Archive of SID

DOI: 10.22092/vj.2017.109866 شماره ۱۱۶ پاییز ۱۳۹۶

تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی و مقایسه اثرات ضدباکتریایی بره‌موم و عسل بر روی عامل ثانویه بیماری لوک اروپایی (*پنی باسیلوس الوئی*) در زنبور عسل

• **الهام رضوان‌نژاد (نویسنده مسئول)**
گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته
• **شهریار شاکری**
گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته
• **احسان نصیری‌فر**
گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵-۰۲-۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵-۰۶-۰۶

Email: Rezvannejd2002@yahoo.com

چکیده

به دلیل مقاومت روزافزون باکتري‌هاي بيماري‌زا به آنتي‌بيوتيك‌هاي رايج، يافتن عوامل ضد ميكروبي طبيعي به عنوان داروهاي جايگزين حائز اهميت است. بیماری لوک اروپایی یکی از بیماری‌های رایج در زنبورستان‌ها است و یکی از باکتری‌های ثانویه مولد این بیماری Penibacillus alvei می‌باشد. در این تحقیق، اثرات ضد باکتريايي بره موم و عسل زنبورعسل روي باكتري *پنی‌باسیلوس الوئی* مورد مطالعه قرار گرفت. براي انجام اين تحقيق ابتدا از زنبورستان‌هاي مناطق مختلف استان كرمان محصولات كندوی موردنياز جمع‌آوري شده و در آزمايشگاه از آن‌ها عصاره‌گيري به‌عمل آمد. سپس باكتري پني‌باسيلوس‌الوئي در محيط اختصاصي كشت داده شده و تحت تاثير رقت‌هاي مختلف عصاره‌ها قرار گرفت. در نهايت MIC و MBC نمونه‌ها توسط تست ديسک ديفوژن و چاهک پليت تعيين گرديد. اطلاعات به‌دست امده توسط نرم‌افزار SAS مورد تجزيه و تحليل قرار گرفت. نتايج اين تحقيق نشان داد كه اگرچه عصاره‌هاي آبی و الكلی بره‌موم و عسل در مقايسه با آنتی‌بيوتيک‌های استاندارد مورد استفاده در زنبورداری‌ها دارای خاصيت ضد باكتريايی كمتری بودند ($p < ۰/۰۱$)، اما تاثير معنی‌داری بر ميزان مهار و كشندگی باكتری *پنی‌باسيلوس الوئی* داشتند. به طوری كه بره‌موم اتانولی و متانولی در غلظت ۰/۳۲ ميلی‌گرم در ميلی‌ليتر دارای خاصيت مهار و كشندگی بر روی باكتری مورد نظر بود، اما عسل در هيچ‌كدام از غلظت‌های مورد استفاده (تا غلظت ۰/۳۲ ميلی‌گرم در ميلی‌ليتر) دارای خاصيت مهار و كشندگی بر باكتری *پنی‌باسيلوس الوئی* نبود. نتايج نشان داد كه بره‌موم زنبورعسل واجد اثر ضد باكتريايی بر عامل ثانويه بيماری لوک اروپايی زنبورعسل می‌باشد.

کلمات کلیدی: داروی کم خطر، اثرات مهارکنندگی، بیماری لوک اروپایی، زنبور عسل، *باسیلوس آلوئی*

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Researches & Biological Products No 116 pp: 139-146

Study and comparison of antibacterial effects of propolis and honey on ***Penibacillus alvei*** secondary factor for European Foulbrood in honeybee

By: Rezvannejad, E., (Corresponding Author) Department of Biotechnology, Institute of Advanced Science and Technology and Environmental Science, Graduate University of Advanced Technology. Shakeri, Sh., Department of Biotechnology, Institute of Advanced Science & Technology and Environmental Science, Graduate University of Advanced Technology and Nasirifa, E., Department of Animal Science, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran

Email: Rezvannejd2002@yahoo.com

Received: 2016-05-09 Accepted: 2016-08-27

Due to the increasing resistance of pathogenic bacteria to antibiotics, finding a natural antimicrobial agent is important as an alternative drug. The European foulbrood disease is one of the common diseases in apiaries and *Peniacillus alvei* is one of the disease-causing bacteria. In this study, antibacterial effects of some products of honeybee (propolis, honey) were tested on *Peniacillus alvei*. For this purpose, the needed products of hive were collected from numbers of different areas in Kerman state and were extracted in the lab. Then, *Penibacillus alvei* was cultivated in special medium and affected by different concentrations of the extracts. Finally, MIC and MBC of samples were determined by disc diffusion and microtiter plate tests. The data were analyzed by SAS software. Although, the results showed that the antibacterial effect of water and alcoholic extracts of propolis and honey was lower than the usual standard antibiotics ($P<0.01$), their antibacterial effect was significant on inhibition and lethality of *Penibacillus alvei*. Ethanol and methanol extracts of propolis had inhibitory and lethal effects on *Penibacillus alvei* at a concentration of 0.32 mg/ml, but honey had inhibitory and lethal effects on this bacteria at none of the tested concentrations. The results showed that propolis has an antibacterial effect on the causative agent of European foulbrood disease in honeybee.

