Evaluation of antibacterial properties of alcohol and water extracts of propolis on *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas syringae* and *Serratia plymuthica*

Etminani F., MSc[1], Etminani A., MSc[2], Darvishi Sh., PhD[3]
1. Young researchers and Elite Club, Sanandaj branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran (Corresponding Author), Tel:+98-87-33241173, Faegheh.Etminani@yahoo.com
2. Young researchers and Elite Club, Sanandaj branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran,
3. Associate Professor, Department of Food Science &Technology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

[DOI: 10.22102/22.4.57]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 8:46 +0330 on Sunday December 23rd 2018

ABSTRACT

Background and Aim: Propolis is one of the most important bee products which has antibacterial property. This study was conducted to investigate antibacterial activity of propolis on *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas syringae* and *Serratia plymuthica*.

Material and Method: After propolis collection from different parts of Kurdistan Province and preparation of its alcohol and water extracts, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) for bacterial strains were determined. Data analysis was carried out by use of SPSS software. To compare mean values we used Duncan test at the significance level of 5%.

Results: Use of alcoholic solvent (96% ethanol and dimethyl sulfoxide) resulted in a greater mean diameter of growth inhibitory zone in comparison to water extract solvent ($p<0.05$). Inhibitory concentrations (MICs) of alcoholic extract of propolis for *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas syringae* and *Serratia plymuthica* were 0.328, 0.656 and 1.31 mg/ml and The MBCs, were 0.328, 0.656 and 1.31 mg/ml respectively. The MICs of dimethyl sulfoxide extract for *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas syringae* and *Serratia plymuthica* were 0.656, 1.31 and 1.31 mg/ml and its MBCs for the above mentioned bacteria were 0.656, 1.31 and 1.31 mg/ml respectively. MICs of water extract of propolis for *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas syringae* and *Serratia plymuthica* were 1.31, 2.62 and 2.62 and its MBCs for these bacteria were 2.62, 5.25 and 5.25 respectively.

Conclusion: According to the results, alcohol and water extracts of propolis showed significant effects against *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas syringae* and *Serratia plymuthica* in laboratory condition.

Keywords: *Bacillus,*Proplois, *Serratia*, *Pseudomonas.*
Received: Nov 21, 2016 **Accepted:** Jun 14, 2017

Archive of SID
www.SID.ir

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و دوم / مهر و آبان ۱۳۹۶ /۶۷-۵۷

[DOI: 10.22102/22.4.57]

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 8:46 +0330 on Sunday December 23rd 2018

اثر عصاره اتانولی و آبی پروپولیس استان کردستان بر باکتری باسیلوس پومیلوس، سودوموناس سرینگه و سراشیا پلیموتیکا

فایقه اطمینانی[۱]، ادیبه اطمینانی[۲]، شعله درویشی[۳]

۱. عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، سنندج، ایران (مولف مسوول)، تلفن ثابت:۳۳۲۴۱۱۷۳-۰۸۷،
Faegheh.Etminani@yahoo.com

۲. عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، سنندج، ایران.

۳. دانشیار، گروه علوم صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، سنندج، ایران.

چکیده:

مقدمه:یکی از محصولات مهم کندوهای عسل، پروپولیس است که خاصیت ضد باکتریایی دارد. هدف از این تحقیق، تعیین فعالیت ضد میکروبی عصاره پروپولیس بر روی سویه‌های باکتریایی باسیلوس پومیلوس، سودوموناس سرینگه و سراشیا پلیموتیکادر شرایط آزمایشگاهی است.

روش بررسی: پس از جمع‌آوری پروپولیس از مناطق مختلف استان کردستان و تهیه عصاره‌های الکلی وآبی، حداقل غلظت مهارکنندگی MIC و غلظت کشندگی MBC روی سویه‌های باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت. برای آنالیز آماری، از نرم‌افزار SPSSدر قالب طرح کاملاً تصادفی و برای مقایسه میانگین داده ها از آزمون آماری DUNCANدر سطح احتمال ۵ درصد استفاده گردید.

یافته‌ها:میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره الکلی (با استفاده از دو حلال اتانول ۹۶ درصد و دی متیل سولفواکسید) به صورت معنی داری بیش از عصاره آبی پروپولیس بود (P<۰/۰۵). حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) عصاره الکلی اتانولی پروپولیس برای باکتری باسیلوس پومیلوس ۰/۳۲۸ و برای سراشیا پلیموتیکاو سودوموناس سرینگه به ترتیب ۰/۶۵۶ و ۱/۳۱و همچنین حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره الکلی اتانولی پروپولیس برای باکتری‌های باسیلوس پومیلوس، سراشیا پلیموتیکاو سودوموناس سرینگه به ترتیب۰/۳۲۸، ۰/۶۵۶ و۱/۳۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتربه‌دست آمد. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)عصاره الکلی دی متیل سولفواکسید برای باکتری‌های باسیلوس پومیلوس، سودوموناس سرینگه و سراشیا پلیموتیکابه ترتیب ۰/۶۵۶، ۱/۳۱و ۱/۳۱، همچنین حداقل غلظت کشندگی(MBC)به ترتیب،۰/۶۵۶،۱/۳۱ و ۱/۳۱ تعیین گردید. پس از آن حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)عصاره آبی برای باکتری‌های باسیلوس پومیلوس، سراشیا پلیموتیکاو سودوموناس سرینگه به ترتیب ۱/۳۱، ۲/۶۲ و ۲/۶۲ مشاهده و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره آبی به ترتیب۲/۶۲، ۵/۲۵ و ۵/۲۵ مشخص شد.

