموناس ائروژینوزا ۴۰ ایزوله تولید کننده بیوفیلیم بودند. نتایج حاصل از تست های انجام شده نشان داد که عسل دارای خاصیت ضد میکروبی روی نوع پلانکتونی سودوموناس ائروژینوزا می باشد. MIC عسل پولک کلیر، بایونه سهند و یونجه سهند در مقابل ایزوله های سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب ۲۵-۶/۲۵ و ۲۵-۱۲/۵ و ۲۵-۱۲/۵ v/w٪ بود. هم چنین عسل فعالیت ضد بیوفیلیمی قابل توجهی دارند.

نتیجه گیری: اثرات ضد باکتریایی عسل در هر دو شکل آزاد و بیوفیلیمی مشاهده شد، گرچه غلظت های بالاتری از عسل برای مهار بیوفیلیم نیاز بود. این مطالعه پتانسیل ضد میکروبی و ضد بیوفیلیمی عسل را تایید می کند و می توان از آن در درمان عفونت های باکتریایی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: بیوفیلیم، عسل، سودوموناس ائروژینوزا

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

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۰۵

پذیرش: ۱۳۹۴/۰۲/۱۳

انتشار آنلاین: ۱۳۹۳/۱۰/۲۰

موضوع:

مواد ضد میکروبی

IJMM 1394; 9(4): 40-46

نویسنده مسئول:

دکتر رضا قوطاسلو

گروه میکروبی شناسی دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تبریز

تلفن: ۰۴۱۱۳۳۳۶۴۶۶۱

پست الکترونیک:

rzgottaslo@yahoo.com

مقدمه

که در یک پوشش گلیکوکالیکس محصور شده و به سطوح مخاطی می چسبند (۲). بیوفیلیم ها با عواملی همچون ضد عفونی کننده ها و دارو از بین نمی روند و بر روی سطح باقی مانده و سبب آلودگی و انتقال بیماری های عفونی می گردند (۳). بیوفیلیم های میکروبی در ۶۵ درصد عفونت های انسان مانند بیماری های ریشه دندان، پوسیدگی دندان، عفونت های شنت مغزی، مفصل مصنوعی، کاتترهای وریدی، زخم سوختگی، سوندهای ادراری و تنفسی دیده می شوند (۳-۶). گاهی بیماران دارای بیوفیلیم به دلیل وخامت اوضاع می میرند (۶-۹). مهمترین خاصیت متمایز بیوفیلیم نوع متفاوت رشد آنها بوده که سبب مقاومت دارویی و نیاز به درمان متفاوت و روش های متمایز شناسائی می گردد (۷). این توده ها

سودوموناس ائروژینوزا یک باکتری گرم منفی، متحرک، اکسیداز مثبت از دسته باسیل های گرم منفی غیر تخمیری است. این باکتری یکی از مهم ترین باکتری های ایزوله شده از بیماران می باشد. این باکتری عامل یک سوم از عفونت های ریوی و شایع ترین دلیل مرگ بیماران سیستمیک فیبروزیس می باشد. از مکانیسم های بیمارزائی این باکتری توانائی تولید بیوفیلیم و مقاومت سطح بالا به اغلب آنتی بیوتیک ها می باشد (۱).

بیوفیلیم های باکتریائی، تجمعات پیچیده باکتری ها هستند

دماي اتاق و دور از نور نگهداری گردید.

محاسبه MIC و MBC

MIC و MBC عسل به روش استاندارد روی فرم پلانکتونی باکتری آزمایش شدند (۱۱ و ۲). در این مطالعه برای تشخیص تشکیل بیوفيلم از سه روش کنگو رد آگار (CRA)، روش لوله ای (TM) و میکرو پلئیت (MTP) استفاده گردید (۲). تعیین MIC و MBC در زیر به اختصار توضیح داده می شود.