Key words: Honeybee, *Penibacillus alvei*, Antibacterial Properties, Propolis, Honey

مقدمه

زنبور عسل یکی از حشرات مفید براي انسان است که متعلق به راسته نازك بالان Hymenoptera، خانواده Apidae و گونه *Apis mellifera* است (۱۸). اهمیت زنبور عسل علاوه بر ارزش محصولات تولیدی‌اش (عسل، موم، بره‌موم، ژل رویال و زهر) به خاطر گرده افشانی است که توسط زنبورعسل انجام می‌شود. در اکثر گیاهان گلدار، گرده افشانی به صورت غیر مستقیم بوده و به وسیله باد، حشرات، انسان و ... تلقیح انجام می‌گیرد. ثابت شده است که سهم زنبور عسل در این نوع گرده افشانی بالغ بر ۹۰ درصد است (۱۸).

از جمله بیماری‌هایی که صنعت زنبورداری را تهدید می‌کند، بیماری لوک اروپایی (Europian Foulbrood) است. این بیماری مخصوص شفیره‌ها مي‌باشد که باعث ایجاد خسارت به صنعت زنبورداری در سراسر جهان می‌گردد و عامل این بیماری میکروب‌های مختلف مي‌باشد که عبارت‌اند از *Paenibacillus alvei* و *Streptococcus pluton*، باکتری *Paenibacillus alvei* که به‌عنوان عامل ثانویه این بیماری مطرح می‌باشد و باعث تشدید علایم آن می‌گردد، یک باکتری گرم مثبت، متحرک و اسپوردار است و در برابر شرایط نامساعد محیط بسیار مقاوم بوده و قادر است سالیان سال در محیط زنبورستان‌ها به صورت نهفته باقی بماند و به محض آماده شدن شرایط، رشد نموده و ضایعاتی را در زنبور عسل ایجاد نماید (۷).

در حال حاضر آنتی‌بیوتیک‌های متعددی بر علیه بیماری لوک اروپایی زنبورعسل استفاده می‌شود ولی با توجه به عدم تاثیر آن‌ها روی اسپور باکتری مذکور، درمان قطعی بیماری صورت نمی‌گیرد. از طرف دیگر چون باقیمانده مواد دارویی در فراورده‌های زنبورعسل خطراتی برای مصرف‌کنندگان فراورده‌های زنبورعسل ایجاد می‌کند، لذا بایستی در پی یافتن راه‌ها و مواد دارویی موثر و کم خطر برای سلامتی انسان و زنبورعسل بود.

برخی از محصولات کندو دارای خواص ضد باکتریایی می‌باشند که از جمله آن‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره نمود: محصول اصلی زنبور، عسل است. عسل را زنبور عسل از شهد گیاهانِ مختلف با غلیظ کردنشان تهیه می‌کند. مقدار آب شهد گل‌ها معمولاً ۲۵ تا ۸۰ درصد است و شامل قندهایي چون گلوکز، فروکتوز و مواد معدني همچون منیزیم، پتاسیم، کلسیم، کلرید سدیم، گوگرد، آهن و فسفات می‌باشد. همچنین ویتامین‌هایي همچونB_5، C، B_3، B_2،B_1 و B_6 و عناصري مثل مس، ید و روي نیز در عسل وجود دارد که بنا به نوع عسل میزان آن‌ها متفاوت

www.SID.ir

Archive of SID

مي‌باشد. از ويژگي‌هاي مهم عسل خاصيت ميكروب‌كشي آن است و به علت وجود بعضي مواد آنتي‌اكسيداني در عسل، هيچ ميكروب يا باسيل و يا ويروسي قادر به زندگي در عسل نمي‌باشد. يعني بار ميكروبي عسل صفر است (۱۱).

برموم ماده‌ای شبیه موم و از تولیدات زنبور عسل می‌باشد، حالت آن خمیری شکل و چسبناك با بوی مطبوع که رنگ آن از سبز تا قهوه‌ای تیره متغیر است. رنگ و عطر بره موم در مناطق مختلف متفاوت بوده و در هوای سرد، ترد و شکننده و در هوای گرم، نرم و چسبناك می‌گردد و در کندو جهت جلوگیری از نفوذ سرما و پوشش شکاف‌ها و چسباندن کادرهای داخل کندو استفاده می‌شود. زنبورها از بره‌موم برای درزگیری و ضدعفونی داخل کندو استفاده می‌کنند. بره‌موم تنها آنتی‌بیوتیك خیلی قوی طبیعی می‌باشد که توسط زنبور عسل از صمغ بعضی گیاهان، شهد و گرده گل ساخته می‌شود و دارای ویتامین‌های B_3، B_2، B_1، A و ویتامین K می‌باشد. بره‌موم خواصی همچون اثر ضدباکتریایی، ضد قارچی، ضد انگلی، آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی دارد (۱۰).

