فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی، الکلی و بافری بره موم زنبور عسل بر باکتری‌های دهانی و روده‌ای

مهنوش ابوتراب[1]، محمد گلی[2*]، الهام خسروی[3]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۲. دانشیارگروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۳. مربی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

[*]نویسنده مسئول: *mgolifood@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۰۳

چکیده

بره‌موم به دلیل داشتن ترکیباتی با منشاء گیاهی مانند پلی‌فنول‌ها و پروتئین‌هایی مانند 10-HDA نقش ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد انگلی، آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد پوسیدگی دندان ایفاء می‌کند. از دیرباز دارای نقش درمانی برای بیماری‌ها به‌ویژه عفونت‌ها بوده است. در این تحقیق فعالیت ضد میکروبی عصاره الکلی، آبی و بافری بره‌موم بر باکتری‌های دهانی شامل: استرپتوکوکوس موتانس، *استرپتوکوکوس اپیدرمیدیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و باکتری‌های معده-روده‌ای شامل: *استرپتوکوکوس سالیواریوس* و *اشریشیا کلی* با استفاده از روش حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) در محیط کشت مایع (TSB) و روش انتشار دیسک (قطر هاله عدم رشد) مورد بررسی قرار گرفت. حداقل غلظت مهارکنندگی بین سه عصاره الکلی، آبی و بافری تفاوت معنی‌داری نداشت یعنی اثر حلال ها بر حلالیت ترکیبات ضدباکتریایی بره موم تقریبا یکسان است. مقاوم‌ترین باکتری گرم مثبت نسبت به عصاره الکلی و بافری بره موم، *استرپتوکوکوس موتانس* و مقاوم‌ترین باکتری نسبت به همه عصاره‌ها، *اشریشیا کلای* گزارش شد. در ارتباط با عصاره آبی بره موم، تفاوت معنی‌داری بین مقاومت باکتری‌ها دیده نشد ($P>0.05$). در آزمون انتشار دیسک، میزان افزایش غلظت عصاره‌ها تاثیر به سزایی در میزان کشندگی باکتری‌ها داشت و حساس‌ترین باکتری نسبت به عصاره‌ها باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و مقاوم‌ترین باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* شناخته شد. هم‌چنین باکتری‌ها نسبت به عصاره بافری بیشترین حساسیت را از خود نشان دادند.

کلید واژه ها: عصاره بره موم، فعالیت ضد میکروبی، حداقل غلظت مهارکنندگی، انتشار دیسک.

مقدمه

بره موم نوعی ماده صمغی است که توسط زنبور عسل از ترشحات درختان، گیاهان، جوانه و برگ به‌دست می‌آید. به‌طور میانگین بره‌موم حاوی ۵۰- ۵۵ درصد رزین، ۳۰ درصد موم، ۱۰ درصد اسانس، پنج درصد گرده و مواد مختلف دیگر می‌باشد (Anjum et al., 2019). بره‌موم به علت داشتن فلاوونوئیدهایی مانند کوئرستین و روتین دارای خاصیت ضد میکروب و ضد ویروس بوده که مکانیسم بازداری این ترکیبات به مهار پلی‌مراز ویروسی و باندکردن نوکلئیک اسیدو پروتئین کپسید ویروسها برمیگردد (Boukraa et al., 2013). تهیه بره‌موم به صورت عصاره الکلی یا آبی رایج‌ترین روش استخراج می‌باشد. استخراج بره‌موم به‌وسیله اتانول دارای معایبی نظیر باقی ماندن بوی اتانول، عوارض جانبی و عدم تحمل به اتانول توسط برخی از مصرف‌کنندگان می‌باشد. هم‌چنین استفاده از آب به‌عنوان حلال برای استخراج بره‌موم نیز بدون هیچ‌گونه عوارض جانبی بوده ولی میزان حل‌شدن ترکیبات فعال بره‌موم در آب کمتر است. بیش از ۱۵۰ ترکیب مختلف از جمله ترپنوئیدها، پلی‌فنول‌ها، استروئیدها و اسیدهای آمینه و آلی در بره‌موم موجود می‌باشد که میزان آن با توجه به منطقه جغرافیایی، نوع گیاه، نوع استخراج متفاوت است (Ferreira et al., 2017). بره‌موم و عصاره های آن به دلیل خاصیت ضد عفونی کننده، ضد التهابی، آنتی اکسیدان، آنتی باکتریال، ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد انعطاف‌پذیر، ضد سرطانی و تنظیم سیستم ایمنی بدن کاربردهای بسیاری در درمان