نتیجه‌گیری: عصاره الکلی و آبی پروپولیس قادر به کنترل باکتری‌های باسیلوس پومیلوس، سراشیا پلیموتیکاو سودوموناس سرینگه در شرایط آزمایشگاهی بودند.

کلید واژه: باسیلوس، پروپولیس، سراشیا، سودوموناس

وصول مقاله:۹۵/۹/۱ اصلاحیه نهایی:۹۶/۲/۲۳ پذیرش:۹۶/۳/۲۴

Archive of SID

www.SID.ir

[DOI: 10.22102/22.4.57]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 8:46 +0330 on Sunday December 23rd 2018

مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها داروهای مهمی برای مبارزه با عفونت‌های ناشی از باکتری‌ها، قارچ‌ها و برخی انگل‌ها به شمار می‌روند که معمولا موجب کاهش رشد این گروه از میکروارگانیسم‌ها شده و یا در نهایت موجب مرگ آن‌ها می‌گردد (۱). از مدت‌ها پیش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای کنترل این دسته از ریزموجودات به کار رفته و اثرات قابل توجهی داشته است. اما از مشکلات نگران کننده در رابطه با آنتی‌بیوتیک‌ها، مقاومت میکروارگانیسم‌ها به آن است. مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها معمولاً براساس مکانیسم‌هایی نظیر تولید آنزیم‌های تخریب کننده‌ی دارو، تغییر نفوذپذیری باکتری نسبت به دارو، تغییر در گیرنده‌های دارو در سطح سلول باکتری، تغییر در ساختار دیواره‌ی سلولی باکتری و دستیابی به مسیرهای متابولیکی فرعی که جبران کننده‌ی واکنش مهار شده توسط دارو هستند، صورت می‌گیرد که یا به صورت موتاسیون خود به خودی بر روی ژن‌های کنترل کننده‌ی حساسیت باکتری و یا از طریق انتقال پلاسمید،از یک باکتری به باکتری دیگر منتقل می‌شوند (۲).

بنا به دلایل مختلفی نظیر استفاده‌ی گسترده و بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها توسط انسان، فقدان تست‌های تشخیصی سریع جهت تعیین عوامل عفونت واستفاده‌ی نابجا آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان مکمل‌های غذایی یا پروفیلاکسی در صنعت دامپروری (صنعت پرورش آبزیان، دامداری) و یا به منظور کنترل بیماری‌ها در کشاورزی، مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به سرعت گسترش یافته است (۱). درصورت عدم کنترل و گسترش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیک، با افزایش گونه‌های باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و افزایش شکست درمانی در زمینه درمان عفونت با میکروب‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیکی رو به رو می‌شویم که این امر خود منجر به طولانی شدن دوره‌ی بیماری و به موازات آن افزایش احتمال انتقال بیماری به سایر افراد جامعه،افزایش طول مدت زمان بستری در بیمارستان،افزایش نیاز به داروهایی گرانتر و در عین حال با عوارض بیش‌تر برای درمان و افزایش خطر مرگ و میر بیماران می‌گردد (۲).

در این پژوهش، سه باکتری سراشیا[۱] پلیموتیکا، سودوموناس سرینگه[۲]و باسیلوس پومیلوس[۳] مورد بررسی قرار گرفت. سراشیا پلیموتیکا باکتری گرم منفی است که از محیط‌های اکولوژیکی مختلفی از جمله خاک، آب، گیاه، بدن حیوانات و محیط‌های بیمارستانی جداسازی و شناسایی شده است اگر چه این باکتری به عنوان عامل عفونی شدیدی مطرح نیست اما در افرادی که دارای نقص سیستم ایمنی هستند، موجب بروز مشکلات اساسی می‌گردد (۳). باکتری سودوموناس سرینگه، از باکتری‌های گرم منفی محیطی است که به عنوان عامل فساد مواد غذایی، سبزیجات و میوه‌ها موجب خسارات شدیدی می‌گردد (۴). باکتری باسیلوس پومیلوس، یک باکتری گرم مثبت است که از محیط‌های اکولوژیک مختلف از جمله بدن انسان، گیاهان و خاک جداسازی شده است. عامل بیماری در سیستم‌های خونی در افراد بزرگسال و خردسال و بیماری‌های پوستی است. هم‌چنین به عنوان بیمارگر مهم در ایجاد مسمومیت‌های غذایی به شمار می‌رود (۵).

پروپولیس یا بره‌موم یک نوع رزین طبیعی است که توسط زنبورعسل از گیاهان اطراف کندو جمع‌آوری می‌گردد. این ماده به طور طبیعی از ۳۰ درصد موم، ۵۰ درصد صمغ، ۱۰ درصد اسانس‌های ضروری، آروماتیک و مواد معطر گیاهی و ۵ درصد گرده تشکیل شده است (۷ و ۶). ترکیب شیمیایی این ماده بسیار پیچیده است و بیش از ۳۰۰ ترکیب

[۱] *Serratia plymuthica*
[۲] *Pseudomonas syringae*
[۳] *Bacillus pumilus*

Archive of SID
www.SID.ir

[DOI: 10.22102/22.4.57]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 8:46 +0330 on Sunday December 23rd 2018

در نمونه‌های پروپولیس شناسائی شده‌اند که ترکیب آن به منبع گیاهی و فلور محلی بستگی دارد.