از گذشته‌های دور مردم سرزمین یونان، روم، چین، مصر و ایران عسل را به عنوان یک میکروب‌کش شناخته بودند و از آن استفاده می‌کردند. همچنین مطالعات علمی زیادی تاثیر آن را بر گونه‌های مختلف باکتری مورد بررسی قرار داده‌اند. مولان (۱۵) لیستی از انواع باکتری‌ها که تاثیر عسل به عنوان یک ضدباکتری در آن‌ها مورد مطالعه و تایید قرار گرفته است، را ارائه داده‌اند. از آن جمله می‌توان به Pseudomonas، Staphylococcus، Streptococcus، Stenotrophomonas، Salmonella، Serratia و.... اشاره نمود. اخیرا مطالعاتی نیز در مورد تاثیر خواص ضد باکتریایی بره‌موم زنبور عسل صورت گرفته است که خاصیت ضدباکتریایی آن را بر روی انواع مختلف باکتری‌های گرم مثبت و منفی نشان داده‌اند (۶).

هدف اصلي اين تحقيق، بررسي و تعيين ميزان حساسيت باكتري *Paenibacillus alvei* به عصاره‌هاي آبي عسل و الكلي (اتانولي و متانولي) بره‌موم زنبورعسل و به‌دست آوردن حداقل غلظت مهاركنندگي رشد (MIC) باكتري *P. alvei* توسط اين دو ماده در درمان بيماري لوك اروپايي زنبورعسل مي‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره‌های بره‌موم و عسل

مشخص شده است كه فعاليت‌هاي بيولوژيك يك نمونه، به روش به كار رفته براي تهيه‌ي عصاره بستگي دارد. معمول‌ترين مواد به كار رفته براي تهيه‌ي عصاره در روش‌هاي بيولوژيك، اتانول، متانول و آب هستند (۲۲).

یک نمونه بره‌موم که از مناطق مختلف استان کرمان و یک نمونه عسل که از کندوهای زنبورستان‌های صنعتی (پرورشی) در استان کرمان تهیه شده بودند، به‌عنوان مواد ضدباکتریایی طبیعی، مورد استفاده قرار گرفتند (در این جمع‌آوری به منظور کاهش احتمال آلودگی نمونه‌ها به مواد شیمیایی، دقت شد که نمونه‌ها از کندوهایی جمع‌آوری گردد که ظرف سه ماه قبل تحت درمان بیماری‌های مختلف قرار نگرفته باشند).

پس از تهیه‌ی مواد، در آزمایشگاه دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی کرمان، بره‌موم‌ها به قطعات‌ریزتری تبدیل شدند و سپس ۲۵ گرم از بره‌موم با ۲۵۰ میلی لیتر محلول اتانول و متانول ۸۰ درصد به طور جداگانه مخلوط و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق با دستگاه چرخاننده (۱۵۰ دور در دقیقه) تکان داده شد. سپس عصاره الکلی حاصل توسط کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شده و به کمک دستگاه روتاری، الکل آن تبخیر و عصاره الکلی خالص به دست آمد (۳). برای خشک شدن کامل، عصاره بره‌موم حاصله به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴۰ سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس جهت تهیه غلظت‌های مورد نیاز وزن‌کشی شده و در داخل میزان مشخصی از اتانول و متانول حل شد تا رقت‌های مورد نظر بدست آید.

نمونه عسل تهیه شده نیز در آب مقطر استریل حل شد و مانند نمونه‌های بره‌موم از کاغذ صافی واتمن رد شد تا در صورت وجود ناخالصی در عسل، عصاره به‌دست آمده خالص باشد و سپس برای خشک شدن کامل، به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴۰ سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس جهت تهیه غلظت‌های مورد نیاز وزن‌کشی شده و در داخل میزان مشخصی از آب مقطر استریل حل شد تا رقت‌های مورد نظر به‌دست آید.

انتشار دیسک (Disk diffusion)

بعد از تهیه رقت‌های مختلف از عصاره‌های مورد نظر، کاغذ واتمن شماره دو به وسیله دستگاه پانچ به اندازه دیسک‌های آنتی-بیوگرام استاندارد درآورده و اتوکلاو شدند. در مرحله بعد دیسک‌های تهیه شده به مدت دو ساعت درون غلظت‌های مختلف نمونه‌ها قرار گرفتند (غوطه‌ور شدند). سپس دیسک‌ها خارج شده و به مدت پنج ساعت برای خشک شدن کامل در دمای ۳۷ سانتی‌گراد قرار گرفتند. برای تست کنترل منفی دو عدد دیسک با شرایط یکسان در حجم‌های مشابه اتانول، متانول و آب (یک میلی‌لیتر) قرار گرفتند. سپس دیسک‌های خشک شده به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ سانتی‌گراد روی محیط کشت قرار گرفتند. هاله تشکیل شده دور هر دیسک نمایانگر ناحیه عدم رشد باکتری بود که با واحد میلی‌متر (قطر هاله) اندازه‌گیری شد. علاوه بر این، یک دیسک نیز در آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در زنبورستان‌ها (اکسی تتراسیکلین)، جهت مبارزه با بیماری لوک اروپایی، با غلظت مشخص تهیه شد و بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار قرار داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت قرار گرفت (۱۲). تمام مراحل آزمایش برای هر نمونه سه بار تکرار شد و قطر هریک از مناطق مهاری با کولیس دیجیتال اندازه گیری شد.

