Archive of SID

JFM

مجله میکروب شناسی مواد غذائی

بررسی باکتری شناسی ورم پستان گاو در گاوداری‌های شهر اصفهان و تأثیر عصاره‌های برەموم و گرده‌گل کندوی زنبورعسل بر روی باکتری‌های جدا شده

نجمه عکاف زاده[1]، نفیسه سادات نقوی[2*]، مهران مجلسی[3]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۲. گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۳. گروه زیست شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

[*]نویسنده مسئول: *naghavi@iaufala.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۲۶

چکیده

ورم پستان موجب تغییرات فیزیکی و شیمیایی در شیر و تغییرات آسیب شناسی در غده پستان می‌شود. این تحقیق با هدف شناسایی عوامل باکتریایی ورم پستان گاو در گاوداری‌های شهر اصفهان و بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌های برەموم و گرده‌گل زنبور عسل بر باکتری‌های جداسازی شده انجام پذیرفت. از ۱۰ گاو دارای علائم ورم پستان با رعایت شرایط استریل نمونه شیر تهیه شد. باکتری‌های جدا شده بر اساس خصوصیات ماکروسکوپی، میکروسکوپی و آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. عصاره‌های اتانولی و استونی برەموم و گرده‌گل با استفاده از روش خیساندن تهیه و اثر ضدباکتریایی آنها با استفاده از روش چاهک پلیت و هم‌چنین براساس روش میکرودایلوشن تعیین شد. باکتری‌های جدا شده شامل *استرپتوکوکوس آگلاکتیه*، *استافیلوکوکوس آرئوس*، *گونه ای از کورینه باکتریوم*، گونه ای از *لیستریا*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشرشیا کلای* بودند. عصاره‌های برەموم و گرده‌گل در روش چاهک پلیت بر روی جدایه‌های گرم مثبت مؤثر بودند اما روی انواع گرم منفی تأثیری نداشتند. میانگین نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی نشان دهنده اثرات قابل توجهی از عصاره استونی گرده‌گل بر *استرپتوکوکوس آگلاکتیه* (غلظت ۱۲/۵ mg/ml) و عصاره اتانولی گرده‌گل بر گونه *کورینه باکتریوم* (غلظت ۱۲/۵ mg/ml) بود. عصاره استونی برەموم بر *استافیلوکوکوس آرئوس* با غلظت ۲۵ mg/m و بر گونه *لیستریا* با غلظت ۱۲/۵ mg/ml بیشترین تأثیر را داشت. نتایج در بررسی حداقل غلظت کشندگی مورد تأیید قرار گرفت. عصاره‌های بره موم و گرده گل بر روی باکتری های گرم مثبت جداشده از ورم پستان گاو تأثیر قابل توجهی داشتند و این تأثیر بیشتر توسط عصاره های استونی مشاهده شد.

واژگان کلیدی: ورم پستان گاو، اثرضد باکتریایی، برەموم، گرده‌گل.

مقدمه

ورم پستان، یک واکنش التهابی از غده پستانی است که یکی از پرهزینه ترین بیماری‌ها برای دامداران به دلیل کم شدن تولید شیر، هزینه‌های درمان، دور ریختن شیر حاوی باقی مانده دارو در حین درمان، احتمال از بین رفتن یک یا چند قسمت پستان و یا حذف دام، هزینه‌های کارگری و دامپزشکی است(Yang et al., 2012) .استفاده از آنتی بیوتیک ها در درمان ورم پستان گاو ایجاد مقاومت در باکتری ها و مشکلاتی برای مصرف کنندگان کرده است. بسیاری از پاتوژن‌های مولد ورم پستان به طور مسری وجود دارند که متداول‌ترین آنها *استافیلوکوکوس آرئوس* و *استرپتوکوکوس آگلاکتیه* است. منبع معمول پاتوژن‌های مسری غدد آلوده گاو است. با این حال، دست‌های کارگر شیردوش می‌تواند به عنوان منبعی از *استافیلوکوکوس آرئوس* عمل کند. *استافیلوکوکوس آرئوس* و *استرپتوکوکوس آگلاکتیه* از نمونه‌های شیرتحت بالینی ورم پستان گاو نیز جدا شده اند (Ali et al., 2011) برەموم یک ماده رزینی، سفت و قهوه‌ای رنگ است که توسط زنبور عسل *آپیس ملیفرا*[1] از صمغ، جوانه و سایر بخش‌های گیاهان مختلف از جمله اکالیپتوس، صنوبر، شاه بلوط، کاج، نارون، بید و سپیدار تهیه می‌شود. ماده اولیه پس از جمع‌آوری تحت

1. *Apis mellifera*

www.SID.ir

Archive of SID

تأثیر آنزیم بتا-گلوکوزیداز مترشحه از غدد بزاقی زیر حلقی زنبورعسل، هیدرولیز می‌شود و بعد از هیدرولیز با مواد دیگری ترکیب می‌شود. حشره از بره‌موم حاصل برای مسدود نمودن درزها و شکاف‌های موجود در کندو استفاده می‌کند.

