

بررسی و مقایسه اثرات ضدباکتریایی بره‌موم و عسل بر روی عامل ثانویه بیماری لوک اروپایی (پنی‌باسیلوس 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 باکتری‌های بیماری‌زا به آنتی‌بیوتیک‌های رایج، یافتن عوامل ضد میکروبی طبیعی به عنوان داروهای جایگزین حائز اهمیت 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 باکتریایی بره‌موم و عسل زنبورعسل روی باکتری *پنی‌باسیلوس الوئی* مورد مطالعه قرار گرفت. برای انجام این تحقیق ابتدا از زنبورستان‌های مناطق مختلف استان کرمان محصولات کندوی مورد نیاز جمع‌آوری شده و در آزمایشگاه از آن‌ها عصاره‌گیری به‌عمل آمد. سپس باکتری *پنی‌باسیلوس الوئی* در محیط اختصاصی کشت داده شده و تحت تاثیر رقت‌های مختلف عصاره‌ها قرار گرفت. در نهایت MIC و MBC نمونه‌ها توسط تست دیسک دیفیوژن و چاهک پلیت تعیین گردید. اطلاعات به‌دست آمده توسط نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که اگرچه عصاره‌های آبی و الکلی بره‌موم و عسل در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد مورد استفاده در زنبورداری‌ها دارای خاصیت ضد باکتریایی کمتری بودند ($p < 0/01$)، اما تاثیر معنی‌داری بر میزان مهار و کشندگی باکتری *پنی‌باسیلوس الوئی* داشتند. به طوری که بره‌موم اتانولی و متانولی در غلظت ۰/۳۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای خاصیت مهار و کشندگی بر روی باکتری مورد نظر بود، اما عسل در هیچ‌کدام از غلظت‌های مورد استفاده (تا غلظت ۰/۳۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) دارای خاصیت مهار و کشندگی بر باکتری *پنی‌باسیلوس الوئی* نبود. نتایج نشان داد که بره‌موم زنبورعسل واجد اثر ضد باکتریایی بر عامل ثانویه بیماری لوک اروپایی زنبورعسل می‌باشد.

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

• 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

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 زنبور عسل استفاده می‌شود ولی با توجه به عدم تأثیر آن‌ها روی اسپور باکتری مذکور، درمان قطعی بیماری صورت نمی‌گیرد. از طرف دیگر چون باقیمانده مواد دارویی در فرآورده‌های زنبور عسل خطرانی برای مصرف‌کنندگان فرآورده‌های زنبور عسل ایجاد می‌کند، لذا بایستی در پی یافتن راه‌ها و مواد دارویی موثر و کم خطر برای سلامتی انسان و زنبور عسل 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 گیاهان مختلف با غلیظ کردن نشان تهیه می‌کند. مقدار آب شهد گل‌ها معمولاً ۲۵ تا ۸۰ درصد است و شامل قندهایی چون گلوکز، فروکتوز و مواد معدنی همچون منیزیم، پتاسیم، کلسیم، کلرید سدیم، گوگرد، آهن و فسفات می‌باشد. همچنین ویتامین‌هایی همچون B_۱، B_۲، B_۶، B_{۱۲}، B_{۱۵}، B_{۱۶} و عناصری مثل مس، ید و روی نیز در عسل وجود دارد که بنا به نوع عسل میزان آن‌ها متفاوت

مقدمه

زنبور عسل یکی از حشرات مفید برای انسان است که متعلق به راسته نازک 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 زنبور عسل 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 (European Foulbrood) است. این بیماری مخصوص سفیره‌ها می‌باشد که باعث ایجاد خسارت به صنعت زنبورداری در سراسر جهان می‌گردد و عامل این بیماری میکروب‌های مختلف می‌باشد 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

صنعتی کرمان، بره‌موم‌ها به قطعات ریزتری 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، الکال 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.