تهیه غلظت‌ها مناسب از باکتری مورد استفاده

سویه باکتری P. alvei تهیه شده از موسسه رازی در کرج در محیط کشت نوترینت براث جهت ساخت مایه باکتریایی به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکر قرار داده شد. پس از رشد، باکتری در محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد. سپس با کمک لوپ استریل چند کلونی از محیط کشت باکتری مورد استفاده به محیط کشت مولر- هینتون مایع (Mueller-Hinton broth) اضافه گردید تا کدورت محیط با لوله استاندارد نیم مک فارلند یکسان شود. باکتری مورد استفاده در غلظت استاندارد (۱/۵×۱۰۸ واحد کلنی‌ساز (CFU) در

www.SID.ir

Archive of SID

میلی‌لیتر (نیم مک فارلند آماده و در مرحله بعد ۵۰۰ میکرولیتر از مایه باکتریایی استاندارد حاصله با استفاده از لوپ استریل بر روی محیط کشت جامد مولر- هینتون آگار کشت داده شد (۱۲).

اندازه‌گیری قطر ناحیه مهاری

برای بررسی اثر ضدباکتریایی نمونه‌ها، از روش انتشار دیسک (Disk diffusion) استفاده گردید. قطر هریک از مناطق مهاری با استفاده از کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد. برای جلوگیری از بروز خطا، قطر هاله تشکیل شده نمونه‌های اتانولی و متانولی(۶/۵۸ میلی متر) به میزان (۰/۵۸ میلی‌متر) از نمونه‌های اصلی کسر گردید. قطر هاله اصلی شش میلی‌متر بود.

تعیین MBC (Minimally Bactericidal Concentration) و MIC (Minimally Inhibitory Concentration)

برای تعیین غلظت مهاری (MIC) عصاره‌ها بر *P. alvei*، از محیط کشت مایع برای آماده‌سازی سوسپانسیون باکتری در کدورت نیم مک‌فارلند استفاده گردید. در این روش جهت تعیین نسبی حداقل غلظتی که باعث مهار رشد باکتري‌ها (MIC) و حداقل غلظتی که باعث مرگ باکتري‌ها (MBC) می‌گردد، سريال‌هاي رقتی در محیط مولر- هینتون براث از عصاره آبی و عصاره تغلیظ شده الکلی تهیه گردید. سپس به هرکدام از رقت‌ها به ازاي هر میلی‌لیتر محیط مایع، ۱۰۵× ۵ باکتری فعال اضافه گردید. در کنار لوله‌ها از کنترل مثبت (محیط کشت حاوي باکتري، بدون عصاره) و کنترل منفی (محیط کشت بدون باکتري) استفاده گردید. در نهایت لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس نتایج قرائت شد.

براي هر کدام از رقت‌هاي عصاره آبی و الکلی، آخرین رقتی که در آن هیچ‌گونه کدورتی مشاهده نشد (عدم رشد) به عنوان MIC در نظر گرفته شد و از تمام لوله‌هاي بدون کدورت روي محیط مولر- هینتون براث آگار کشت داده شد. آخرین رقتی از عصاره‌ها که قادر به مرگ ۹۹/۹ درصد از باکتری‌های زنده اولیه بود به عنوان MBC عصاره‌ها در نظر گرفته شد (۱۲).

آنالیز آماری

برای اندازه‌گیری قطر ناحیه مهاری (Zone of inhibition)، داده‌ها با نرم‌افزار SAS نسخه ۹,۱ به روش ANOVA مورد آنالیز آماری قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها به روش توکی (Tukey) صورت پذیرفت.

نتایج

عصاره‌های الکلی بره‌موم و عسل میزان قابل توجهی از اثرات ضد میکروبی بر علیه عامل باکتریایی P. alvei داشتند، اما در مقایسه با آنتی‌بیوتیک استاندارد مورد استفاده در زنبورستان‌ها (اکسی تتراسیکلین)، میزان اثرات ضدباکتریایی آن‌ها کمتر بود ($p < ۰/۰۱$) (جدول ۱). در شکل ۱ نیز می‌توان به صورت شماتیک این تفاوت‌ها را مشاهد نمود.

همان‌طور که در جدول ۲ مشخص شده است، قطر هاله ممانعت از رشد باکتری با میزان بره‌موم و عسل موجود در دیسک‌ها رابطه مستقیم داشته و با افزایش میزان آن‌ها، قطر هاله ممانعت از رشد اطراف دیسک‌ها نیز افزایش یافته است. شکل ۲ نشان‌دهنده تغییرات هاله رشد پنی‌باسیلوس‌الوئی نسبت به تغییرات غلظت عصاره‌های مورد استفاده در تحقیق می‌باشد.