ترکیب شیمیایی

بره‌موم بستگی به شرایط آب و هوایی، زمان جمع‌آوری و منابع مختلف گیاهی دارد (Ownagh et al., 2010)بیش از ۳۰۰ نوع ترکیب شیمیایی در بره‌موم وجود دارد که از آن جمله می‌توان به اسیدهای آلیفاتیک و آروماتیک، استرها، فلاونوئیدها، قندها، گلیسرول، اسید فسفریک، وانیلین و میریستین و ویتامین‌های مختلفی نظیر تیامین، ریبوفلاوین، نیاسین، پانتوتنیک اسید و پیریدوکسین اشاره کرد (Albert et al., 1999).گرده‌گل زنبور عسل به عنوان تنها غذای کامل اشاره شده است، زیرا حاوی تمام اسیدآمینه‌های ضروری مورد نیاز انسان است. برای سال‌ها در طب سنتی، به عنوان تغذیه تکمیلی و در رژیم غذایی جایگزین به علت خواص تغذیه‌ی آن و خواص درمانی استفاده شده است. با این حال، ترکیب گرده‌گل به منبع بوته و منشاء جغرافیایی، همراه با عوامل دیگر مانند شرایط آب و هوایی، نوع خاک و فعالیت‌های پرورش دهنده زنبور عسل بستگی دارد. دانه‌های گرده‌گل، بسته به گونه‌های گیاهی، در شکل، رنگ، اندازه و وزن متفاوت هستند. شکل دانه گرده‌گل از گرد، استوانه‌ی، مثلثی تا خاردار متفاوت است. گرده‌گل دارای فلاونوئید است که موجب خاصیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضد التهابی، ضد باکتری و ضد قارچی می‌شود (Maruyama et al., 2010). گرده‌گل در برابر پروستاتیت و تب یونجه مؤثر است و در بهبود گوارش اثر دارد. گرده هایی که با باد پخش می شوند احتمال بیشتری دارد که مولد تب یونجه باشند، زیرا به راحتی از طریق تنفس وارد بدن می شوند. گرده هایی که زنبور عسل جمع آوری می کند، بزرگ تر و چسبنده ترند؛ بنابراین در هوا معلق نمی مانند. علاوه بر این، شهد چسبنده است، به طوری که می تواند گرده های پخش شده با باد را به خود جذب کند. هم‌چنین، زنبورها گرده گل را با بزاق حاوی مواد ضد التهاب و شهد مخلوط می کنند که بخشی از آن وارد عسل می شود و خواص درمانی آن را افزایش می دهد (Maruyama et al., 2010).

مواد و روش کار

تهیه نمونه

با استفاده از روش‌های استاندارد از ۱۰ رأس گاو مبتلا به تورم پستان از گاوداری‌های بزرگ صنعتی اصفهان در فصل تابستان نمونه برداری شد. ابتدا پستان گاوها شسته و خشک شد. به وسیله پنبه آغشته به الکل، سرپستانک به طور کامل ضدعفونی شد. ابتدا چند دوشش اولیه دور ریخته شد. سپس مقدار ۲۰ میلی لیتر شیر در ظرف شیشه ای درب دار استریل جمع‌آوری و در کنار یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان منتقل شـــد (Saleki et al., 2013).

جداسازی و شناسایی باکتری‌ها

از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌های جداسازی شده بر روی محیط کشت Blood Agar استفاده شد و خصوصیات ظاهری کلنی اعم از سطح کلنی، قوام، رنگ، حاشیه، اندازه و شفافیت مورد بررسی قرار گرفت. خصوصیات میکروسکوپی هر باکتری با توجه به شکل و آرایش و واکنش گرم آنها مورد بررسی قرار گرفت. از آزمون‌های شناسایی بیوشیمیایی توصیه شده برای شناسایی باکتری‌های به دست آمده استفاده شد (Brooks et al., 2010).

تهیه عصاره‌ها

بره‌موم و گرده‌گل استفاده شده در این پژوهش از تعاونی زنبورداران استان اصفهان تهیه گردید. برای تهیه عصاره اتانولی و استونی بره‌موم و گرده‌گل از روش خیساندن استفاده شد. به این ترتیب که برای تهیه عصاره اتانولی بره-موم و گرده‌گل ابتدا میزان ۷۵ گرم از هر ماده به ارلن‌های

www.SID.ir

Archive of SID

حاوی ۳۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۶٪ یا ۳۰۰ میلی لیتر استون به طور مجزا در بشر اضافه شد. سپس درب بشرها با آلومینیوم پوشانده شد و به مدت ۷۲ ساعت روی شیکر با سرعت ۱۲۰ rpm در دمای اتاق قرار گرفت. مخلوط گرده-گل و هر کدام از حلال‌های اتانول یا استون به مدت ۲ روز و مخلوط بره‌موم و هرکدام از حلال‌ها به مدت ۱۴ روز در مکان ثابت و در دمای اتاق نگهداری گردید. پس از گذشت مدت زمان لازم هر یک از عصاره‌ها توسط گاز استریل و کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف گردید. سپس عصاره‌ها به منظور تبخیر الکل در پلیت‌های شیشه ای بزرگ استریل ریخته شد و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در فور با دمای ۴۵°C قرار داده شد تا عصاره کاملاً خشک شود. عصاره‌های به دست آمده تا زمان استفاده درون یخچال با دمای ۴°C نگهداری شد (Tadhani et al., 2006; Dagostin et al., 2010).