برای تعیین MIC از روش آبگوشت رقتی در پلیت های ۹۶ تایی ته صاف استفاده شد (۱۱ و ۲). ابتدا ۱۵۰ میکرولیتر محیط MHB (مرک آلمان) در هر یک از چاهک ها ریخته شد. بعد از تهیه رقت های ۲ برابر و سریالی از عسل مقدار 10^5 cfu/ml از ایزوله های مورد مطالعه در چاهک ها تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. یکی از چاهک ها به عنوان شاهد منفی بدون تلقیح میکروب باقی ماند و آخرین چاهک از هر ستون بدون عسل و تنها با داشتن ایزوله مورد نظر به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت رشد و عدم رشد چاهک ها بررسی شد. رشد باکتری به صورت کدورت، گلوله ای شدن در ته چاهک و تیرگی و ابری شدن بود.

بعد از تعیین مقدار MIC، برای تعیین MBC مقدار ۵۰ میکرولیتر از چاهک های فاقد کدورت برداشته و روی پلیت آگار کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، تعداد کلنی های ظاهر شده روی پلیت ها شمارش و با تعداد کلنی های ظاهر شده از کشت شاهد مقایسه گردید. کمترین غلظت از عوامل ضد میکروبی که اجازه رشد کمتر از ۱٪ درصد از کشت شاهد را بدهد، به عنوان کمترین غلظت باکتری کشی (MBC) در نظر گرفته شد (۱۱ و ۲).

آزمون میکروپلئیت (MTP)

برای انجام روش MTP از غلظت $1/2$ ، $1/4$ ، $1/8$ MIC محلول عسل استفاده شد. بعد از آماده شدن چاهک و تلقیح 10^5 cfu/ml هر ایزوله، میکرو پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت محتویات هر چاهک به آرامی برداشته و با ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین سه دفعه شسته شد. جهت تثبیت بیوفيلم ۲۰۰ میکرولیتر استات سدیم ۲ درصد به هر یک از چاهک ها اضافه و سپس ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله $1/0$ درصد به چاهک ها افزوده شده و به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه گردیدند. بعد از گذشت این مدت چاهک ها به وسیله آب شسته شده و اجازه خشک شدن در دمای اتاق داده شد. رنگ چسبیده به سطح توسط اتانول ۹۵٪ خارج و OD بیوفيلم چسبیده رنگ آمیزی شده توسط اتوریدر میکرو الیزا (بلژیک ELISA autoreader) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. جهت حصول اطمینان آزمایش ها سه بار تکرار گردید (۲).

مانند اسپور باکتری ها به آنتی بیوتیک ها مقاوم بوده (۱۰) و بعضی از محققین ادعا دارند که مقاومت بیوفيلم نسبت به آنتی بیوتیک ها هزار برابر شکل پلانکتونیک است (۱۰-۹ و ۶) و مقاومت دارویی یکی از دلایل اصلی پایداری باکتری ها و ایجاد بیماری های عفونی مزمن می باشند (۱۰ و ۲).

عسل یک محلول فوق اشباع قندی با ویسکوزیته بالا است که توسط زنبور عسل بعد از تغییرات در شهد گل های جمع آوری شده به دست می آید. مواد تشکیل دهنده عسل حدود ۲۰۰ ماده مختلف می باشد. زنبور عسل شهد گل ها را جمع آوری کرده و با موادی که خود ساخته ترکیب می کند. سپس عسل در شانه های عسل ذخیره می شود تا عسل کامل به دست آید. استفاده از طب سنتی در درمان عفونت ها از زمان خلقت انسان به کار برده شده است. عسل در اکثر فرهنگ های قدیمی به منظور درمان مورد استفاده قرار گرفته است. عسل دارای خاصیت مهاری بر علیه انواع باکتری ها اعم از هوازی و غیر هوازی گرم مثبت و گرم منفی است. امروزه نیز درمان های مختلفی بر اساس عسل و دیگر محصولات زنبور علیه عفونت های باکتریایی ارائه می گردد (۱۱).

با توجه به مشکلات عمده بیوفيلم ها و مقاومت بالای باکتری ها به آنتی بیوتیک های متداول و هزینه نسبتا بالا و عوارض این داروهای ضد بیوفيلم موجود، اخیرا استفاده از مواد طبیعی مانند عسل برای درمان بیوفيلم مورد توجه قرار گرفته است. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر ضد باکتریایی و ضد بیوفيلمی عسل آذربایجان روی شکل آزاد باکتری (پلانکتونی) و فرم بیوفيلمی سودوموناس *ائروژینوزا* بود.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها

۸۰ سودوموناس *ائروژینوزا* از نمونه های مختلف بیماران شامل زخم، مخاط گلو و ادرار در آزمایشگاه کشت و توسط تست های بیوشیمیایی و روش های استاندارد تعیین هویت شدند. جهت مطالعه اثر عسل روی باکتری ها؛ بعد از شناسایی و تعیین هویت جهت تشخیص تشکیل بیوفيلم مورد آزمایش قرار گرفتند.