در مورد عصاره آبی عسل در رقت‌های مختلف مورد استفاده در تحقیق حاضر، تا ۰/۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، حداقل قدرت مهارکنندگی (MIC) مشاهده نشد. اما در مورد عصاره‌های اتانولی و متانولی بره‌موم، غلظت ۰/۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای حداقل قدرت مهارکنندگی (MIC) برروی باکتری پنی‌باسیلوس‌الوئی بود.

بحث

اثر ضد باکتریایی عسل

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عسل مورد استفاده که در استان کرمان تولید شده است و منشا آن گیاهان موجود در مراتع این استان شامل گون، درمنه و خارشتر می‌باشد و دارای خواص ضدباکتریایی قابل توجهی است. همچنین نتایج نشان داد که خاصیت ضدباکتریایی عصاره آبی عسل مورداستفاده با افزایش غلظت افزایش یافته است، هرچند که میزان تغییرات آن با افزایش غلظت زیاد نمی‌باشد که دلیل آن می‌تواند فعال بودن آنزیم گلوکزاکسیداز در غلظت‌های پایین عسل و در نتیجه تبدیل گلوکز به هیدروژن پراکساید و گلوکونیک اسید باشد که دارای خاصیت ضدباکتریایی می‌باشند. در غلظت‌های بالا فعالیت ضدباکتریایی عسل بیشتر به علت مقادیر بالای قند موجود در آن است و نه فعالیت هیدروژن پراکساید (۵). از آنجا که عسل دارای ۸۰ درصد شکر می‌باشد

جدول۱- میانگین قطر هاله عدم رشد دیسک های حاوی عصاره های آبی عسل، اتانولی و متانولی‌بره موم بر باکتری *پنی باسیلوس الوئی*

مواد ضد باکتریایی	عسل آبی	بره موم اتانولی	بره موم متانولی	آب مقطر استریل	اتانول ۹۶ درصد	متانول ۹۶ درصد	آنتی بیوتیک استاندارد
پنی باسیلوس الوئی	۷/۱۹۶±۰/۶۸۰	۸/۴۳۷±۱/۳۱۴	۷/۸۳۱±۱/۱۱۱	*	*	*	۱۸/۰۷

*فاقد هاله عدم رشد

www.SID.ir

Archive of SID

احتمال داده می‌شود که فعالیت ضدباکتریایی عسل به دلیل ایجاد فشار اسمزی بر روی پاتوژن‌ها باشد (۱۵). به هر حال، کیفیت ضد میکروبی عسل تنها ناشی از میزان شکر آن نیست، بلکه در طی تولید عسل، آنزیم گلوکوز اکسیداز توسط زنبوران به عسل اضافه می‌شود که دارای خاصیت ضدباکتریایی می‌باشد (۲۱). علاوه برآن، عسل تولید شده توسط کندو از منابع گیاهی متفاوت تولید می‌شود که بر اساس ترکیبات مختلف متابولیت ثانویه و خواص ضدباکتریایی گیاهان مورداستفاده، عسل تولید شده می‌تواند دارای خواص ضدباکتریایی باشد (۸). مطالعات انجام شده توسط ارلر و همکاران (۵) نشان داد که فعالیت ضدباکتریایی عسل نسبت به شکر برای عوامل بیماری‌زای لوک آمریکایی بیشتر می‌باشد. همچنین علت متفاوت بودن خاصیت ضدباکتریایی برای انواع عسل‌ها ناشی از تاثیر متقابل بین فلاوونوییدهای متفاوت ناشی از منابع گیاهی مختلف مورد استفاده در تولید عسل می‌باشد (۱۴). علاوه بر این، لاکتیک اسید باکتری‌های اختصاصی هر نوع عسل نقش مهمی در خواص ضد باکتریایی آن نوع عسل ایفا می‌کند (۲) که وابسته به منبع فلور میکروبی تولید کننده آن می‌باشد (۱۶).

اثر ضدباکتریایی بره‌موم

بررسی‌های مختلف نشان داده‌اند که بره‌موم روی باکتری‌های گرم مثبت خیلی موثرتر از باکتری‌های گرم منفی است. این تفاوت تاثیر را ناشی از تفاوت ساختمان دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و منفی می‌دانند (۳). از سوی دیگر منبع گیاهی و فصل تولید بره‌موم و نوع حلال استفاده شده هم روی اثرات ضدباکتریایی بره‌موم تاثیر چشم‌گیری دارد، چرا که حلال‌های آلی ترکیبات بیشتری از بره‌موم را آزاد کرده و با این حلال‌ها اثرات ضدباکتریایی زیادی به دست می‌آید (۴).