پروپولیس دارای اسیدهای آلیفاتیک و آروماتیک، استرها، فلاونوئیدها، قندها، گلیسرول، اسید فسفریک، وانیلین، میریستین، ویتامین‌های تیامین، ریبوفلاوین، نیاسین، پانتوتنیک اسید، پیریدوکسین A، E و C در مقادیر مختلف می‌باشد. هم‌چنین دارای مواد معدنی شامل آهن، منگنز، مس، کلسیم، وانادیوم، آلومینیوم، استرانتیوم، سیلیکون، روی، سدیم، ید و منیزیم است و نیز دارای مقادیر بسیار کم اسیدآمینه از نوع آرژنین و پرولین می‌باشد.

زنبورها از این ترکیب به منظور پر کردن سوراخ‌های کندو، صاف کردن دیواره‌های داخلی کندو، تقویت شانه‌ها و ضدعفونی محیط کندو استفاده می‌کنند به دلیل خاصیت ضدعفونی پروپولیس، از زمان‌های بسیار دور به عنوان یک داروی سنتی در درمان بیماری‌ها استفاده می‌شده است که امروزه خاصیت آنتی‌باکتریال، آنتی‌توموری، آنتی‌اکسیدان، آنتی‌ویروس و خواص ضد التهابی آن به اثبات رسیده است (۱۰-۸).

از آن جا که معمولاً باکتری‌ها با به کارگیری ساز و کارهای مختلف، به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان داده اند، لذا استفاده از ترکیبات طبیعی همانند پروپولیس در کنترل آن‌ها امری ارزشمند به نظر می‌رسد و از طرفی چون ماهیت پروپولیس بسته به محل نمونه‌برداری متفاوت است این پژوهش به بررسی اثر عصاره‌های الکلی و آبی پروپولیس کردستان بر باکتری‌های مذکور پرداخته است.

روش بررسی

این مطالعه، یک مطالعه تجربی-آزمایشگاهی با محتوای کاربردی بود. به منظور آماده‌سازی عصاره پروپولیس، از کندوهای مختلف زنبورعسل در مناطق مختلف استان کردستان (کامیاران، بانه، روستای چناره، دهگلان، سراب قامیش و سروآباد) در اواخر شهریور سال ۱۳۹۵، نمونه‌برداری به عمل آمد. بره‌موم‌ها در داخل فریزر (با دمای ۲۰-درجه سانتی‌گراد) نگه‌داری و به وسیله نیتروژن مایع (دمای ۱۹۶-درجه سانتی‌گراد) تبدیل به پودر گردید و برای عصاره‌گیری مورد استفاده قرار گرفت. تمامی سویه‌های باکتریایی از آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشگاه کردستان تهیه شد.

فعال‌سازی و کشت باکتری‌ها:

برای فعال‌سازی سویه‌های باکتری، از محیط‌کشت‌های نوترینت براث و تریپتون سویا براث استفاده گردید و لوله‌های آزمایش محتوی سوسپانسون باکتری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در گرم‌خانه Memmert نگه‌داری گردیدند. ۲۴ ساعت پس از فعال‌سازی نمونه‌ها، باکتری‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، در زیر هود لامینار، کنار شعله چراغ الکلی و در شرایط استریل با استفاده از لوپ میکروبی بر محیط‌کشت نوترینت آگار به صورت خطی (streak) کشت گردید (۱۱).

تهیه عصاره‌های الکلی و عصاره آبی پروپولیس:

پروپولیس جمع‌آوری شده از کندوهای مختلف در سطح استان کردستان در اواخر شهریور سال ۱۳۹۵ در دمای ۲۰-درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردیدند. برای تهیه پودر آن از نیتروژن مایع کمک گرفته شد. مقدار ۲۰ گرم از پودر با استفاده از ترازوی دیجیتالی BEL با دقت ده هزارم گرم توزین و در ۱۰۰میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد حل گردید.

محلول حاصل در یک ظرف استریل در بسته ریخته شد و در اتاقی تاریک با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای دو هفته نگه‌داری شد. محلول الکل از کاغذ واتمن NO.۴ و پروپولیس از کاغذ واتمن NO.۱ برای تصفیه آن‌ها عبور داده شد. برای تبخیر حلال و تخلیص هرچه بیش‌تر پروپولیس از دستگاه روتاری اواپراتور EV311 Lab

Archive of SID
www.SID.ir

[DOI: 10.22102/22.4.57]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 8:46 +0330 on Sunday December 23rd 2018

Tech با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. عصاره خالص شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگه‌داری شد و برای خشک کردن، به دستگاه فریز درایر مدل CHRIST (ALPHA2-4 LD plus) انتقال داده شد. یک شبانه روز پس از آن، به صورت پودر خشک شده در دمای ۲۰ - درجه سانتی‌گراد در حالی‌که با فویل آلومینیومی پوشانده شده بود، نگه‌داری گردید، این کار برای عصاره آبی به همین صورت انجام گرفت (۱۲).

تعیین قطر هاله عدم رشد:

مطابق با استانداردهای آزمایشگاهی و کلینیکی (CLSI[1]) پروتکل M45-A برای تعیین قطر هاله عدم رشد از روش دیسک دیفیوژن استفاده گردید. در واقع دراین روش، ۵/۲۵ میلی‌گرم از عصاره خشک شده پروپولیس حاصل از حلال الکلی و عصاره آبی، وزن گردید و در ۱ میلی‌لیتر الکل ۹۶ درصد حل گردید. سپس بر روی دستگاه شیکر به مدت ۲ ساعت نگه‌داری شد.