تعیین فعالیت ضدمیکروبی

برای بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی بره-موم، استونی بره‌موم، اتانولی گرده‌گل و استونی گرده‌گل غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و۸۰۰ میلی-گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی و استونی با استفاده از محلول DMSO ۱۰٪ تهیه گردید. با استفاده از روش چاهک پلیت و بررسی قطر هاله عدم رشد فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ها بررسی گردید. به منظور اجرای روش چاهک پلیت کشت میکروبی ۲۴ ساعته باکتری‌های جداسازی و شناسایی شده با کدورت معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند در محیط کشت Trypticase Soy Broth تهیه گردید. سپس سوسپانسیون به دست آمده با استفاده از سواب استریل بر روی محیط کشت Muellr Hinton Agar در ۴ جهت کشت داده شد. بعد از گذشت ۰/۵ ساعت با استفاده از پیپت پاستور استریل چاهک هایی به قطر ۶ میلی‌متر با رعایت فاصله ۲/۵ سانتی‌متر از یکدیگر بر روی محیط کشت ایجاد شد. ته چاهک‌ها با همان محیط کشت مذاب بسته شد. ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف تهیه شده از عصاره‌های اتانولی و استونی به طور جداگانه به هر چاهک اضافه شد. در چاهک کنترل مثبت از آنتی‌بیوتیک سفالکسین و سیپروفلوکساسین با غلظت ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر و در چاهک کنترل منفی از محلول ۱۰٪ DMSO استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد اطراف هر چاهک با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شد. در روش میکرودایلوشن، حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌ها تعیین شد. برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از هرکدام از غلظت‌ها به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه ته گرد U شکل درب‌دار استریل اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌ها با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند به هر چاهک اضافه شد. در چاهک کنترل مثبت ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی باکتری به همراه ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت Muellr Hinton Broth و در چاهک کنترل منفی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت Muellr Hinton Broth استریل وارد گردید. میزان جذب نوری چاهک‌های میکروپلیت در دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شد و پس از آن جذب نوری در همان طول موج خوانده شد. از مقایسه میزان جذب نوری قبل و بعد از انکوباسیون در هر یک از چاهک‌ها، با درنظر گرفتن میزان رقیق شدن عصاره به وسیله کشت باکتری در چاهک، کمترین غلظت از عصاره مورد آزمایش که در چاهک مربوط به آن کدورتی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت مهار کنندگی رشد (MIC) در نظر گرفته شد. به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)، از چاهک‌های MIC و سه غلظت بیشتر که فاقد کدورت قابل تشخیص

www.SID.ir

Archive of SID

بودند به وسیله سواب استریل بر روی محیط کشت Muellr Hinton Aga به صورت خطی کشت داده شد و پس از طی ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C، غلظتی از عصاره مورد آزمایش که بر روی محیط کشت جامد مربوط به آن هیچ گونه رشدی از باکتری های‌مورد آزمایش مشاهده نشد به عنوان MBC در نظر گرفته شد. به منظور تأیید نتایج، آزمایشات برای هر نمونه ۳ بار تکرار شد و میانگین تکرارها ثبت گردید (Kognou et al., 2011). محاسبه و مقایسه میانگین ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ و روش آماری کروسکال والیس انجام شد.

نتایج

نتایج مثبت آزمون‌های بیوشیمیایی هیدرولیز هیپورات سدیم، بتا همولیز و آزمایشCAMP و نتایج منفی آزمون-های هیدرولیز اسکولین، کاتالاز، اوره، حرکت و تولید H_2S منجر به شناسایی *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* شد. آزمون‌های بیوشیمیایی موجب شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* با نتایج اکسیداز و حرکت منفی، کاتالاز، کواگولاز، فسفاتاز، احیای نیترات، تخمیر مانیتول و DNase مثبت، همولیز بتا و حساسیت به دیسک نووبیوسین شد. گونه *کورینه باکتریوم* بر اساس نتایج منفی آزمون‌های هیدرولیز بایل اسکولین، هیدرولیز اوره، تولید H_2S، حرکت، تخمیر گلوکز، مالتوز و ساکارز و نتیجه مثبت آزمون کاتالاز شناسایی شد. شناسایی گونه *لیستریا بر اساس* نتایج مثبت آزمون‌های کاتالاز، هیدرولیز اسکولین، حرکت، تخمیر گلوکز و مالتوز و منفی تولید H_2S، تخمیر لاکتوز، تخمیر فروکتوز و ساکاروز انجام شد. هم‌چنین بر اساس آزمون O/F اکسیداتیو، نتایج منفی آزمون‌های ایندول، متیل رد، وژ پرسکوئر، اورنیتین دکربوکسیلاز و لیزین دکربوکسیلاز و نتایج مثبت آزمون‌های اکسیداز، هیدرولیز اوره، تولید H_2S، مصرف سیترات، حرکت و آرژنین دهیدرولاز و قابلیت رشد در دمای ۴۲°C گونه *سودوموناس ائروژینوزا* شناسایی شد. شناسایی *اشرشیا کلای* بر اساس نتایج مثبت آزمون‌های بیوشیمیایی ایندول، متیل رد، اکسیداز، کاتالاز، حرکت، تخمیر گلوکز، لاکتوز و سوربیتول و نتایج منفی آزمون‌های وژ پرسکوئر، هیدرولیز اوره، تولید H_2S، مصرف سیترات و تخمیر گزیلوز انجام شد.

فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها

هر چهار عصاره بر باکتری‌های گرم مثبت مؤثر بودند اما تأثیری بر رشد باکتری‌های گرم منفی نداشتند. نتایج میانگین هاله های عدم رشد *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* در جدول ۱ نشان می دهد که عصاره های بره موم در غلظت های پایین تر از ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر بر روی این باکتری تأثیری ندارند؛ درحالی که عصاره های گرده گل در غلظت های ۲۵ و ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر با اختلاف معنی دار ($p<۰/۰۵$) نسبت به عصاره های بره موم بر روی این باکتری مؤثر هستند. هم‌چنین عصاره استونی و اتانولی گرده‌گل با غلظت ۸۰۰ میلی گرم در میلی لیتر بالاترین تأثیر را بر این باکتری نسبت به سایر عصاره ها و غلظت های مؤثر دارند (OR برابر با ۱/۴ تا ۵). مقایسه میانگین هاله‌های عدم رشد *استافیلوکوکوس آرئوس* (جدول ۲) نشان می دهد که عصاره‌های گرده گل بر این باکتری تأثیری ندارند و عصاره‌های بره موم در غلظت های بالاتر از ۲۵ (عصاره استونی) و بالاتر از ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر (عصاره اتانولی) با اختلاف معنی دار ($p<۰/۰۵$) نسبت به عصاره‌های گرده گل، بر روی این باکتری مؤثر هستند. عصاره‌های اتانولی بره موم با غلظت ۸۰۰ میلی گرم در میلی لیتر بالاترین تأثیر را بر این باکتری نسبت به سایر عصاره‌ها و غلظت ها دارد (OR برابر با ۲/۱ تا ۴/۵).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- میانگین قطر هاله عدم رشد تحت تأثیر عصاره‌های مختلف بر روی *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*