بیماری‌های مختلف دارند (Sanchez-Moreno et al., 1999; Pasupuleti et al., 2017) به علت وجود این ترکیبات در بره‌موم، این ماده به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی شناخته شده و طبق بررسی‌های محققین مصرف مکرر آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی باعث کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی و هم‌چنین سرطان می‌شود. بره‌موم و عصاره های آن به دلیل خاصیت ضد عفونی کننده، ضد التهابی، آنتی اکسیدان، آنتی باکتریال، ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد انعطاف‌پذیر، ضد سرطانی و تنظیم سیستم ایمنی بدن کاربردهای بسیاری در درمان بیماری‌های مختلف دارند. آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند به نحو مطلوبی از تغییر رنگ و طعم مواد غذایی حاصل شده از واکنش‌های اکسیداسیون جلوگیری کنند (Halliwell et al., 1995). بره‌موم به‌عنوان ماده ضد التهاب در مهار سنتز پروستاگلاندین و فعال کردن تیموس و کمک کردن به سیستم ایمنی با افزایش فعالیت فاگوسیتوز و تحریک ایمنی سلولی و افزایش ترمیم بافت‌های اپی‌تلیال نقش دارد (Ozan et al, 2004). بررسی اثر ضدمیکروبی بره‌موم و عسل بر باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که هر دو ماده اثر ضدمیکروبی بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* دارند و حتی تاثیرپذیری *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به بره‌موم بیشتر از *اشریشیا کلی* است (Motior Rahman et al., 2010). در سال ۱۹۹۰ گرانج و دیوی دریافتند که محلول‌های رقیق‌شده به نسبت ۲۰:۱ بره‌موم به‌طور کامل رشد سویه (MRSA) باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را مهار می‌کند. در این تحقیق فعالیت ضد میکروبی عصاره الکلی، آبی و بافری بره‌موم بر باکتری‌های دهانی شامل: *استرپتوکوکوس (موتانس، اپیدرمیدیس)*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و باکتری‌های معده-روده‌ای (*استرپتوکوکوس سالیواریوس* و *اشریشیا کلی*) با استفاده از روش حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) در محیط کشت مایع (TSB) و روش انتشار دیسک (قطر هاله عدم رشد) مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

آماده‌سازی و عصاره‌گیری

بره‌موم به صورت خام از زنبورستان‌های استان اصفهان تهیه شد و برای عصاره‌گیری و بررسی‌های آزمایشگاهی به مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی اصفهان انتقال داده شد. تهیه عصاره به روش خیساندن[1] انجام گرفت. بدین صورت که عصاره‌گیری با سه حلال مختلف شامل: آب، اتانول ۲۰ درصد، و بافر فسفات انجام شد.

عصاره آبی ، اتانولی و بافری

میزان ۲۰ گرم بره‌موم به‌ترتیب، با استفاده از آب خالص با pH=۷ ، اتانول ۲۰ درصد و بافر فسفات (شامل منو سدیم فسفات و سدیم فسفات با pH=۷) به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به‌مدت هفت روز در دمای اتاق در تاریکی با شیکر همگن شد، محلول توسط کاغذ واتمن شماره یک فیلتر گردید. عمل فیلتر دو بار تکرار شد. سپس حلال‌ها با استفاده از دستگاه روتاری تحت خلاء در دمای ۳۸ درجه سلیسیوس تبخیر شد و عصاره خشک شده در ظروف شیشه‌ای تیره و استریل در دمای چهار درجه سلیسیوس نگهداری شد (Lu et al., 2005; Mello et al., 2012).

آماده‌سازی باکتری‌ها

سوش‌های میکروبی مورد مطالعه در این پژوهش (جدول۱) شامل گرم مثبت و گرم منفی به صورت آمپول‌های لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی تهران- ایران تهیه شد و به آزمایشگاه میکروبی انتقال یافت.