محلول حاصل را از فیلتر میکروبی ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد تا سترون شود. دیسک‌های بلانک سترون را به محلول اضافه گردید و در فور memmert ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای ۲۴ ساعت نگه‌داری گردید تا کاملا خشک شود. بعد از آن از کشت تازه باکتری‌ها، سوسپانسیونی با غلظت نیم‌مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ باکتری در میلی‌لیتر) درمحیط تریپتون سویا براث (اسیدیته ۷/۱+۰/۰۲ Merck) تهیه شد و کاملاً به صورت چمنی در سطح محیط‌کشت مولر هینتون آگار پخش گردید، دیسک بر روی محیط با پنس سترون قرار داده شد.

برای کنترل منفی، دیسک‌های بلانک سترون در اتانول ۹۶ درصد قرار داده شد. برای کنترل مثبت هم از دیسک‌های استاندارد آنتی بیوتیک تتراسایکلین، اریترومایسین، جنتامایسین، نالیدیکسیک اسید، پلی میکسین و کلینداماسین استفاده گردید. و سپس پلیت حاوی باکتری‌ها و دیسک‌ها برای ۲۴ ساعت در گرم‌خانه Memmert، ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

میانگین قطر هاله عدم رشد توسط کولیس برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردید، این آزمون در سه تکرار انجام پذیرفت (۱۲).

تعیین MIC:

به این منظور ۵/۲۵ میلی‌گرم از عصاره الکلی پروپولیس پودر شده را در ۱۰۰۰ میکرولیتر الکل ۹۶ درصد و عصاره آبی پروپولیس قرار داده شد و به مدت ۲ ساعت در دستگاه شیکر گذاشته شد تا کاملاً حل شود. سپس عصاره فراهم شده از فیلتر میکروبی ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد. مطابق دستورالعمل موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران شماره ۵۸۷۵ (نگه‌دارنده‌ها-تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC)) ۱۳ لوله آزمایش برای هر سویه، در فور با دمای ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید تا کاملاً سترون شود. سپس در لوله‌های شماره ۲ تا ۱۰، ۱۰۰۰ میکرولیتر از تریپتون سویا براث (اسیدیته ۷/۱ +۰/۰۲ Merck) توزیع گردید. لوله‌ها در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد ۱۵ دقیقه سترون شدند. سپس درون لوله‌ی شماره ۱، ۱۰۰۰ میکرولیتر از عصاره الکلی خالص ریخته شد و در لوله شماره ۲، ۱۰۰۰ میکرولیتر عصاره خالص اضافه گردید.

بعد از حل شدن کامل از لوله شماره ۲، ۱۰۰۰ میکرولیتر برداشته و به لوله شماره ۳ منتقل گردید تا رقت ۱:۴ حاصل گردد. این کار تا لوله شماره ۱۰ تکرار گردید. در نهایت از لوله شماره ۱۰، ۱۰۰۰ میکرولیتر بیرون ریخته شد تا حجم تمام لوله‌ها مشابه باشد. در نهایت برای هر سه باکتری رقت‌های زیر فراهم گردید. به تمام لوله‌ها ۱۰۰۰ میکرولیتر از باکتری با غلظت نیم‌مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/ml) اضافه گردید تا شرایط برای تمام تیمارهای آزمایش مشابه

[1]Clinical and Laboratory Standards Institute

Archive of SID
www.SID.ir

[DOI: 10.22102/22.4.57]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 8:46 +0330 on Sunday December 23rd 2018

باشد، این آزمایش برای هر سه تکرار به همین صورت انجام پذیرفت (۱۲).

تعیین MBC:

برای تعیین MBC، بعد از تهیه محیط‌کشت مولر هینتون آگار در پلیت‌های ۱۰ سانتی‌متری توزیع گردید و هر کدام از پلیت‌ها به ده قسمت مساوی تقسیم شد. سپس از لوله شماره ۱ تا لوله شماره ۱۰ MIC، عصاره الکلی و عصاره آبی، ۱۰ میکرولیتر را برداشته و به پلیت اضافه شد و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگه‌داری گردید، این آزمایش در سه تکرار انجام پذیرفت (۱۲).

تجزیه و تحلیل آماری:

برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS V.20در قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین آن ها با آزمون آماری DUNCAN انجام پذیرفت.

یافته ها:

میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره‌های پروپولیس، آنتی‌بیوتیک نتایج مربوط به قطر هاله عدم رشد در جدول ۱ نشان داده شده است. بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد مربوط به عصاره الکلی (با اتانول ۹۶ درصد) به ترتیب برای باکتری باسیلوس پومیلوس، سراشیا پلیموتیکا و سودوموناس سرینگه و پس از آن مربوط به عصاره‌ی الکلی (با حلال DMSO) به ترتیب برای باکتری باسیلوس پومیلوس، سراشیا پلیموتیکا و سودوموناس سرینگه و در آخر مربوط به عصاره آبی برای باکتری باسیلوس پومیلوس، سراشیا پلیموتیکا و سودوموناس سرینگه بود.

آنالیز آماری نشان داد که میانگین قطر هاله عدم رشد، عصاره الکلی (با حلال اتانول ۹۶ درصد و دی متیل سولفواکساید) به صورت معنی‌داری بیش‌تر از عصاره آبی است ($P<۰/۰۵$).