غلظت (mg/ml)	*استرپتوکوکوس آگلاکتیه*			
	استونی بره‌موم (mm)	اتانولی بره‌موم (mm)	استونی گرده‌گل (mm)	اتانولی گرده‌گل (mm)
۱۲/۵	۰ ±۰/۰۰	۰ ±۰/۰۰	۱ ±۹	۰ ±۰/۰۰
۲۵	۵ ±۰۰/۵	۰ ±۰/۰۰	۱/۲۳ ±۵۰/۱۱	۱ ±۱۰
۵۰	۶ ±۰۰/۶	۰ ±۰/۰۰	۱/۲۳ ±۵۰/۱۲	۰/۵ ±۵۰/۱۱
۱۰۰	۰/۵ ±۵۰/۱۱	۰/۵ ±۵۰/۱۱	۳/۵۴ ±۵۰/۱۳	۱ ±۰۰/۱۲
۲۰۰	۰ ±۰۰/۱۳	۰ ±۰۰/۱۳	۳/۵۴ ±۵۰/۱۵	۰ ±۰۰/۱۳
۴۰۰	۰/۵ ±۵۰/۱۵	۰/۵ ±۵۰/۱۵	۱/۲۳ ±۵۰/۱۷	۰/۵ ±۵۰/۱۴
۸۰۰	۲ ±۱۹	۲ ±۰۰۰/۱۹	۲ ±۰۰/۲۰	۱/۲۳ ±۰۰۰/۲۰

جدول ۲- میانگین قطر هاله عدم رشد تحت تأثیر عصاره‌های مختلف بر روی *استافیلوکوکوس آرئوس*

غلظت (mg/ml)	استونی بره‌موم (mm)	اتانولی بره‌موم (mm)	استونی گرده‌گل (mm)	اتانولی گرده‌گل (mm)
۱۲/۵	۰/۰۰ ±۰	۰/۰۰ ±۰	۰/۰۰ ±۰	۰/۰۰ ±۰
۲۵	۸/۵۰ ±۰/۵	۰/۰۰ ±۰	۰/۰۰ ±۰	۰/۰۰ ±۰
۵۰	۱۰/۵۰ ±۰/۵	۸/۰۰ ±۱	۰/۰۰ ±۰	۰/۰۰ ±۰
۱۰۰	۱۴/۰۰ ±۱	۱۱/۵۰ ±۱/۲۳	۰/۰۰ ±۰	۰/۰۰ ±۰
۲۰۰	۱۵/۰۰ ±۱	۱۳/۰۰ ±۲	۰/۰۰ ±۰	۰/۰۰ ±۰
۴۰۰	۱۵/۵۰ ±۰/۵	۱۷/۵۰ ±۷/۷۸	۰/۰۰ ±۰	۰/۰۰ ±۰
۸۰۰	۱۹/۵۰ ±۱/۲۳	۲۰/۰۰ ±۲	۰/۰۰ ±۰	۰/۰۰ ±۰

نتایج ارائه شده در جدول ۳ نشان می دهد که عصاره اتانولی های گرده گل در همه غلظت‌ها و عصاره‌های بره موم در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ (عصاره استونی) و ۲۰۰ میلی گرم در میلی لیتر (عصاره اتانولی) بر روی *کورینه باکتریوم* مؤثر هستند؛ در حالی که عصاره استونی گرده گل هیچ تأثیری بر این باکتری ندارد ($p<0/05$). عصاره‌های اتانولی گرده گل با غلظت ۸۰۰ میلی گرم در میلی لیتر بالاترین تأثیر را بر این باکتری نسبت به سایر عصاره‌ها و غلظت‌ها دارد (OR برابر با ۲/۴ تا ۴/۷).

جدول ۳- میانگین قطر هاله عدم رشد تحت تأثیر عصاره‌های مختلف بر روی *کورینه باکتریوم*

غلظت (mg/ml)	استونی بره‌موم (mm)	اتانولی بره‌موم (mm)	استونی گرده‌گل (mm)	اتانولی گرده‌گل (mm)
۱۲/۵	۰/۰۰ ±۰	۰/۰۰ ±۰	۰/۰۰ ±۰	۹/۰۰ ±۱
۲۵	۰/۰۰ ±۰	۰/۰۰ ±۰	۰/۰۰ ±۰	۱۱/۰۰ ±۱
۵۰	۰/۰۰ ±۰	۰/۰۰ ±۰	۰/۰۰ ±۰	۱۲/۵۰ ±۰/۵
۱۰۰	۱۰/۰۰ ±۱	۰/۰۰ ±۰	۰/۰۰ ±۰	۱۵/۰۰ ±۱
۲۰۰	۱۲/۵۰ ±۰/۵	۱۱/۵۰ ±۰/۵	۰/۰۰ ±۰	۱۸/۰۰ ±۱
۴۰۰	۱۶/۰۰ ±۱	۱۶/۰۰ ±۱	۰/۰۰ ±۰	۱۹/۵۰ ±۱/۲۳
۸۰۰	۱۸/۵۰ ±۱/۲۳	۱۹/۵۰ ±۰/۵	۰/۰۰ ±۰	۲۰/۵۰ ±۱/۲۳

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه میانگین هاله‌های عدم رشد *لیستریا* (جدول ۴) نشان می دهد که همه عصاره‌ها بر روی این باکتری تأثیر دارند. پایین ترین غلظت مؤثر برای عصاره استونی بره موم (۱۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر) مشاهده می شود ($p<۰/۰۵$) و پس از آن عصاره اتانولی بره موم با غلظت حداقل ۵۰ و عصاره های استونی و اتانولی گرده گل با غلظت حداقل ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر بر روی این باکتری مؤثر هستند. عصاره‌های اتانولی بره موم با غلظت ۸۰۰ میلی گرم در میلی لیتر بالاترین تأثیر را بر این باکتری نسبت به سایر عصاره‌ها و غلظت‌ها دارد (OR برابر با ۱/۷ تا ۵/۳).