در تحقیق حاضر مشخص گردید که دیسک‌های کاغذ صافی حاوی ۰/۰۱ تا ۰/۱ میلی‌گرم بره‌موم متانولی و اتانولی با ایجاد هاله‌ای به قطر ۶/۳ تا ۱۰/۲۷ میلی‌متر مانع رشد باکتری پنی‌باسیلوس‌آلویی در اطراف خود شدند. اشترمارگاردیا و همکارانش (۶) نشان دادند که بره‌موم مناطق مختلف برزیل با توجه به فصول مختلف سال در غلظت‌های ۱/۷ تا ۰/۱۲ میلی‌گرم در دیسک بر باکتری باسیلوس لاروا مولد بیماری لوک آمریکایی موثر بوده‌اند و علت اصلی این وسعت دامنه‌ی تاثیر را منبع تهیه بره‌موم دانسته‌اند. هقازی و عبدالهادی (۹) در مطالعه‌اي در سال ۲۰۰۱ اثر ضد میکروبی بر موم و عسل را بر روي باکتري اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس بررسی کردند. نتایج با روش گرادیانت پلیت و قطر هاله، MBCو MIC بررسی شد. ترکیب نتایج از تمام روش‌ها نشان داد که هر دو بره‌موم و عسل فعالیت ضدباکتري علیه استافیلوکوکوس اورئوس دارد. همچنین در تحقیقی که توسط خسروی و همکاران (۱۳) انجام شد، نیز نشان داده شد که استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با باکتري گرم منفی اشریشیاکلی براي MBC و MIC حساسیت بیشتري دارد. همچنین پارک و همکاران (۱۷) اثر عصاره آبی برموم را بر باکتري سودوموناس آئروژینوزا و باسیلوس سرئوس بررسی کردند و نتایج این تحقیق نشان داد عصاره آبی تاثیر یکسان بر این دو باکتري دارد.

در این بررسی نشان داده شد که غلظت ۰/۳۲ میلی گرم در میلی‌لیتر بره‌موم باعث مهار کامل رشد باکتری پنی‌باسیلوس‌الوئی می‌گردد و این غلظت به عنوان حداقل غلظت مهارکننده رشد باکتری توسط بره‌موم در نظر گرفته شد. سایر محققین در کشورهای مختلف هم نتایج مشابهی روی باکتری‌های مختلف به‌دست آورده‌اند بطوری‌که ولازکوز

جدول۲- میزان هاله رشد در غلظت‌های مختلف عصاره های مختلف بره موم و عسل برای باکتری *پنی باسیلوس الوئی*

ماده ضد باکتریایی رقت	عسل آبی	بره موم اتانولی	بره موم متانولی
۰/۰۱	۶/۳	۶/۴	۶/۳
۰/۰۲	۶/۴۱	۷/۰۰	۶/۶
۰/۰۳	۶/۷۵	۷/۵	۷/۰۶
۰/۰۴	۶/۸۴	۷/۶۹	۷/۷
۰/۰۵	۷/۰۰	۸/۰۹	۸/۲
۰/۰۶	۷/۱۱	۹/۰۰	۸/۳
۰/۰۷	۷/۴۳	۹/۰۸	۸/۵
۰/۰۸	۷/۷۶	۹/۱	۸/۸۸
۰/۰۹	۸/۰۰	۱۰/۲۴	۹/۰۵
۰/۱	۸/۳۶	۱۰/۲۷	۹/۴۱