جدول ۱: میانگین قطر هاله عدم رشد دیسک‌های حاوی عصاره‌های آبی و الکلی بره‌موم بر باکتری‌های باسیلوس پومیلوس، سراشیا پلیموتیکا و سودوموناس سرینگه

مواد/ قطر هاله عدم رشد(میلی‌متر)	سراشیا پلیموتیکا	سودوموناس سرینگه	باسیلوس پومیلوس
عصاره آبی	۷/۳۳ ±۰/۵۸	۶/۳۳ ±۰/۵۸	۱۰/۶۷ ± ۰/۵۸
عصاره الکلی (اتانول ۹۶ درصد)	۹/۶۶±۰/۵۸	۸/۶۶±۰/۵۸	۱۴/۳۳
عصاره الکلی (دی متیل سولفواکسید)	۸/۶۶ ±۰/۵۸	۷/..±۱/۰	۱۲/۳۳± ۰/۵۸
آب مقطر استریل	*	*	*
اتانول ۹۶ درصد	*	*	*
دی متیل سولفواکسید	*	*	*

* فاقد هاله عدم رشد

همچنین جدول ۲ نشان داده شده، که باکتری باسیلوس پومیلوس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، اریترومایسین، جنتامایسین و نالیدیکسیک اسید به ترتیب با قطر هاله ۲۵، ۲۳، ۳۰ و ۲۱ حساس می‌باشند اما به آنتی‌بیوتیکپلی‌میکسین مقاوم و نسبت به آنتی‌بیوتیک کلینداماسین با قطر هاله ۲۱ متوسط تعیین شد.

Archive of SID
www.SID.ir

[DOI: 10.22102/22.4.57]

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 8:46 +0330 on Sunday December 23rd 2018

باکتری سودوموناس سرینگه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، اریترومایسین، جنتامایسین و نالیدیکسیک اسید به ترتیب با قطر هاله ۲۵، ۱۵، ۲۵، ۲۷ حساس می‌باشند اما به آنتی‌بیوتیک پلی‌میکسین مقاومت متوسط با قطر هاله ۱۵ و به آنتی‌بیوتیک کلینداماسین مقاوم باشند. باکتری سراشیا پلیموتیکا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پلی میکسین،کلینداماسین و اریترومایسین مقاوم و در برابر دیگر آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، نالیدیک اسیدو جنتامایسین به ترتیب با قطر هاله ۲۶، ۳۳، ۲۸ میلی متر حساس می‌باشد.

دیسک های حاوی حلال (اتانول ۹۶ درصد، دی متیل سولفو اکسید) به عنوان کنترل منفی هیچ هاله عدم رشدی را نشان ندادند.

جدول ۲- میانگین قطر هاله عدم رشد دیسک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر روی باکتری سراشیا پلیموتیکا، باسیلوس پومیلوس و سودوموناس سرینگه

دیسک آنتی بیوتیک			CLSI			
	سراشیا پلیموتیکا	سودوموناس سرینگه	باسیلوس پومیلوس	R	I	S
تتراسایکلین	۲۶	۲۵	۲۵	≤۱۴	۱۸-۱۵	≥۱۹
اریترومایسین	۸	۱۵	۲۳	≤۱۱	۱۴-۱۲	≥۱۵
جنتامایسین	۲۸	۲۵	۳۰	≤۱۲	۱۴-۱۳	≥۱۵
نالیدیکسیک اسید	۳۳	۲۷	۲۱	≤۱۴	۲۰-۱۵	≥۲۱
پلی میکسین	-	۱۵	-	≤۱۳	۱۸-۱۴	≥۱۹
کلینداماسین	-	-	۲۱	≤۱۳	۲۲-۱۴	≥۲۳

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره الکلی اتانولی پروپولیس برای باکتری باسیلوس پومیلوس ۰/۳۲۸ و برای سراشیا پلیموتیکا و سودوموناس سرینگه به ترتیب ۰/۶۵۶ و ۱/۳۱ و هم چنین حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره الکلی اتانولی پروپولیس برای باکتری های مذکور به ترتیب ۰/۳۲۸، ۰/۶۵۶ و ۱/۳۱ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین گردید (جدول ۳).

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)عصاره الکلی دی متیل سولفواکسید برای باکتری‌های باسیلوس پومیلوس، سودوموناس سرینگه و سراشیا پلیموتیکا به ترتیب ۱/۰،۳۱/۶۵۶ و ۱/۳۱ همچنین حداقل غلظت کشندگی(MBC) برای باکتری‌های باسیلوس پومیلوس، سراشیا پلیموتیکاو سودوموناس سرینگه به ترتیب ۱/۰،۳۱/۶۵۶ و ۱/۳۱ ملاحظه شد (جدول ۴).

پس از آن حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)عصاره آبی برای باکتری های باسیلوس پومیلوس،سودوموناس سرینگه و سراشیا پلیموتیکا به ترتیب ۱/۳۱، ۲/۶۲ و ۲/۶۲ مشاهده و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره آبی به ترتیب ۲/۶۲، ۵/۲۵ و ۵/۲۵ تعیین گردید (جدول ۵). در غلظت صفر از عصاره حاوی حلال در هیچ اثری بر کاهش یا عدم رشد باکتری نشان داده نشد.