جدول ۴- میانگین قطر هاله عدم رشد تحت تأثیر عصاره‌های مختلف بر روی *لیستریا*

غلظت (mg/ml)	استونی بره‌موم (mm)	اتانولی بره‌موم (mm)	استونی گرده‌گل (mm)	اتانولی گرده‌گل (mm)
۱۲/۵	۱۱/۰۰ ±۱	۰/۰۰ ±۰	۰/۰۰ ±۰	۰/۰۰ ±۰
۲۵	۱۳/۰۰ ±۰	۰/۰۰ ±۰	۰/۰۰ ±۰	۰/۰۰ ±۰
۵۰	۱۴/۵۰ ±۰/۵	۱۱/۰۰ ±۱	۰/۰۰ ±۰	۰/۰۰ ±۰
۱۰۰	۱۷/۵۰ ±۳/۵۴	۱۷/۵۰ ±۳/۵۴	۱۰/۰۰ ±۱	۱۳/۰۰ ±۱
۲۰۰	۲۳/۰۰ ±۲	۲۳/۵۰ ±۱/۲۳	۱۶/۵۰ ±۱/۲۳	۲۲/۰۰ ±۰
۴۰۰	۲۶/۰۰ ±۲	۲۶/۵۰ ±۳/۵۴	۲۱/۵۰ ±۰/۵	۲۳/۵۰ ±۱
۸۰۰	۲۷/۰۰ ±۳	۲۷/۵۰ ±۳/۵	۲۴/۰۰ ±۰/۵	۲۵/۰۰ ±۱/۲۳

نتایج به دست آمده از تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی انواع عصاره‌ها بر روی باکتری‌های مورد بررسی نشان داد عصاره استونی گرده‌گل با MIC=۱۲/۵ mg/ml بیشترین تأثیر را روی *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* ($p<۰/۰۱$) و عصاره اتانولی گرده‌گل با غلظت MIC=۱۲/۵ mg/ml بیشترین تأثیر را روی بیشترین تأثیر را روی گونه‌های *کورینه باکتریوم* داشت ($p<۰/۰۰۸$). هم‌چنین عصاره استونی بره موم با MIC=۲۵ mg/m بیشترین تأثیر را یر روی *استافیلوکوکوس آرئوس* ($p<۰/۰۵$) و همین عصاره با MIC=۱۲/۵mg/ml بیشترین تأثیر را روی گونه های *لیستریا* داشت ($p<۰/۰۴$). چهار عصاره بر باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشریشیا کلای* مؤثر نبودند. نتایج MBC مؤید نتایج به دست آمده از MIC برای همه نمونه‌ها بود.

بحث

بره‌موم زنبور عسل یک محصول با طیف گسترده خواص بیولوژیکی و محتوای بیوفلاونوئیدی است که دارای قدرت بسیار بالای آنتی‌اکسیدان، ضد باکتری، ضد قارچ، ضد ویروس و ضد التهاب است و هم‌چنین موجب تقویت سیستم ایمنی می‌شود. دیگر خواص بره‌موم شامل بی حس کنندگی موضعی، کاهش اسپاسم، درمان زخم معده و تقویت مویرگ می‌باشد (Moosavi et al., 2010; Mello et al., 2012; Kiaii et al., 2008) بره موم از تقسیم سلولی باکتری‌ها ممانعت به عمل آورده، باعث تشکیل توده های چندسلولی کاذب از آنها می گردد. از سوی دیگر بره موم باعث ایجاد تغییر در ماهیت ساختمان غشای سیتوپلاسمی و دیواره سلول باکتری می شود و همچنین با لیز نسبی باکتری، از سنتز پروتئین و فعالیت آنزیم‌هایی مانند گلوکزیل ترانسفراز نیز ممانعت به عمل می آورد (Park et al., 1998) در رابطه با مکانیسم اثر ضد باکتریایی گرده گل ممانعت از فعالیت آنزیم‌هایی مانند RNA پلی مراز وابسته به DNA گزارش شده است (Moradi, 2006). در مطالعه حاضر جدایه‌هایی از *استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس آگالاکتیه، سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیا کلای کورینه باکتریوم و لیستریا* از عفونت پستان گاو در نمونه‌های گرفته