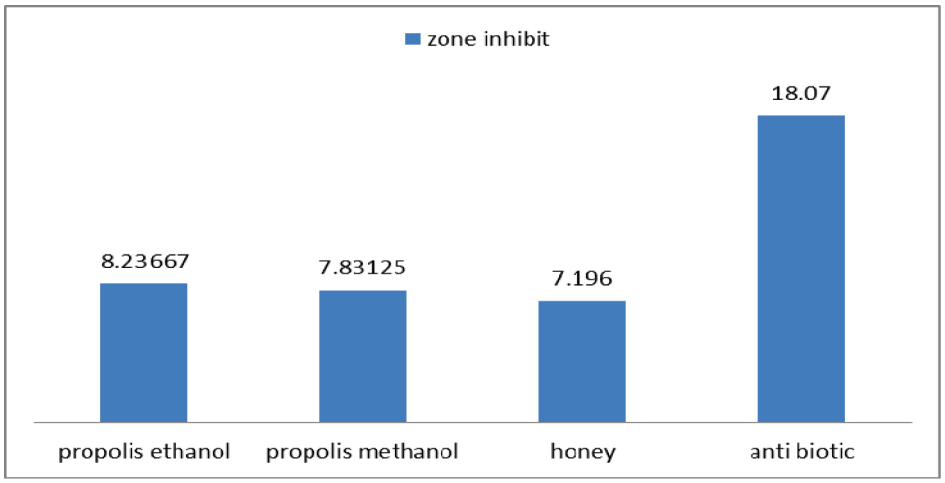
www.SID.ir

Archive of SID

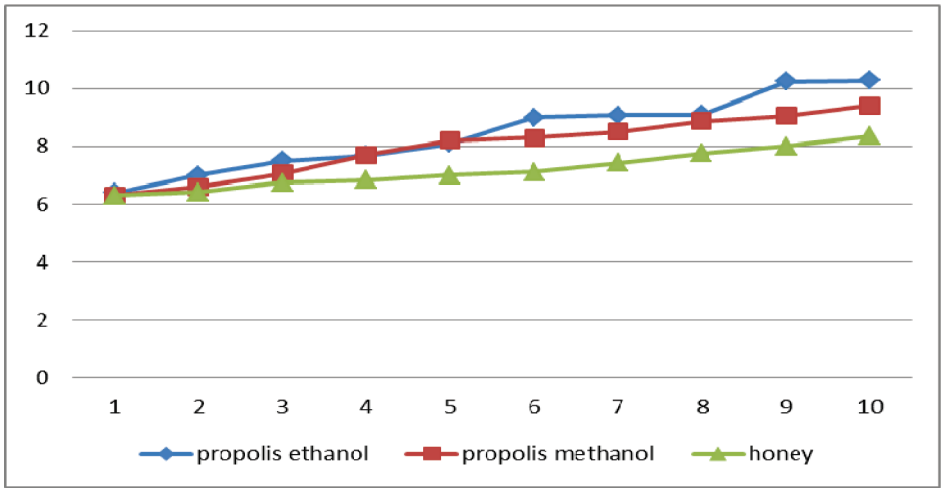
و همکارانش (۲۰)، MIC عصاره اتانولی بره‌موم روی باکتری *S. aureus* را در حدود ۰/۱۰میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌دست آورده‌اند. استفانویک و همکارانش (۱۹) با استفاده از روش آگار دیفیوژن نشان داده‌اند که عصاره اتانولی بره‌موم در غلظت ۰/۰۷۸ درصد (MIC) و بالاتر باعث مهار رشد ۳۹ باکتری گرم مثبت مختلف شده است ولی غلظت آن جهت مهار رشد باکتری‌های گرم منفی بیشتر از این میزان بوده است.

مقایسه اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های مختلف مورد استفاده

در تحقیق حاضر مقایسه بین اثرات ضدباکتریایی عصاره‌های متانولی و اتانولی بره‌موم، عصاره آبی عسل و آنتی بیوتیک استاندارد مورد استفاده



شکل ۱- میانگین قطر هاله عدم رشد دیسک های حاوی عصاره های مورد استفاده بر باکتری *پنی باسیلوس الوئی*



شکل ۲- تغییرات اندازه هاله رشد بر اساس غلظت در عصاره های مختلف بره‌موم و عسل برای باکتری *پنی باسیلوس الوئی*

www.SID.ir

Archive of SID

برای بیماری لوک اروپایی در زنبور عسل انجام شد. نتایج نشان داد که تفاوت بین تاثیر عصاره‌های مورد استفاده در مقایسه با آنتی‌بیوتیک رایج بر باکتری پنی‌باسیلوس‌الوئی معنی‌دار می‌باشد ($p < ۰/۰۱$). همچنین اختلاف بین عصاره‌های اتانولی و متانولی بره‌موم و عصاره آبی عسل معنی‌دار نبود، هرچند که عصاره اتانولی بره‌موم به میزان ناچیزی تاثیر ضدباکتریایی بیشتری نسبت به دو نوع عصاره دیگر داشت ($p < ۰/۰۱$). به هرحال هر سه نوع عصاره دارای تاثیر ضدباکتریایی قابل مشاهده‌ای بر باکتری مورد استفاده بودند.

همچنین در مطالعاتی که در گذشته انجام شده است، نشان داده شد که برای بیماری لوک آمریکایی آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین دارای اثرات به مراتب قوی‌تری نسبت به بره‌موم روی باکتری *Bacillus larvae* می‌باشند. به طوری که آدریانا و همکارانش (۱) نشان دادند که آنتی‌بیوتیک تایلوزین دارای MIC ۰/۰۰۷۸ تا ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر روی ۶۷ سویه مختلف باکتری باسیلوس لاروا می‌باشد و این میزان در مقایسه با MIC بره‌موم روی این باکتری بسیار پایین است.

در نهایت این‌که، نتایج بررسی حاضر نشان داد که بره‌موم و عسل زنبورعسل در منطقه استان کرمان واجد اثر ضدباکتریایی بر روی باکتری پنی‌باسیلوس‌الوئی عامل ثانویه بیماری لوک اروپایی زنبورعسل می‌باشد و در صورت انجام بررسی‌های بیشتر امکان استحصال ماده موثره اصلی از این فراورده‌ها امکان‌پذیر است. علاوه بر این، با توجه به تنوع آب و هوایی و پوشش گیاهی مناطق مختلف ایران، امکان استحصال بره‌موم و عسل با کیفیت مناسب وجود دارد و می‌توان با استفاده از روش‌های مدرن استحصال و فراوری بره‌موم، بازار مساعدی را برای صادرات این محصول در خارج از کشور فراهم نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از طرح پژوهشی شماره ۱/۶۸۹۱ دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته می‌باشد. که بدین وسیله نویسندگان از آن دانشگاه تشکر می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

1- Alippi, A. M., G. N. Albo, F. J. Reynaldi and M. R. De Giusti. 2005. In vitro and in vivo susceptibility of the honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae* subsp. larvae to the antibiotic tylosin. *Veterinary Microbiology* 109(1-2):47-55

2- Butler, È., M. Alsterfjord, T. C. Olofsson, C. Karlsson, J. Malmström and A. Vásquez. 2013. Proteins of novel lactic acid bacteria from *Apis mellifera mellifera*: an insight into the production of known extra-cellular proteins during microbial stress. *BMC Microbiol* 13: 235.