1- Maceration

هر کدام از باکتری‌ها در محیط کشت مایع TSB کشت داده شد و تا مدت زمان مورد نظر که باکتری‌ها فعال شدند این روند ادامه پیدا کرد و سپس هر کدام از باکتری‌ها در محیط کشت اختصاصی خود کشت داده شد.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی[1]

حداقل غلظت مهارکنندگی رشد یا MIC به‌عنوان استاندارد طلایی برای تعیین حساسیت میکروارگانیسم‌ها به مواد ضد میکروبی در نظر گرفته شده است و به همین دلیل بر دیگر آزمون‌های تعیین حساسیت ارجحیت دارد. MIC به‌عنوان حداقل غلظتی از ماده ضد میکروبی در نظر گرفته شده که توانایی مهار رشد باکتری‌ها را پس از یک شب گرم‌خانه‌گذاری دارد. جهت تعیین MIC رقت‌های سریالی از عصاره‌های برەموم به ترتیب (۰/۰۶۳، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در لوله‌های حاوی محیط کشت TSB تهیه گردید و به هر کدام از لوله‌ها ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری که مطابق با لوله نیم مک فارلند استاندارد شده بود، اضافه گردید. یک لوله حاوی محیط کشت و باکتری جهت کنترل مثبت و یک لوله حاوی محیط کشت و برەموم جهت لوله شاهد تهیه گردید. سپس عدد جذب در طول موج ۶۲۵ نانومتر در زمان صفر قرائت شد. تمامی لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلیسیوس قرار گرفتند و عدد جذب در همان طول موج خوانده شد و حداقل غلظت مهارکنندگی رشد مطابق با معادلات رگرسیونی جدول ۱ محاسبه گردید (کومار و همکاران[2] ۲۰۰۶؛ جلالی و همکاران، ۲۰۰۷).

بررسی اثر ضد میکروبی ژله رویال و تعیین شاخص قطر هاله عدم رشد[3]

محلول‌های مورد آزمون از برەموم نگهداری شده در دمای سردخانه، دور از نور و رطوبت، در غلظت‌های ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درصد وزنی / حجمی در حلال آبی با استفاده از آب مقطر استریل و حلال بافر با استفاده از محلول بافر فسفات (pH=7) تهیه شدند. جهت تعیین اثر ضد میکروبی هر دو نوع محلول به روش انتشار دیسک ، سوسپانسیون باکتری معادل نیم مک فارلند تهیه شد و روی محیط کشت مولر هینتون آگار تلقیح گردید و سپس دیسک‌های آغشته به غلظت‌های مختلف (۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درصد وزنی/حجمی) از عصاره‌های آبی، الکلی و بافری برەموم با فاصله استاندارد بر روی محیط کشت قرار گرفت. بعد از گرمخانه‌گذاری ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس، قطر هاله عدم رشد برای هر باکتری اندازه‌گیری شد (Wallace et al., 1979).

آنالیز آماری پژوهش

آنالیز آماری در قالب طرح کاملا تصادفی توسط نرم افزار آماری SPSS در سه تکرار و مقایسه میانگین نمونه‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد صورت گرفت. نمودارها توسط EXCEL 2010 ترسیم گردید.

نتایج

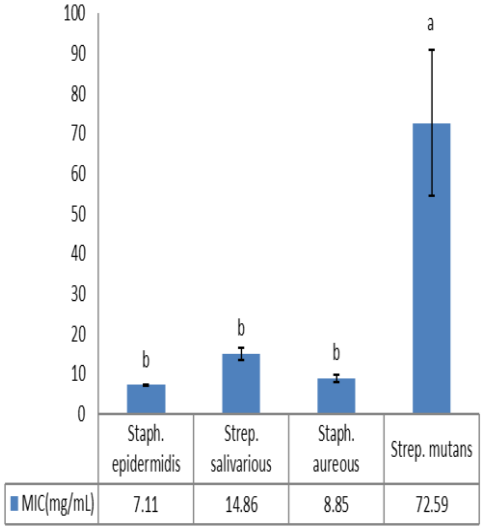
بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی مربوط به باکتری‌های مورد مطالعه

شکل (۱) بیانگر نتایج MIC در بین چهار باکتری گرم مثبت مورد آزمایش است که نتایج حاکی از آن است که MIC برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *استافیلوکوکوس‌اورئوس* و *استرپتوکوکوس سالیواریوس* اختلاف معنی‌داری نداشتند ($p>0/05$). باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* با سایر باکتری‌ها از نظر MIC دارای اختلاف معنی‌داری داشت ($p<0/05$).