www.SID.ir

Archive of SID

شده از گاوداری‌های شهر اصفهان در سال ۱۳۹۴ جداسازی شد. بسیاری از پاتوژن‌های مولد ورم پستان به طور مسری وجود دارند که متداول‌ترین آنها *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* است. دو باکتری فوق از نمونه‌های شیر تحت بالینی ورم پستان گاو نیز جدا شده اند (Ali et al., 2011). لاپورت و همکاران (2012) چندین باکتری گرم مثبت و گرم منفی ایجاد کننده ورم پستان را مشخص کردند، از آن جمله می‌توان به *استافیلوکوکوس آرئوس*، *اشرشیا کلای*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و *استرپتوکوکوس دیس آگالاکتیه* اشاره کرد (Laport et al., 2011). در مطالعه حاضر گونه-های *کورینه باکتریوم* و *لیستریا* نیز جداسازی گردید. در مطالعه ای در گاوداری‌های مکزیک، به کمک روش‌های مولکولی باکتری‌های ایجاد کننده ورم پستان تشخیص داده شدند. باکتری‌های جدا شده شامل *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی، *استافیلوکوکوس آرئوس*، *استرپتوکوکوس یوبریس*[1]، *استافیلوکوکوس آگنتیس*[2]، *کورینه‌باکتریوم استشنیس*[3] و *براکی‌باکتریوم کونگلومراتیوم*[4] بود (León-Galván et al., 2015). منبع معمول پاتوژن‌های مسری غدد آلوده گاو در گله است. با این حال، دست‌های کارگر شیردوش می‌تواند به عنوان یک منبعی از *استافیلوکوکوس آرئوس* عمل کند (Ali et al., 2011). باکتری‌هایی که در بررسی حاضر جداسازی و شناسایی شدند از جمله انواع اصلی مولد التهاب در پستان گاو می‌باشند. نتایج تأثیر ترکیبات کندوی زنبور عسل (برەموم و گرده‌گل) بر روی باکتری‌های پاتوژن جداسازی شده از ورم پستان نشان داد که عصاره‌های استونی بیشترین تأثیر را نسبت به سایر عصاره‌ها بر باکتری-های جداسازی شده دارند. عصاره استونی برەموم بیشترین تأثیر را روی *لیستریا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* داشت. عصاره استونی گرده‌گل بیشترین تأثیر را روی *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* داشت و عصاره اتانولی گرده‌گل بیشترین تأثیر را روی گونه *کورینه باکتریوم* داشت. چهار عصاره مورد بررسی بر باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشریشیا کلای* مؤثر نبودند. در مطالعه رحمان و همکاران (2010) غلظت‌های ۲/۷۴ و ۵/۴۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی برەموم بر روی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس آرئوس* و گرم منفی *اشریشیا کلای* به روش *چاهک پلیت* بررسی شد. عصاره اتانولی برەموم فعالیت ضد باکتری قوی‌تری بر روی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس آرئوس* نسبت به باکتری گرم منفی *اشریشیا کلای* داشت. باکتری‌های گرم مثبت جدا شده در تحقیق حاضر، به خصوص گونه‌های *لیستریا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز به برەموم حساسیت بالایی نشان دادند و این حساسیت نسبت به عصاره استونی بیشتر بود (Rahman et al., 2010). سیلیسی و کاتلوکا (2005) فعالیت ضد میکروبی برەموم سه نژادهای مختلف زنبور عسل را بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلای*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *کاندیدا آلبیکنس* بررسی کردند که به این نتیجه رسیدند که عصاره اتانولی برەموم اثر ضد باکتریای قوی بر علیه کوکسی‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس آرئوس*) و اثر ضعیف‌تری بر روی باکتری‌های گرم منفی (*اشریشیا کلای* ، *سودوموناس آئروژینوزا*) و مخمر (*کاندیدا آلبیکنس*) دارد (Silici and Kutluca, 2005; Santana et al., 2012). اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی برەموم را بر روی *استافیلوکوکوس آرئوس* عامل ورم پستان گاو بررسی کردند و حاصل این یافته این بود که عصاره اتانولی برەموم اثر مهاری بر روی این باکتری داشت (Santana et al., 2012). انزابی و شقاقی (2015) به بررسی اثر ضد میکروبی عصاره الکلی برەموم بر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*، *استرپتوکوکوس دیس آگالاکتیه*،

1. *Streptococcus uberis*
2. *Staphylococcus agnetis*
3. *corynebacterium stationis*
4. *Brachybacterium conglomeratum*

www.SID.ir

Archive of SID

اشرشیا کلای، *کلبسیلا نومونیه* و *انتروباکتر آئروژنز* جدا شده از گاوهای دارای ورم پستان پرداختند که در این بین عصاره الکلی بره‌موم بیشترین تاثیر را بر روی باکتری‌های *اشریشیا کلای* و *کلبسیلا نومونیه* داشت (Enzabi and Shaghaghi, 2012). فعالیت ضد باکتری بره‌موم مربوط به ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، اسیدهای فنلی و استرهای آن است اما فعالیت نمونه‌های بره‌موم جمع‌آوری شده از مناطق مختلف بستگی به شرایط آب و هوایی منطقه دارد(Seidel et al., 2008). آبودا و همکاران (2011) فعالیت ضد باکتریایی گرده‌گل را بر اساس روش انتشار چاهک بر روی باکتری‌های پاتوژن انسانی *استافیلوکوکوس آرئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* مورد بررسی قرار دادند. عصاره اتانولی گرده‌گل اثر مهاری بر روی رشد هر سه باکتری داشت و باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری-های گرم منفی حساس‌تر بودند (Abouda et al., 2011). هم‌چنین، در مطالعه گرایکو و همکاران (2011) اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی، متانولی و دی کلرومتان گرده‌گل یونان بر روی باکتری گرم منفی و گرم مثبت و هم‌چنین قارچ‌های بیماری‌زای انسان مقایسه شد. هر سه عصاره آبی، متانولی و دی کلرومتان گرده‌گل فعالیت ضد باکتریایی قوی علیه باکتری‌های گرم مثبت نشان دادند اما عصاره دی کلرومتان گرده‌گل تأثیری بر کاندیداهای پاتوژن انسانی نداشت و عصاره متانولی گرده‌گل فعالیت ضعیفی بر علیه باکتری‌های گرم منفی نشان داد (Graikou et al., 2012). در پژوهش حاضرنشان داده شد که عصاره اتانولی گرده‌گل قادر به مهار رشد انواع باکتری‌های مورد آزمایش به جز *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. با توجه به نتایج به دست آمده از سایر مطالعاتی که در بالا به آنها اشاره شد و نتایج تحقیق حاضر و هم‌چنین به دلیل سهولت استخراج با اتانول و اثر ضد باکتری بالقوه آن، عصاره اتانولی گرده‌گل به عنوان جایگزین مناسبی برای عصاره متانولی یا دی کلرومتان پیشنهاد می‌شود. همان طور که پژوهشگران در تحقیقات بالا بیان کردند، تأثیر عصاره اتانولی بره موم بر علیه باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی می باشد. نتایج پژوهش حاضر نیز با این نتیجه مطابقت دارد. تفاوت در اثر عصاره‌ها بر روی رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌تواند بازتابی از تفاوت در ساختار دیواره سلولی آن‌ها باشد. باکتری‌های گرم منفی دارای دیواره خارجی لیپوپلی ساکاریدی با ساختار آب دوست هستند که به دلیل حضور پروتئین‌های پورین فراوان، مواد محلول کوچک را به راحتی عبور می‌دهد اما به عنوان سدی در مقابل ترکیبات آبگریز و درشت مولکول مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و شوینده‌ها عمل می‌کند. از آن جایی که اکثر ترکیبات موجود در عصاره‌ها آبگریز هستند، به راحتی قادر به عبور از دیواره این باکتری‌ها نمی‌باشند (Sefidkon et al., 2013) و دلیل مقاومت باکتری‌های گرم منفی در تحقیق حاضر نیز می تواند همین موضوع باشد. این بررسی ادامه تحقیقات انجام شده بر روی عصاره فرآورده‌های کندو می‌باشد. به طوری که در آزمایش اثر ضد باکتریایی عصاره‌های بره‌موم، ژل‌رویال و گرده‌گل بر روی سویه‌های باکتریایی بیماری‌زای آبزیان چنین نتیجه‌گیری شد که عصاره‌های مورد استفاده بر باکتری گرم مثبت، *استرپتوکوکوس اینیایی* تأثیر ضد باکتریایی بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی *آئروموناس هیدروفیلا* و *ویبریو کلرا* داشتند، هم‌چنین باکتری گرم منفی *آئروموناس هیدروفیلا* نسبت به باکتری گرم منفی *ویبریو کلرا* حساس تر بود (Salimi et al., 2013). هم‌چنین استفاده از عصاره اتانولی بره‌موم با غلظت ۲۵ mg/ml موجب پیشگیری از عفونت ناشی از *استرپتوکوکوس اینیایی* در بچه ماهی‌های قزل آلای در تماس با باکتری گردید و علاوه بر آن شاخص های رشدی بچه ماهی‌ها نیز تقویت شد (Naghavi et al., 2014). در تحقیق دیگر، عصاره اتانولی بره‌موم با غلظت ۰/۲ mg/ml