3- Brumfitt,W., J. M. Miller and I. Franklin. 1990. Antibiotic activity of natural products: 1. *Propolis. Microbios* 62(250): 19-22.

4- Cheng, P. C. and G. Wong. 1996. Honeybee propolis : prospects in medicine. *Bee world* 77(1): 8-15.

5- Erler, S., A. Denner, O. Bobiş, E. Forsgren and R. F. A. Moritz. 2014. Diversity of honey stores and their impact on pathogenic bacteria of the honeybee, *Apis mellifera.* Ecology Evolation 4(20): 3960–3967.

6- Esther Margarida A. F. B, M. Michael Simone, D. Daniela Macedo Jorge, A. E. Egea Soares and M. Spivak. 2008. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis. *Journal of Invertebrate Pathology* 97: 273–281.

7- Forsgren, E. 2010. European Foulbrood in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 103: S5–S9.

8- Gherman, B. I., A. Denner, O. Bobiş, D. S. Dezmirean, L. A. Mărghitaş, H. Schlüns, R. F. A. Moritz and S. Erler. 2014. Pathogen-associated self-medication behavior in the honeybee *Apis mellifera. Behavioral Ecology and Sociobiology* 68 (11): 1777-1784.

9- Hegazi, A. G. and F. K. Abd El Hady. 2001. Egyptian propolis: 1- antimicrobial activity and chemical composition of upper Egypt. In: Proceeding of 37th International Apicultural Congress. Durban, South Africa.

10- Huang, S., C. P. Zhang, K. Wang, G. Q. Li and F. L. Hu. 2014. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules* 19: 19610-19632.

11- Kaiser, C. and M. Ernst. 2013. Beekeeping and Honey Production, Center for Crop Diversification Crop Profile, Available online at: https://www.uky.edu/Ag/CCD/introsheets/honey.pdf. Accesed February 2013

12- Koneman, E. W., Allen, S. D. Boewell, J. V. R. and Sommers, H. M. 1983. Color atalas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Second Edition. B. Lippin cott company, Philadelphia.

13- Neshat Khosravi, N., S. Darvishi and K. Davari. 2016. obial activity of aqueous and alcoholic extracts of Kurdistan propolis on *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa. Scientific Journal of Kurdestan University* 20 (6): 97-106.

14- Mihai, C.M., L. A. Mărghitaş, D. S. Dezmirean, F. Chirilă, R. F. A. Moritz and H. Schlüns H. 2012. Interactions among flavonoids of propolis affect antibacterial activity against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae. Journal of Invertebrate Pathology* 110: 68–72.

15- Molan, P. 2006. The evidence supporting the use of honey as a wound dressing. *Lower Extremity Wounds* 5 (1): 40–54.

16- Olofsson, T.C. and A. Vásquez. 2008. Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera. Current Microbiology* 57: 356–363.

17- Park, Y. K., M. H. Koo, J. A. Abreu, M. Ikegaki, J. A. Cury and P. L. Rosalen. 1998. Antimicrobial activioty of propolis on oral microorganisms. *Current Microbiology* 36 (1): 24 - 28.

18- Shahrestani, N. 2015. Honeybees and its culture: the complete

www.SID.ir

Archive of SID

revision and the latest achievements of beekeeping. Sepehr Publishers, Tehran. (In Farsi).

19- Stepanović, S., N. Antić, I. Dakić and M. Svabić-Vlahović. 2003. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol Reseach* 158 (4): 353-357.

20- Velazquez, C., M. Navarro, A. Acosta, A. Angulo, Z. Dominguez, R. Robles, R. Robles-Zepeda and E. Lug .2007. Antibacterial and free-radical scavenging activities of *Sonoran propolis*. *Journal of Applied Microbiology* 103 (5): 1747-56.

21- White, J. W., Subers, M. H. and A. I. Schepartz. 1963. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochimica et Biophysica Acta* 73:57-70.

22- Zia, M. A., R. Mannani, M. Mahmoodi, M. Bayat and F. Mohaghegh. 2009. The effects of alcoholic extract of propolis obtaind from Iran bee hives on the growth of *Trychophyton mentagrophytis, Trychophyton rubrum* and *Trichophyton verrucosum*. *Journal of Isfahan Medical School* 27 (95): 232-241.

www.SID.ir