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 (اکسی‌تتراسیکلین)، 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 مهارتی با کولیس دیجیتالی اندازه‌گیری 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 (۱/۵×۱۰^۸) واحد کلنی‌ساز (CFU) در

می‌باشد. از ویژگی‌های مهم عسل خاصیت میکروب‌کشی آن است و به علت وجود بعضی مواد آنتی‌اکسیدانی در عسل، هیچ میکروب یا باسیل و یا ویروسی قادر به زندگی در عسل نمی‌باشد. یعنی بار میکروبی عسل صفر است (۱۱).

بره‌موم ماده‌ای شبیه موم و از تولیدات زنبور عسل می‌باشد، حالت آن خمیری شکل و چسبناک با بوی مطبوع که رنگ آن از سبز تا قهوه‌ای تیره متغیر است. رنگ و عطر بره‌موم در مناطق مختلف متفاوت بوده و در هوای سرد، ترد و شکننده و در هوای گرم، نرم و چسبناک 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 آنتی‌بیوتیک خیلی قوی طبیعی می‌باشد که توسط زنبور عسل از صمغ بعضی گیاهان، شهد و گرده گل ساخته می‌شود و دارای ویتامین‌های B_۱، B_۲، B_۳ و 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. اخیراً 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 اصلی این تحقیق، بررسی و تعیین میزان حساسیت باکتری *Paenibacillus alvei* به عصاره‌های آبی عسل و الکلی (اتانولی و متانولی) بره‌موم زنبورعسل و به‌دست آوردن حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) باکتری *P. alvei* توسط این دو ماده در درمان بیماری لوک اروپایی زنبورعسل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره‌های بره‌موم و عسل

مشخص شده است که فعالیت‌های بیولوژیک یک نمونه، به روش به کار رفته برای تهیه عصاره بستگی دارد. معمول‌ترین مواد به کار رفته برای تهیه عصاره در روش‌های بیولوژیک، 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 کندوهای جمع‌آوری گردد که ظرف سه ماه قبل تحت درمان بیماری‌های مختلف قرار نگرفته باشند). پس از تهیه مواد، در آزمایشگاه دانشگاه تحصیلات تکمیلی

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 (اکسی‌تتراسیکلین)، میزان اثرات ضدباکتریایی آن‌ها کمتر بود ($p < 0/01$) (جدول ۱). در شکل ۱ نیز می‌توان به صورت شماتیک این تفاوت‌ها را مشاهده 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) بر روی 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 منشأ 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 مورد استفاده با افزایش غلظت افزایش یافته است، هرچند که میزان تغییرات آن با افزایش غلظت زیاد نمی‌باشد که دلیل آن می‌تواند فعال بودن آنزیم گلوکز اکسیداز 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

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 مهار

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

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

برای تعیین غلظت مهار (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 باکتری‌ها (MIC) و حداقل غلظتی که باعث مرگ باکتری‌ها (MBC) می‌گردد، سریال‌های رقتی در محیط مولر- هینتون برات از عصاره آبی و عصاره تغلیظ شده الکلی تهیه گردید. سپس به هر کدام از رقت‌ها به ازای هر میلی‌لیتر محیط مایع، 5×10^5 باکتری فعال اضافه گردید. در کنار لوله‌ها از کنترل مثبت (محیط کشت حاوی باکتری، بدون عصاره) و کنترل منفی (محیط کشت بدون باکتری) استفاده گردید. در نهایت لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس نتایج قرائت شد.