1 - Minimum inhibitory concentration (MIC)
2- Kumar et al
3- diameter of inhibition zone

جدول (۱): جزییات باکتری های مورد استفاده دراین پژوهش

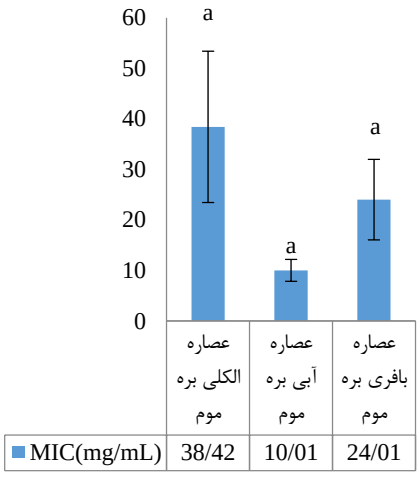
شماره سویه	سویه باکتریایی	فرمول رگرسیونی محاسبه MIC
PTCC 11595	*اشریشیا کلی*	OD= -0.9356C+0.725 (R^2= 0.93)
PTCC A9596	*استافیلوکوکوس اورئوس*	OD= -0.7546C+0.572 (R^2= 0.85)
ATCC 35668	*استرپتوکوکوس موتانس*	OD= -0. 668C+0.375 (R^2= 0.95)
ATCC 12228	*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*	OD= -0.8552C+0.599 (R^2= 0.91)
PTCC 53.158	*استرپتوکوکوس سالیواریوس*	OD= -0.6401C+0.840 (R^2= 0.98)



*حروف مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ میباشند (P<۰/۰۵)

شکل(۱): نمودار مقایسه MIC (حداقل غلظت مهارکنندگی) در بین باکتری‌های مورد آزمون

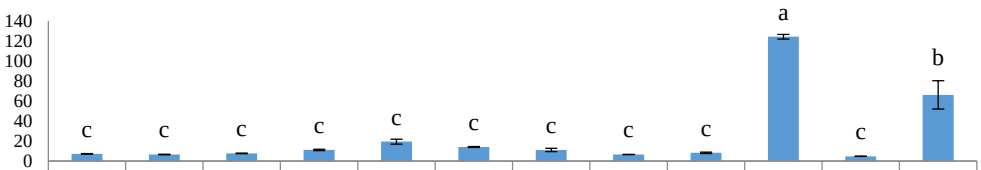
نتایج حاصل از شکل (۲) نشان داد که اثرگذاری سه عصاره آبی، الکلی و بافری برهموم اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ درصد نداشت اما عصاره آبی برهموم با کمترین (MIC) ۱۰/۰۱ mg/mL و عصاره الکلی با بیشترین (MIC) ۳۸/۴۲ mg/mL نشان‌دهنده آن است که عصاره آبی دارای مواد موثر در بازداری از رشد باکتری‌ها است.



*حروف مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ میباشند (P<۰/۰۵)

شکل(۲): نمودار مقایسه MIC (حداقل غلظت مهارکنندگی)در بین عصاره‌های مختلف بره موم

شکل (۳) به بررسی میزان حساسیت باکتری‌ها نسبت به عصاره‌ها و مقایسه حداقل غلظت مهارکنندگی آن‌ها پرداخته است. حداکثر میزان MIC مربوط به باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* در عصاره الکلی و بافری بود که با سایر باکتری‌ها و نسبت به سایر عصاره‌ها اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). در بین سایر عصاره‌ها و اثر آن بر باکتری‌ها اختلاف معنی‌داری دیده نشد و با توجه به میزان کمترین MIC می‌توان دریافت که عصاره‌های برهموم بر *استرپتوکوکوس سالیواریوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس اپیدرمیدیس* تاثیر داشته و این باکتری‌ها نسبت به انواع عصاره‌ها حساسیت بالایی دارند.