Archive of SID

www.SID.ir

[DOI: 10.22102/22.4.57]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 8:46 +0330 on Sunday December 23rd 2018

جدول ۳- مقدار MIC و MBC عصاره الکلی (با اتانول ۹۶ درصد)پروپولیس برای باکتری باسیلوس پومیلوس، سودوموناس سرینگه و سراشیا پلیموتیکا

سری رقت	غلظت (mg/ml) پروپولیس	باسیلوس پومیلوس		سودوموناس سرینگه		سراشیا پلیموتیکا	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
۱/۱	۵/۲۵	-	-	-	-	-	-
۱/۲	۲/۶۲	-	-	-	-	-	-
۱/۴	۱/۳۱	-	-	-	-	-	-
۱/۸	۰/۶۵۶	-	-	+	+	-	-
۱/۱۶	۰/۳۲۸	-	-	+	+	+	+
۱/۳۲	۰/۱۶۴	+	+	+	+	+	+
۱/۶۴	۰/۰۸۲	+	+	+	+	+	+
۱/۱۲۸	۰/۰۴۱	+	+	+	+	+	+
۱/۲۵۶	۰/۰۲	+	+	+	+	+	+
۱/۵۱۲	۰/۰۱	+	+	+	+	+	+

جدول ۴- مقدار MIC و MBC عصاره الکلی (با دی متیل سولفوکسید)پروپولیس برای باکتری باسیلوس پومیلوس، سودوموناس سرینگه و سراشیا پلیموتیکا

سری رقت	غلظت (mg/ml) پروپولیس	باسیلوس پومیلوس		سودوموناس سرینگه		سراشیاپلیموتیکا	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
۱/۱	۵/۲۵	-	-	-	-	-	-
۱/۲	۲/۶۲	-	-	-	-	-	-
۱/۴	۱/۳۱	-	-	-	-	-	-
۱/۸	۰/۶۵۶	-	-	+	+	+	+
۱/۱۶	۰/۳۲۸	+	+	+	+	+	+
۱/۳۲	۰/۱۶۴	+	+	+	+	+	+
۱/۶۴	۰/۰۸۲	+	+	+	+	+	+
۱/۱۲۸	۰/۰۴۱	+	+	+	+	+	+
۱/۲۵۶	۰/۰۲	+	+	+	+	+	+
۱/۵۱۲	۰/۰۱	+	+	+	+	+	+

Archive of SID

www.SID.ir

[DOI: 10.22102/22.4.57]

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 8:46 +0330 on Sunday December 23rd 2018

جدول ۵- مقدار MIC و MBC عصاره آبی پروپولیس برای باکتری باسیلوس پومیلوس، سودوموناس سرینگه و سراشیا پلیموتیکا

سراشیا پلیموتیکا		سودوموناس سرینگه		باسیلوس پومیلوس		غلظت (mg/ml) پروپولیس	سری رقت
MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC		
-	-	-	-	-	-	۵/۲۵	۱/۱
+	-	+	-	-	-	۲/۶۲	۱/۲
+	+	+	+	+	-	۱/۳۱	۱/۴
+	+	+	+	+	+	۰/۶۵۶	۱/۸
+	+	+	+	+	+	۰/۳۲۸	۱/۱۶
+	+	+	+	+	+	۰/۱۶۴	۱/۳۲
+	+	+	+	+	+	۰/۰۸۲	۱/۶۴
+	+	+	+	+	+	۰/۰۴۱	۱/۱۲۸
+	+	+	+	+	+	۰/۰۲	۱/۲۵۶
+	+	+	+	+	+	۰/۰۱	۱/۵۱۲

بحث

محتویات و ماهیت پروپولیس به شرایط مختلفی از قبیل نوع گیاهان موجود در یک منطقه، متفاوت است. از طرفی شرایط دمایی محیط پیرامونی آن اثر به سزایی بر ماهیت آن برجای می‌گذارد. به گونه ای که نتایج تحقیقات انجام پذیرفته توسط دانشمندان نشان می‌دهد که در دمای اتاق حالت چسبنده دارد اما زمانی که در دماهای پایین قرار می‌گیرد، سخت و شکننده می‌گردد (۱۳).

در مقالات متعدد به خواص ضد میکروبی پروپولیس به وفور اشاره شده است. این توانائی ممکن است به واسطه‌ی اثرات مستقیم آن بر روی میکروارگانیسم‌ها حاصل شود و یا به صورت غیر مستقیم با تحریک سیستم ایمنی موجب مرگ بیش‌تر میکروب‌ها گردد. به علاوه پروپولیس ممکن است با دیگر داروهای ضد میکروبی اثر سینرژستیکی داشته باشد.

مهم‌ترین خواص دارویی بره‌موم،اثرات آنتی‌بیوتیکی، ضد قارچی، ضد ویروسی و ضد باکتریایی آن است. فعالیت ضد میکروبی پروپولیس ممکن است به واسطه‌ی اثر مستقیم بر میکروارگانیسم‌هاو یا غیر مستقیم از طریق تحریک سیستم ایمنی است (۱۰و۹).

Dziedzic و همکاران (۱۴) این خاصیت ضد میکروبی را به مکانیسم اثر پروپولیس بر تقسیم سلولی، تغییر ماهیت سیتوپلاسمی و غشای باکتری مرتبط می دانند. البته نقش پروپولیس بر فعالیت آنزیم‌های RNA پلی‌مرازهای وابسته به DNA و گلوکز ترانس فراز باکتری اثر می‌گذارد که احتمالاً بی ارتباط با خاصیت ضد میکروبی پروپولیس بر باکتری‌ها نباشد.