تهیه نمونه های عسل

سه نوع عسل شامل عسل بابونه سهند و یونجه سهند و پولک کلیبر تهیه و سپس استوک اصلی به وسیله حل کردن عسل در محیط کشت آبگوشت مولر-هینتون (MHB) (مرک آلمان) آماده شد. جهت تهیه استوک اصلی با غلظت ۱۰۰ درصد v/w ابتدا وزن مورد نظر از عسل اندازه گیری و سپس در محیط کشت MHB حل شد. محلول فوق از صافی گذرانده و جهت استریلیزاسیون محلول از فیلترهای 0.45 میکرونی (میلی پور ایرلند) استفاده شد. محلول حاصل از فیلتراسیون در لوله های استریل ریخته و در

آنالیز داده ها

داده های بدست آمده از مطالعه بوسیله روش های آماری توصیفی (فراوانی - درصد) و آزمون رابطه دقیق فیشر و کای دو با استفاده از نرم افزار SPSS-۱۶ مورد بررسی و تجزیه تحلیل آماری قرار گرفت. در این مطالعه مقدار p کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار بود.

نتایج

از میان ایزوله های تعیین هویت شده ۴۰ ایزوله تشکیل دهنده بیوفیلیم قوی انتخاب شدند. نتایج بررسی تشکیل بیوفیلیم ۸۰ نمونه سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از تست های CRA، TM و MTP در جدول ۱ نشان داده شده است. در این تحقیق از سه روش آزمایش استفاده شده برای تولید بیوفیلیم و با توجه به نتایج به دست آمده ۷۲ درصد از ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا توسط تست MTP و با استفاده از تست های TM و CRA به ترتیب ۵۹٪ و ۲۱٪ به عنوان تشکیل دهنده بیوفیلیم شناسایی شدند. با توجه به این داده ها MTP یک روش حساس تری در تشخیص تشکیل بیوفیلیم می باشد ($p < ۰,۰۵$).

جهت تعیین MIC و MBC عسل از غلظت ۵۰۰ و ۲۵۰ و ۱۲۵ و ۶۲/۵ و ۳۱/۲ و ۱۵/۶ و ۷/۸ میلی گرم در میلی لیتر در مقابل ۴۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا استفاده شد. نتایج این تست در جدول ۲ آورده شده است.

میانگین درصد مهار بیوفیلیم ایزوله های سودوموناس

آئروژینوزا با غلظت های MIC ۱/۲، MIC ۱/۴، MIC ۱/۸ و MIC ۱/۸ عسل یونجه سه‌دست به ترتیب ۶۴ و ۴۰ و ۸ درصد و بابونه سه‌دست به ترتیب ۶۲ و ۳۶ و ۵ درصد و در مقابل همین غلظت ها از عسل پولک کلیبر به ترتیب ۶۹ و ۴۴ و ۶ درصد بود.

از نظر آماری تفاوت معنی داری بین درصد مهار غلظت های MIC ۱/۲ عسل پولک کلیبر و یونجه سه‌دست ($p=۰/۳۷۷$)، غلظت MIC ۱/۸ عسل پولک کلیبر و بابونه سه‌دست ($p=۰/۱۵۴$) و غلظت های MIC ۱/۲، MIC ۱/۴، MIC ۱/۸ عسل های یونجه و بابونه با سطح معنی داری به ترتیب ۰/۲۷۰ و ۰/۳۵۸ و ۰/۶۹۶ وجود نداشت. در کل از نظر آماری تفاوت معنی داری بین درصد مهار غلظت های مختلف عسل پولک کلیبر و یونجه سه‌دست و بابونه سه‌دست ($p=۰/۱$) وجود نداشت.