www.SID.ir

Archive of SID

موجب پیشگیری از عفونت ماهیان زینتی گوپی در مقابل عفونت ناشی از انگل *چیلودونلا* گردید که از انواع ماهیان زینتی در اصفهان جدا شده بود (Salemi et al., 2015). با توجه به معضل بیماری ورم پستان گاو به عنوان یکی از شایع ترین مشکلات دامداری‌های اصفهان، نتایج بررسی حاضر و سوابق تحقیقاتی قبلی پیشنهاد کننده روش درمانی بی خطر و مناسب برای درمان این بیماری و بیماری‌های عفونی دیگر در دام و حیوانات پرورشی است.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به علت در اختیار قرار دادن تجهیزات آزمایشگاهی و از شرکت شیر و گوشت فکا در اصفهان که برای تهیه نمونه ها همکاری نمودند تشکر می نماییم.

منابع

1. Abouda, Z., Zerdani, I., Kalalou, I., Faid, M., and Ahami M.T. 2011. The antibacterial activity of Moroccan bee bread and bee pollen (fresh and dried) against pathogenic bacteria. Res J Microbiol. 6: 376-384.
2. Albert, S., Bhattacharya, D., Klaudiny, J., Schmitzová, J., and Simúth, J. 1999. The family of major royal jelly proteins and its evolution. J Mol Evol. 49: 290-97.
3. Ali, M.A., Ahmad, M.D., Muhammad, K., and Anjum, A.A. 2011. Prevalence of sub-clinical mastitis in dairy buffaloes of Punjab, Pakistan. The JAPS. 21: 477-480.
4. Brooks, G.F., Butel, J.S., and Morse, S.A. 2010. Jawets Melnick and Adelbergs medical microbiology, McGraw Hill companies, New York, USA.
5. Dagostin, S., Formolo, T., Giovannini, O., and Pertot, I. 2010. *Salvia officinalis* extract can protect grapevine against *Plasmopara viticola.* Plant Dis. 94: 575-580.
6. Enzabi, Y., and Shaghaghi, S. 2015. The antibacterial properties of propolis alcoholic extract on bovine mastitis isolates in vitro. Vet Clin Path. 34: 117-129.
7. Graikou, K., Kapeta, S., Aligiannis, N., Sotiroudis, G., Chondrogianni, N., Gonos, E., and Chinou, I. 2011. Chemical analysis of Greek pollen-Antioxidant, Antimicrobial and proteasome activation properties. Chem Cent J. 5:33.
8. Kiaii, S.M.M., Mansoori, B., Modirsanei, M., Bozorgmehrifard, M.H., Gholamian, B., Langhroodi, A.G., and Rabbani, M. 2008. Comparison of the effect of propolis and virginiamycin on production performance and immunostimulant in broiler chicks. J Vet Res. 62: 367-372.
9. Kognou, A.L.M., Ngane, R.A.N., Kuiate, J.R., Mogtomo, M.L.K., Tiabou, A.T., Mouokeu, R.S., Biyiti, L., and Zollo, P.H.A. 2011. Antibacterial and antioxidant properties of the methanolic extract of the stem bark of *Pteleopsis hylodendron* (Combretaceae). Chemother Res Pract. 10: 1-7.
10. Laport, M.S., Marinho, P.R., Santos, O.C., de Almeida, P., Romanos, M.T., Muricy, G., Brito, M.A., and Giambiagi-deMarval, M. 2012. Antimicrobial activity of marine sponges against coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis. Vet Microbiol. 155: 362–368.
11. León-Galván, M.F., Barboza-Corona, J.E., Lechuga-Arana, A.A., Valencia-