Mohammadzadeh و همکاران (۱۵) بر این باورند که اثر پروپولیس در مهار باکتری های گرم مثبت بیش از باکتری های گرم منفی است. در تحقیق حاضر، عصاره الکلی پروپولیس بر باکتری باسیلوس پومیلوس نتایج قابل ملاحظه‌ای از عدم رشد باکتری نشان داد، اگرچه خاصیت ضد میکروبی آن علیه باکتری های سراشیا پلیموتیکاو سودوموناس سرینگه هم ملاحظه گردید ولی تاثیر آن بر باکتری گرم مثبت باسیلوس پومیلوس بیش از باکتری‌های گرم منفی سودوموناس سرینگه و سراشیا پلیموتیکا می باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

[DOI: 10.22102/22.4.57]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 8:46 +0330 on Sunday December 23rd 2018

که مطابق با مطالعات Pascoal و همکاران (۱۶) این تفاوت به اختلاف دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مربوط می‌شود. در این تحقیق از آن جا که از عصاره های حلال های آبی ، الکلی و دی متیل سولفوکسید استفاده گردیده است، هر یک از مواد موجود در عصاره در حلال حل شده، و موجب شده خواص ضد میکروبی و مهاری نشان دهند. در نتیجه وقتی از عصاره های رقت پایین تهیه می شود، اگر چه هر دوگونه این مواد غلظتشان کم می شود ولی با کاهش اثر مهاری میکروبی ، اثر ضد میکروبی بیشتر خودش را نشان می دهد. در رابطه با عصاره های الکلی و دی متیل سولفوکسید برای هر سه باکتری مورد مطالعه در غلظت های مشابه MIC و MBC دیده شود. در حالی که در عصاره آبی حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره آبی برای باکتری های باسیلوس پومیلوس،سودوموناس سرینگه و سراشیا پلیموتیکا به ترتیب ۱/۳۱، ۲/۶۲ و ۲/۶۲ مشاهده و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره آبی به ترتیب ۲/۶۲، ۵/۲۵ و ۵/۲۵ تعیین گردید.

kalvandi و همکاران (۱۷) نیز اثر آن را بر باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس و استرپتوکوک موتانس بیش از باکتری گرم منفی انتروباکتر ارزیابی نمودند.

Najafi و همکاران (۱۸) در بررسی عصاره آبی پروپولیس ایرانی، دریافتند که پروپولیس موجب کاهش رشد و اندازه سلول باکتری‌های*Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis*گردید.

Mohammadzadeh و همکاران (۱۵) بر این باورند که اثر پروپولیس در مهار باکتری‌های گرم مثبت بیش از باکتری‌های گرم منفی است که نتایج آن‌ها با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد.

مطالعه‌ی Ibanrikynti و همکاران (۱۹) نشان داد که عصاره الکلی پروپولیس می‌تواند در درمان باکتری‌های بیماری‌زای مختلفی از قبیل *Bacillus cereus*MTCC430، *Staphyloccocus aureus*MTCC96، *Salmonella entericaMTCC735* و *Escherichia coli* MTCC730 موثر باشد.البته آن‌ها بیان داشتند که اثر پروپولیس در کنترل باکتری‌های گرم مثبت بیش از باکتری‌های گرم منفی است.

Basim و همکاران (۲۰) بیان داشتند که باکتری سودوموناس سرینگه از باکتری‌های حساس به پروپولیس می‌باشد. در مطالعه‌ی آن‌ها حداقل غلظت بازدارندگی مربوط به ۱/۱۰۰ از دانه گرده و بیش‌ترین آن مربوط به ۱/۱۰۰۰ از عصاره پروپولیس است، خاصیت بازدارندگی پروپولیس بیش از دانه گرده ملاحظه گردید. در حالی که در تحقیق حاضر بیش‌ترین فعالیت ضد باکتریایی برای باکتری سودوموناس سرینگه مربوط به عصاره الکلی با سری رقت ۱/۴ (۱/۳۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) ملاحظه شد. که این اختلاف احتمالاً مرتبط با تفاوت نوع پوشش گیاهی منطقه‌ای که بره‌موم از آن تهیه شده است، باشد.

در رابطه با این پژوهش میزان رشد باکتری توسط پروپولیس با میزان پروپولیس موجود در رقت ها رابطه ی مستقیم دارد و با افزایش میزان بره موم در هر رقت از تعداد کلنی های باکتری ها بعد از کشت مجدد کاسته شده است. مرادی (۲۱) در پژوهش خود گزارش نمود که در غلظت ۰/۳۲ میلی گرم در میلی لیتر هیچ گونه کلنی باکتری P.larve رشد ننموده است و این غلظت را به عنوان حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد باکتری P.larve توسط بره موم گزارش نمود و هم چنین نشان داد که با افزایش میزان بره موم در هر رقت از تعداد کلنی کاسته شده که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد.

Archive of SID
www.SID.ir

[DOI: 10.22102/22.4.57]

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 8:46 +0330 on Sunday December 23rd 2018

به نظر می‌رسد که با مطالعه‌ی پروپولیس‌های حاصل از کندوهای زنبورعسل در مناطق مختلف و بررسی خواص ضد میکروبی آن بتوان از این ترکیب طبیعی به جای آنتی‌بیوتیک‌های صنعتی استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

دراین بررسی برای اولین بار مشاهده شد که عصاره‌های آبی و الکلی با حلال‌های اتانول و دی متیل سولفواکسید، پروپولیس کردستان بر باکتری‌های باسیلوس پومیلوس، سراشیا پلیموتیکا و سودوموناس سرینگه در شرایط آزمایشگاه موثر می‌باشد، و از آن‌جا که پیدایش اشکال مقاوم باکتری‌ها در برابر آنتی بیوتیک‌ها غالباً به میزان زیاد به وقوع می‌پیوندد و از طرفی مصرف آنتی بیوتیک‌ها همراه با تحمیل هزینه‌های درمانی و عوارض جانبی برای بیماران است، لذا یافتن ترکیباتی طبیعی (از جمله پروپولیس) با خاصیت ضد میکروبی، به دلیل ماهیت طبیعی و ایمن بودن آن برای سلامت انسان و محیط زیست می‌تواند با مطالعات بیش‌تر توصیه گردد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق بخشی از طرح پژوهشی با شماره ثبت ۹۴۵۷۵ است. لذا نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را نسبت به ریاست باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان واحد سنندج به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی در اجرای این مطالعه ابراز می‌دارند.