بحث

فعالیت آنتی باکتریایی عسل توسط محققین زیادی گزارش شده و عسل طبیعی دارای فعالیت های ضد باکتریایی وسیع الطیف در برابر باکتری های بیماری زا است (۱۱-۱۳). در این مطالعه نیز اثرات ضد میکروبی عسل بخوبی اثبات شد و با مطالعات فوق کاملاً هم خوانی دارد.

مقایسه MIC و MBC عسل های مورد تست در مقابل ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا نشان می دهد که هر سه نوع عسل دارای اثر ضد باکتریایی خوبی در مقابل ۴۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا می باشند. در این تحقیق هیچکدام از عسل ها در غلظت های کمتر از ۶/۲۵ درصد اثر ضد میکروبی نشان ندادند. میانگین

جدول ۱: نتایج تشکیل بیوفیلیم ۸۰ سودوموناس آئروژینوزا جدا شده با استفاده از روش های TM، MTP، CRA

شدت تشکیل بیوفیلیم	MTP (%)	TM (%)	CRA (%)
قوی	۳۷ (۴۶)	۸ (۱۰)	۱۷ (۲۱)
متوسط	۲۱ (۲۶)	۳۹ (۴۹)	۰
ضعیف/ندارد	۲۲ (۲۸)	۳۳ (۴۱)	۶۳ (۷۹)

جدول ۲: نتایج تشکیل بیوفیلیم ۸۰ سودوموناس آئروژینوزا جدا شده با استفاده از روش های TM، MTP، CRA

نوع عسل	MBC (w/v)	تعداد (درصد)	MIC (w/v)	تعداد (درصد)
عسل یونجه	۵۰٪	۳۵ (۸۷/۵)	۲۵٪	۲۶ (۹۰)
	۲۵٪	۵ (۱۲/۵)	۱۲/۵٪	۴ (۱۰)
عسل بابونه	۵۰٪	۳۸ (۹۵)	۲۵٪	۳۸ (۹۵)
	۲۵٪	۲ (۵)	۱۲/۵٪	۲ (۵)
عسل پولک	۵۰٪	۱۳ (۳۲/۵)	۲۵٪	۱۲ (۳۰)
	۲۵٪	۱۷ (۴۲/۵)	۱۲/۵٪	۱۵ (۳۷/۵)
	۱۲/۵٪	۱۰ (۲۵)	۶/۲۵٪	۱۳ (۳۲/۵)