www.SID.ir

Archive of SID

17. Ownagh, A., Tukmechi, A., Adibhesam, M., and Ebrahimzadeh, S. 2010. Comprative study on the effect of ethanol extract of propolis collected from west Azarbaijan apiaries against dermatophytes and non-dermatophytes fungi. Urmia Med J. 21: 206-214.
18. Park, Y.K., Koo, M.H., Abreu, J.A., Ikegaki, M., Cury, J.A., and Rosalen, P.L. 1998. Antimicrobial activioty of propolis on oral microorganisms. Curr Microbiol. 36: 24-28.
19. Rahman, M.M., Richardson, A., and Azirun, M.S. 2010. Anti-bacterial activity of propolis and honey against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Afr J Microbiol Res. 4: 1872-1878.
20. Saleki, K., and Moradi, H. 2013. Bacterial agents of mastitis in dairy cow farms in Ilam city. J. Ilam Univ Med Sci. 20: 88-95.
21. Salemi, S., Naghavi, N.S., and Abedi, S. 2015. Detection of *Chilodonella* as the predominant skin parasite infecting *Poecilia reticulate* (guppy) in Iran, 2014 and a biological control approach for infection in laboratory scale. Ind J Fund Appl Life Sci. 5: 62-67.
22. Salimi, S., Naghavi, N.S., and Karbasizadeh, V. 2013. Propolis, royal jelly and pollen from beehive have antibacterial effect on aquatic pathogenic bacterial isolates. Int. J. Mol. Clin. Microbiol. 1: 218-224.
23. Santana, H.F., Barbosa, A.A., Ferreira, S.O., and Mantovani, H.C. 2012. Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. Posadas, M., Aguayo, D.D., Cedillo-Pelaez, C., Martínez-Ortega, E.A., and Gutierrez-Chavez A.J. 2015. Molecular detection and sensitivity to antibiotics and bacteriocins of pathogens isolated from bovine mastitis in family dairy herds of central Mexico. Biomed Res Int. 15: 1-9.
12. Maruyama, H., Sakamoto, T., Araki, Y., and Hara, H. 2010. Anti-inflammatory effect of bee pollen ethanol extract from *cistus* sp. of Spanish on carrageenan-induced rat hind paw edema. BMC Complemt Altern Med. 10: 30.
13. Mello, B.C.B.S., and Hubinger, M.D. 2012. Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian greenpropolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. Int J FOOD Sci Tech. 47: 2510–2518.
14. Moosavi, S.F., Lotfolahian, H., Kasmani F.B, Mahdizadeh, S.M., Roodsari, M.H., and Abolghasemi, S.A. 2010. Effects of different levels of oil-extracted propolis on immune system of broiler chiks against newcastle virus. J Vet Res. 65: 19-23.
15. Moradi M. 2006. Antibacterial effect of ethanol extract of honeybee propolis on the *Paenibacillus larvae* (causative agent of honeybee American foulbrood disease). Vet J. 83: 57-62 (In Persian).
16. Naghavi, N.S., Zeyghampoor, F., Nazari, A., and Shams, E. 2014. Infectivity control of *Streptococcus iniae* isolated and detected from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran, by beehive propolis ethanol extract. Ind J Fund Appl Life Sci. 4: 563-569.

www.SID.ir

Archive of SID

World J Microbiol Biotechnol. 28: 485-491.

24. Sefidkon, F., Torabi Sagvand, B., Naderi, M., and Ghooshegir, S.A. 2013. Comparison of anticancer effects of nanocapsules of Nasturtium officinalis (L.) R. Br. extract with methanolic extract and its fractions. Iran J Med Arom Plan. 29: 35-50 (In Persian).
25. Seidel, V., Peyfoon, E., Watson, D.G., and Fearnley, J. 2008. Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones. Phytother Res. 22: 1256-63.
26. Silici, S., and Kutluca, S. 2005. Chemical composition and antibacterial activity of propolis hnopharmacol. 99: 69–73.
27. Tadhani, M.B., and Subhash, R. 2006. In vitro antimicrobial activity of *Stevia rebaudiana bertoni* leaves. Trop J Pharm Res. 5: 557-560.
28. Yang, F., Li, X.S., Yang, B.Z., Zhang, Y., Zhang, X.F., Qin, G.S., and Liang, X.W. 2012. Clinical mastitis from calving to next conception negatively affected reproductive performance of dairy cows in Nanning, China. Afr J Biotech. 11: 2574-2580.

www.SID.ir

Archive of SID

Bacteriologic investigation of bovine mastitis in Isfahan livestocks and the effect of beehive Propolis and Pollen extracts on the isolated bacteria

Akafzadeh N[1], Naghavi NS[2*], Majlesi M[3]

1. Graduated of Microbiology, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

2. Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

3. Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

[*]**Corresponding author**: *naghavi@iaufala.ac.ir*

Accepted: 12 September 2017 Received: 22 April 2017

Abstract

Mastitis is inflammation which causes physical and chemical changes in milk and pathological changes in mammary gland. The aims of present study were identification of bovine mastitis causative agents in Isfahan and survey of bee Propolis and Pollen antibacterial effect on the isolated bacteria. Milk samples were aseptically obtained from 10 mastitic cattle. The isolated bacteria were detected based on macroscopic, microscopic and biochemical characteristics. Ethanol and acetone extracts were prepared from Propolis and Pollen by soaking and the antibacterial effects of them determined using well plate and microdilution methods. The isolated bacteria included *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* sp., *Listeria* sp., *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. Well plate method showed that Propolis and Polen extracts were effective on Gram-positive bacteria but had no effect on Gram-negative ones. The mean of results showed maximum effects of Pollen acetone extract on *Streptococcus agalactiae* (concentration of 12.5 mg/ml) and Pollen ethanol extract on *Corynebacterium* (concentration of 12.5 mg/ml). Acetone extract of Propolis showed maximum effect on *Staphylococcus aureus* (concentration of 25 mg/ml) and *Listeria* sp. (concentration of 12.5 mg/ml). The results were confirmed by minimum bactericidal concentration analysis. Extracts of propolis and pollen showed powerful effects on Gram-positive isolates and this effect was more detected by acetone extracts.

Keywords: Bovine mastitis, Antibacterial effect, Propolis, Pollen.

www.SID.ir