برای هر کدام از رقت‌های 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 لوله‌های بدون کدورت روی محیط مولر- هینتون برات 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 مهار (Zone of inhibition)، داده‌ها با نرم‌افزار SAS نسخه ۹٫۱ به روش ANOVA مورد آنالیز آماری قرار

جدول ۱- میانگین قطر هاله عدم رشد دیسک‌های حاوی عصاره‌های آبی عسل، اتانولی و متانولی بره موم بر باکتری پنی‌باسیلوس‌الوئی

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

* فاقد هاله عدم رشد

حلال‌ها اثرات ضدباکتریایی زیادی به دست می‌آید (۴). در تحقیق حاضر مشخص گردید که دیسک‌های کاغذ صافی حاوی ۰/۱ 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. اشتراک‌گاردیا 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 مطالعه‌ی در سال ۲۰۰۱ اثر ضد میکروبی بر موم و عسل را بر روی باکتری اشیشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس بررسی کردند. نتایج با روش گرادینت پلیت و قطر هاله، MIC و MBC بررسی شد. ترکیب نتایج از تمام روش‌ها نشان داد که هر دو برهموم و عسل فعالیت ضدباکتری 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 باکتری گرم منفی اشیشیاکلی برای MIC و MBC حساسیت بیشتری دارد. همچنین پارک و همکاران (۱۷) اثر عصاره آبی برهموم را بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا و باسیلوس سرئوس بررسی کردند و نتایج این تحقیق نشان داد عصاره آبی تاثیر یکسان بر این دو باکتری دارد. در این بررسی نشان داده شد که غلظت ۰/۳۲ میلی‌گرم 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

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 بر آن، عسل تولید شده توسط کندو از منابع گیاهی متفاوت تولید می‌شود که بر اساس ترکیبات مختلف متابولیت ثانویه و خواص ضدباکتریایی گیاهان مورد استفاده، 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 فلاوونوئیدهای 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

جدول ۲- میزان هاله رشد در غلظت‌های مختلف عصاره‌های مختلف برهموم و عسل برای باکتری پنی‌باسیلوس‌الوئی

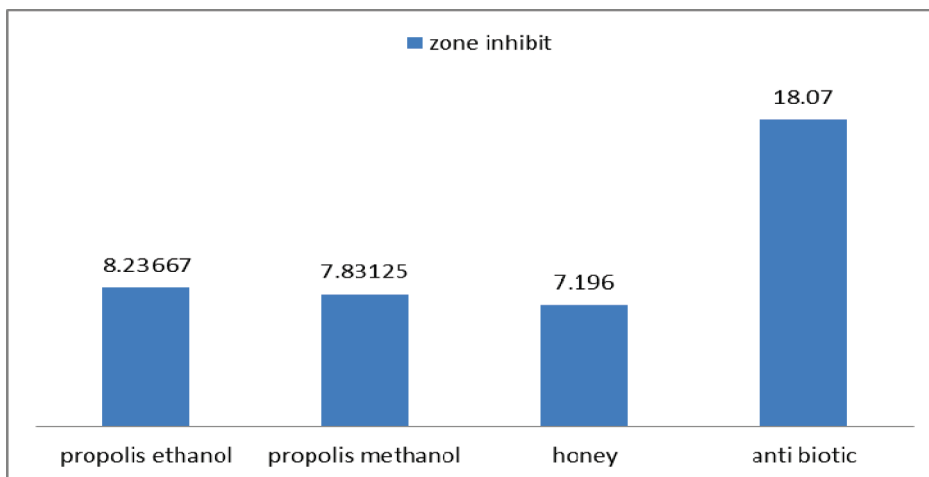
ماده ضد باکتریایی رقت	عسل آبی	بره موم اتانولی	بره موم متانولی
۰/۰۱	۶/۳	۶/۴	۶/۳
۰/۰۲	۶/۴۱	۷/۰۰	۶/۶
۰/۰۳	۶/۷۵	۷/۵	۷/۰۶
۰/۰۴	۶/۸۴	۷/۶۹	۷/۷
۰/۰۵	۷/۰۰	۸/۰۹	۸/۲
۰/۰۶	۷/۱۱	۹/۰۰	۸/۳
۰/۰۷	۷/۴۳	۹/۰۸	۸/۵
۰/۰۸	۷/۷۶	۹/۱	۸/۸۸
۰/۰۹	۸/۰۰	۱۰/۲۴	۹/۰۵
۰/۱	۸/۳۶	۱۰/۲۷	۹/۴۱

مهار رشد باکتری‌های گرم منفی بیشتر از این میزان بوده است.