علت اسیدیته زیاد و داشتن مواد قندی با اثرات اسموتیکی بالا که مانع رشد باکتری ها می گردد و هم چنین وجود مهارکننده هایی مانند پراکسید هیدروژن، فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک که توسط زنبور عسل از گیاهان مختلف وارد عسل می گردد، در درمان انواع بیماری های عفونی مورد استفاده قرار می گیرد (۱۹-۱۸). اثرات ضد بیوفیلیمی عسل های قسمت های مختلف جهان توسط محققین بررسی و نتایج مطالعات آنها در دسترس می باشد، اما نتایج جستجو در منابع اطلاعاتی نشان داد که تاکنون هیچ تحقیقی از اثرات ضد بیوفیلیمی عسل آذربایجان در مقابل باکتری ها انجام نشده است. Complin و همکاران فعالیت ضد بیوفیلیمی عسل مانوکا را در برابر یک سویه استاندارد و یک سویه بالینی سودوموناس /اثرزینوزا بررسی کرده و ۴۳/۳ و ۴۸/۳ درصد به دست آوردند (۱۵). Okhiria و همکاران اثر ضد بیوفیلیمی عسل را مطالعه و به این نتیجه رسیدند که مواجهه عسل مانوکا ۴۰٪ موجب کاهش قابل توجه در توده ی بیوفیلیم سودوموناس /اثرزینوزا می گردد (۱۹). بر اساس تحقیقات Merckoli و همکاران در نروژ، عسل در مقابل پنج پاتوژن مهم زخم های پوستی، دارای فعالیت مهارری روی بیوفیلیم های تشکیل شده بودند و طبق نتایج آن ها عسل medi و عسل جنگل نروژ در غلظت های به ترتیب ۱۲ و ۲۵ درصد، موجب مرگ باکتری های بیوفیلیمی می شوند (۲۰). Alandegni و همکاران در ایتالیا از مطالعه روی عسل به این نتیجه رسیدند که ۹۱٪ از بیوفیلیم های سودوموناس /اثرزینوزا مورد مطالعه حساس به عسل می باشند (۲۱). در این مطالعه از نظر فعالیت ضد بیوفیلیمی عسل ها، مهار تشکیل بیوفیلیم توسط هر سه نوع عسل در غلظت های ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸ MIC مشاهده شد. اثر مهارری بیشتر از ۶۰٪ در غلظت ۱/۲ MIC هر سه نوع عسل مورد تست در برابر بیوفیلیم سودوموناس /اثرزینوزا ثبت شد. اثر مهارکنندگی عسل پولک کلیبر و یونجه سهند در غلظت ۱/۲ MIC، نسبت به عسل بابونه سهند بیشتر می باشد. در غلظت ۱/۴ MIC و ۱/۸ MIC به ترتیب قدرت مهارری عسل پولک کلیبر و یونجه سهند بیشتر بود. در مقایسه با اثرات ضد بیوفیلیمی عسل گزارش شده از نقاط مختلف جهان، اثر ضد بیوفیلیمی عسل آذربایجان نسبت به عسل مانوکا بالاتر و نسبت به عسل ایتالیا کمتر است. در این مطالعه عسل پولک خاصیت ضد میکروبی و ضد بیوفیمی بالاتر از عسل یونجه و بابونه سهند داشت و احتمالاً عسل پولک حاوی مواد با خاصیت ضد میکروبی بیشتری است و نیاز به تحقیق بیشتری با کمک آزمون های تجزیه شیمیائی دقیقی است تا بتوان ماهیت آنها را تشخیص داد. تفاوت مشاهده شده در قدرت ضد باکتریایی عسل های مورد تست بستگی به نوع منطقه جغرافیایی، منبع گیاهی، فصل جمع آوری عسل و شرایط جمع آوری و شرایط ذخیره سازی آن و سن زنبور دارد. ماهیت ضد باکتریایی عسل به عوامل مختلفی چه به صورت واحد و چه به صورت سینرژیک وابسته است. در کل نصف باکتری ها (۴۰ از ۸۰ سودوموناس /اثرزینوزا) دارای قدرت تولید بیوفیلیم در عرض ۲۴ ساعت بودند،

MIC عسل ها ۱۶/۹۶ درصد بود؛ کمترین ۶/۲۵ و بیشترین ۲۵ درصد بودند. بیشترین اثر مهارری (کمترین MIC) مربوط به عسل پولک کلیبر بود و عسل های یونجه و بابونه سهند در رتبه بعدی قرار داشتند. بر اساس داده های آماری تفاوت معنی داری بین MIC و MBC عسل یونجه و عسل بابونه وجود نداشت (p بیشتر از ۰/۰۵) در این مطالعه شاید مهار رشد باکتری ها توسط عسل وابسته به مقدار و وزن عسل است (P کمتر از ۰/۰۵). مهار بیوفیلیم در حضور عسل ۶/۲۵ درصد نشانگر کاهش توده بیوفیلیم با رقت های بالاتر و قدرت ضد میکروبی بالا می باشد. از طرفی MBC عسل روی ایزوله های مورد مطالعه در تمامی موارد یک غلظت بالاتر از MIC بودند. میانگین MBC عسل ها ۳۳/۹۲ درصد بود؛ کمترین MBC ۱۲/۵ درصد و بیشترین ۵۰ درصد بودند.