References

1.Lawrence R, Jeyakumar E. Antimicrobial Resistance: A Cause for Global Concern. BMC Proc 2013; 7:S1.
2. Stockwell VO, Duffy B. Use of antibiotics in plant agriculture. Rev Sci Tech 2012; 31: 199-210.
3. Grimont F, Grimont PAD. Prokaryotes 2006; 6: 219-44.
4. Ashorpour M, Niknejad Kazempour M, Ramezanie M. Bacterial canker of olives caused Pseudomonas syringae pv. syringae in Iran. Sciatica Horticulture 2008; 118: 128-31.
5.Kimouli M, Vrioni G, Papadopoulou M, Koumaki V, Petropoulou D, Gounaris A, Friedrich AW, Tsakris A. Two cases of severe sepsis caused by Bacillus pumilus in neonatal infants. J of Med Microbiol 2012;61:596-9.
6.Curifuta M, Vidal J, Sanchez J, Contreras A, Salazar L, Alvear M. The in vitro antifungal evaluation of a commercial extract of Chilean propolis against six fungi of agricultural importance. Cienc Investig Agrar 2012; 39:347-59.
7. Demestre M, Messerill S, Celli N, Shahhossini M, Kluwe L, Mautner, V, et al. CAPE (caffeic acid phenethyl ester)- based propolis extract (Bio 30) suppresses the growth of human neurofibromatosis (NF) tumorxenografts in mice. Phytother Res 2009; 23: 226-30.
8. Tosi EA, Edmundo R, Ortega ME, Cazzoli AF. Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon Escherichia coli. Food Chem 2007; 104: 1025-29.
9.Ristivojević P, Dimkić I, Trifković J, Berić T, Vovk I, Milojković-Opsenica, D, et al. Antimicrobial activity of Serbian propolis evaluated by means of MIC, HPTLC, Bioautography and Chemometrics. PLoS ONE 2016; 11:1-15.

Archive of SID

www.SID.ir

[DOI: 10.22102/22.4.57]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 8:46 +0330 on Sunday December 23rd 2018

10.Orsi RO, Sforcin J, Funari SRC, Fernandes JRA, Rodrigues P, Bankova V. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on Salmonella serovars. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis 2007; 13:748-57.
11. Bonnie H, Ownley R, Trigiano N. Plant Pathology Concepts and Laboratory Exercises. 3th ed. Taylor and Francis Group, 2016; 582.
12. Jafarzadeh Kashi TS, Kasra Kermanshahi R, Erfan M, Vahid Dastjerdi E, Rezaei Y, Tabatabaei FS. Evaluating the In-vitro Antibacterial Effect of Iranian Propolis on Oral Microorganisms. Iran J Pharm Res 2011;10: 363-8.
13. Bassani-Silva S, Sforcin JM, Amaral AS, GasparLF,& Rocha NS. Propolis effect in vitro on canine transmissible venereal tumor cells. Rev port ciênc 2007; 102: 261-5.
14. Dziedzic A, Kubina R, Wojtyczka RD, Kabala-Dzik A, Tanasiewicz M, Morawiec T. The antibacterial effect of ethanol extract of polish propolis on mutans streptococci and lactobacilli isolated from saliva. Evid Based Complement Alternat Med 2013; 2013: 1-12.
15. Mohammadzadeh S, Shariatpanahi M, Hamedi M, Ahmadkhaniha R, Samadi N, Ostad SN. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. Food Chem 2007; 103: 1097-103.
16.Pascoal A, Rodrigues S, Teixeira A, Fe?s X, & Estevinho, L. M.. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. Food Chem Toxicol 2014; 63: 233-9.
17. Kalvandi R, Darvishi S, & Davari, K. Evaluation of antibacterial properties of ethanol and oil extracts of propolis in Kurdistan Province, on Staphylococcus epidermidis, Streptococcus mutans and Entrobacter aerogenes. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences (SJKUMS) 2016; 21: 85-93. [In Persian]
18. Najafi MF, Vahedy F, Seyyedin M, Jomehzadeh HR, Bozary K. Effect of the water extracts of propolis on stimulation and inhibition of different cells. Cytotechnology 2007; 54:49-56.
19. Ibanrikynti T, Fenella MWN, Santa RJ, Surya BP. Antibacterial and antitumor activity of methanolic extract of Propolis from Meghalaya. World J Pharm Pharm Sci 2015; 4: 1809-21.
20. Basim E, Basim H, & ? zcan, M. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. J Food Eng 2006; 77: 992-6.
21. Moradi M. Antibacterial effect of etanolic extract of honeybee propolis on the Paenibacillus larvae larvae (causative agent of honeybee American foulbrood disease). Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) 2009; 83: 57-61. [In Persian]

Archive of SID

www.SID.ir