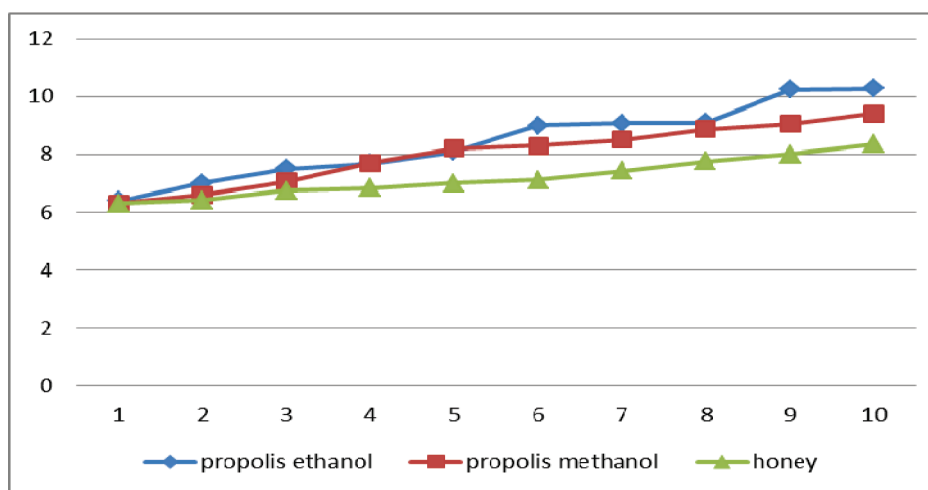
مقایسه اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های مختلف مورد استفاده

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

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



شکل ۱- میانگین قطر هاله عدم رشد دیسک‌های حاوی عصاره‌های مورد استفاده بر باکتری پنی باسیلوس الوئی



شکل ۲- تغییرات اندازه هاله رشد بر اساس غلظت در عصاره‌های مختلف بره موم و عسل برای باکتری پنی باسیلوس الوئی

2014. Diversity of honey stores and their impact on pathogenic bacteria of the honeybee, *Apis mellifera*. *Ecology Evolution* 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. Mărghițaș, 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>. Accessed February 2013
- 12- Koneman, E. W., Allen, S. D. Boewell, J. V. R. and Sommers, H. M. 1983. Color atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Second Edition. B. Lippincott company, Philadelphia.
- 13- Neshat Khosravi, N., S. Darvishi and K. Davari. 2016. Antibacterial activity of aqueous and alcoholic extracts of Kurdistan propolis on *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Journal of Kurdistan University* 20 (6): 97-106.
- 14- Mihai, C.M., L. A. Mărghițaș, 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 activity of propolis on oral microorganisms. *Current Microbiology* 36 (1): 24 - 28.
- 18- Shahrestani, N. 2015. Honeybees and its culture: the complete

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 پنی‌باسیلوس الوئی معنی‌دار می‌باشد ($p < 0/01$). 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 ($p < 0/01$). به هر حال 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 تایلوژین دارای MIC $0/0078$ تا $0/5$ 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 پنی‌باسیلوس الوئی عامل ثانویه بیماری لوک اروپایی زنبورعسل می‌باشد و در صورت انجام بررسی‌های بیشتر امکان استحصال ماده موثره اصلی از این فرآورده‌ها 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 فرآوری 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, E., 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.

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. Mo-haghegh. 2009. The effects of alcoholic extract of propolis obtained from Iran bee hives on the growth of *Trychophyton mentagrophytis*, *Trychophyton rubrum* and *Trichophyton verrucosum*. *Journal of Is-fahan Medical School* 27 (95): 232-241.