مطالعات زیادی روی اثرات ضد میکروبی عسل در قسمت های مختلف جهان صورت گرفته است. Khosravi و همکاران اثر ضد باکتریایی سه نوع عسل ایران را بررسی کرده و گزارش کردند، فعالیت ضد باکتریایی خوبی دارند. بر اساس گزارش آن ها MIC عسل چهارمحال بختیاری، تهران و پاییزه کوهستان های شمال ایران در مقابل سودوموناس /اثرزینوزا به ترتیب ۷۰ و ۶۷ و ۷۱ درصد ۷/۷ می باشد (۱۲) و MIC این مطالعه نسبت به مطالعه ما، بالاتر بود. Tajik و همکاران اثر پنج نوع عسل تجاری تولید شده در مراتع ارومیه را آزمایش کرده و کمترین MIC را در برابر سودوموناس /اثرزینوزا با مقدار ۴۰٪ w/v برای عسل مراتع ترگه ور به دست آوردند (۱۳). بر اساس مطالعات Cooper و همکاران MIC عسل در مقابل سودوموناس /اثرزینوزا ۱۷ درصد w/v بود (۱۴). Complin و همکاران فعالیت ضد باکتریایی عسل مانوکا را در برابر یک سویه استاندارد (ATCC ۹۰۲۷) و یک سویه بالینی سودوموناس /اثرزینوزا بررسی کرده و MIC به ترتیب ۱۵/۳ w/v و ۲۵/۶ درصد به دست آوردند (۱۵). بر اساس تحقیقات Aled Robert و همکاران در انگلستان MIC و MBC عسل مانوکا در برابر سودوموناس /اثرزینوزا به ترتیب ۱۲ و ۱۶ درصد بود (۱۶).

ماتریکس بیوفیلیم با ممانعت از ورود مواد ضد میکروبی نقش مهمی در برابر عوامل درمانی داشته و علاوه بر این وجود فنوتیپ مقاوم، ناهمگونی سرعت رشد و متابولیک، پاسخ به استرس عمومی و ژن های اختصاصی مقاومت نقش مهمی را در مقاومت دارویی بیوفیلیم دارند (۲). مکانیسم های مقاومت ذاتی همچون پمپ های افلوکسی دارو، نفوذپذیری پایین غشا، غیر فعال سازی دارو، نیز در مقاومت دارویی فرم بیوفیلیمی دخیل هستند (۱۷). هم اکنون با توجه به عوارض عدیده ناشی از مصرف داروها و نیز مقاومت دارویی به خصوص در رابطه با داروهای شیمیایی توجه برخی از پژوهشگران به مواد با منشأ طبیعی معطوف شده است. عسل به عنوان ماده شفا بخش در انواع عفونت های موضعی و عفونت های باکتریایی مورد مصرف قرار می گیرد. عسل می تواند در کنار سایر داروهای شیمیایی به دلیل داشتن ترکیبات ضد باکتریایی و به

می شود اثرات آن در حالت پلانکتونی و بیوفیلمی باکتری های دیگر و قارچ ها بررسی گردد. با کمک علوم نوین مانند بیوتکنولوژی دارویی اثر ترکیبی عسل با گیاهان دارویی، پمادها و صابون ها و مواد ضد عفونی کننده و آنتی بیوتیک ها سنجیده شود. تغییرات بیان ژن در باکتری های تیمار شده با عسل و در *in vivo* بر روی ایزوله های بالینی و هم بر روی سویه های استاندارد بررسی همه جانبه ای صورت گیرد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با کمک مالی مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی تبریز صورت گرفته و قسمتی از آن پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دارویی (آقای حجت الله سقّتی) بود. از آقایان امیر جاهد اورنگ و حسین بیژن پور کارکنان آزمایشگاه بیمارستان شهید مدنی تبریز که در تهیه نمونه های باکتریایی کمک نموده اند کمال تشکر را داریم.

Reference

- Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza Sh. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLOS pathogens* 2008;4(1): 1-11.
- Ghotaslou R, Salahi B. Effects of oxygen on In-vitro biofilm formation and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharm Sci* 2013;19(3):96.
- Parsek MR, Greenberg EP. Socio-microbiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* 2005, 13(1):27-33.
- Wagner VE, Iglewski BH. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in CF infection. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008, 35(3): 124-34.
- Geesey GG, Richardson WT, Yeomans HG, Irvin RT, Costerton JW. Microscopic examination of natural sessile bacterial populations from an alpine stream. *Can J Microbiol* 1977; 23(12):1733-36.
- Adal KA, Farr BM. Central venous catheter-related infections: a review. *Nutr* 1996;12(3):208-13.
- Archibald LK, Gaynes RP. Hospital acquired infections in the United States: the importance of interhospi-

اما تولید بیوفیلیم یک شکل نبودند و حساسیت مختلفی به عسل داشتند. دلیل این امر شاید کشت مجدد باکتری ها در آزمایشگاه و نداشتن ژن تولید کننده بیوفیلیم و یا عدم بیان آن و نوع مطالعه در آزمایشگاه باشد. معمولاً ادعا شده که تولید بیوفیلیم در موجود زنده (*in vivo*) بیشتر از شرایط آزمایشگاه است (۱۷). در این تحقیق به منظور شناسایی تولید بیوفیلیم با سه روش غربال گری شدند. با توجه به نتایج و درصد های به دست آمده روش MTP یک روش حساس در تشخیص تشکیل بیوفیلیم می باشد، و این امر در مطالعات قبلی هم گزارش شده است (۲۱ و ۱۱).

می توان نتیجه گرفت که هر سه نوع عسل آذربایجان دارای اثر ضد باکتریایی و ضد بیوفیلیمی نسبتاً قوی می باشند و بیشترین اثر ضد باکتریایی مربوط به عسل پولک کلیر بود. عسل می تواند به عنوان یک ماده طبیعی، ارزان قیمت، بسیار مفید و موثر در درمان بیماری های عفونی خصوصاً در بخش سوختگی، مراقبت های ویژه و بیماران سیستمیک فیبروزیس مورد استفاده قرار گیرد. به دلیل عدم گزارش در مورد اثر ضد بیوفیلیمی عسل آذربایجان پیشنهاد

tal comparisons. *Nosocom Infec* 1997; 11(2):245-55.

- Dickinson M, Bisno AL. Infections associated with prosthetic devices: clinical considerations. *Int J Artif Organs* 1993;16(11):749-54.
- Kolter R, Siegel DA, Tormo A. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu Rev Microbiol* 1993;47(1):855-74.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995;49(1):711-45.
- Mirsalehiyan A, Tahmasebi G, Mirafshar S, Razaghi M, Abrishamy A. In vitro Antibacterial activity of some Iranian Honeys. *Med J Tab Uni Med Sc* 2006; 28(13):113-119.(In Persian).
- Khosravi-Darani K, Khaksar R, Esmaili S, Seyed-Reihani F, Zoghi A, Shahbazizadeh S. Antifungal and Anti-bacterial Synergistic Effects of Mixture of Honey and Herbal Extracts. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences* 2013;15(8), 30-33.(In Persian).
- Tajik H, Shokohi SJF, Elahi S. Assessment of Antimicrobial Efficacy of Commercial Urmia's Honeys. *IJFST* 2007; 4(2):39-45.(In Persian).

14. Cooper R, Jenkin L, Cooper S. Inhibition of bio-film of *Pseudomonas aeruginosa* by medi honey in vitro. *J Wound Care* 2014; 23(3): 93-96.
15. Camplin A, Maddocks E. Manuka honey treatment of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* results in the emergence of isolates with increased honey resistance. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2014;13(19): 1-5.
16. Roberts A, Maddocks S, Cooper R. Manuka honey is bactericidal against *Pseudomonas aeruginosa* and results in differential expression of *oprF* and *algD*. *Microbiol* 2012;158: 3005–3013.
17. Ghotaslou R, Salahi-Eshlaqghi B. Biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* and new preventive measures and anti- biofilm agents. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2013; 12(9): 747-68. (In Persian).
18. Taghavizad R. The Healing Effect of Honey as Stated in Quran and Hadith. *Quran Med* 2011;1(2):3-8.
19. Okhiria OA, Henriques AFM, Burton NF, Peters A, Cooper RA. Honey modulates biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* in a time and dose dependent manner. *J Api-Prod ApiMed Sci* 2009;(1): 6 – 10.
20. Merckoll P, Jonassen T, Vad ME, Jensson SL, Melby KK. Bacteria, biofilm and honey: A study of the effects of honey on ‘planktonic’ and biofilm-embedded chronic wound bacteria. *Scand J Infect Dis* 2009;41(5): 341-347.
21. Alandejani T, Marsan J, Ferris W, Slinger R, Chan F. Effectiveness of honey on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Otolaryngo–Head and Neck Surg* 2009;141(1):114-118.