	Staph. epidermidis / عصاره الکلی	Staph. epidermidis / عصاره آبی	Staph. epidermidis / عصاره بافری	Strep. salivarius / عصاره الکلی	Strep. salivarius / عصاره آبی	Strep. salivarius / عصاره بافری	Staph. aureus / عصاره الکلی	Staph. aureus / عصاره آبی	Staph. aureus / عصاره بافری	Strep. mutans / عصاره الکلی	Strep. mutans / عصاره آبی	Strep. mutans / عصاره بافری
MIC(mg/mL)	7/20	6/53	7/60	11/10	19/40	14/07	11/03	6/50	8/23	124/33	4/65	66/13

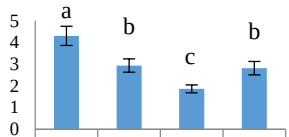
*حروف مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشند(P<۰/۰۵)

شکل(۳): نمودار مقایسه MIC (حداقل غلظت مهار کنندگی) و اثر عصاره بر باکتری‌ها

بررسی قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری‌های مورد مطالعه

قطر هاله عدم رشد بین چهار باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *استرپتوکوکوس سالواریوس* و *استرپتوکوکوس موتانس* در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی داری وجود دارد (p<۰/۰۵). هم چنین در هیچ یک از غلظت‌ها، قطر هاله عدم رشد برای باکتری *اشریشیا کلی* مشاهده نشد. باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* حساس‌ترین باکتری با بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم‌ترین باکتری با کم‌ترین قطر هاله عدم رشد به عصاره‌های بره‌موم مشاهده شد و دو باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* و *استرپتوکوکوس سالواریوس* نسبت به هم اختلاف معنی‌داری نداشتند (p<۰/۰۵).

در شکل ۵ نتایج حاصل از مقایسه اثر متقابل نوع باکتری و نوع عصاره بر قطر هاله عدم رشد نشان داده شده است. عصاره الکلی بره‌موم نسبت به عصاره آبی و بافری بره‌موم بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد را بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* داشته است ولی اختلاف معنی‌داری بین سه عصاره وجود ندارد. در باکتری *استرپتوکوکوس سالواریوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* عصاره بافری نسبت به دو عصاره دیگر بهتر عمل کرده ولی اختلاف معنی‌داری بین سه عصاره وجود ندارد. در باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* دو عصاره بافری و آبی بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد را دارا بودند و اختلاف معنی‌داری نسبت به عصاره الکلی داشتند.

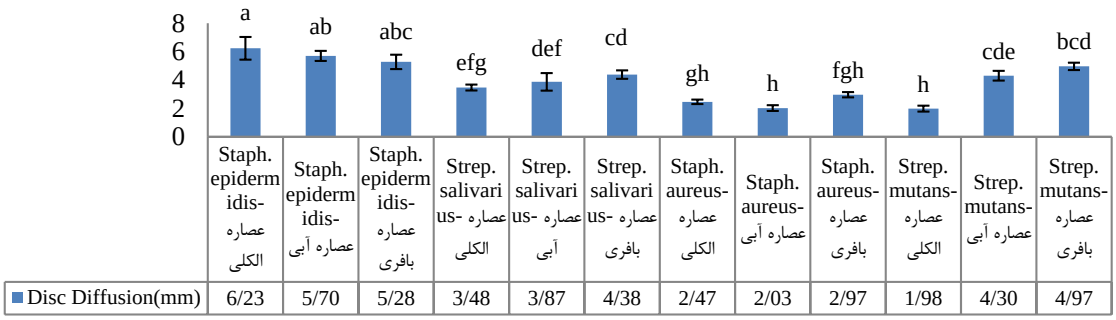


	Staph. epidermidis	Strep. salivarius	Staph. aureus	Strep. mutans
Disc Diffusion(mm)	4/30	2/93	1/86	2/81

شکل(۴): نمودار مقایسه قطر هاله عدم رشد در باکتری‌های مختلف به روش انتشار دیسک

*حروف مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشند (P<۰/۰۵)

در مجموع باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* حساس‌ترین باکتری و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم‌ترین باکتری نسبت به انواع عصاره‌های بره موم بودند.



	Staph. epidermidis- عصاره الکلی	Staph. epidermidis- عصاره آبی	Staph. epidermidis- عصاره بافری	Strep. salivarius- عصاره الکلی	Strep. salivarius- عصاره آبی	Strep. salivarius- عصاره بافری	Staph. aureus- عصاره الکلی	Staph. aureus- عصاره آبی	Staph. aureus- عصاره بافری	Strep. mutans- عصاره الکلی	Strep. mutans- عصاره آبی	Strep. mutans- عصاره بافری
Disc Diffusion(mm)	6/23	5/70	5/28	3/48	3/87	4/38	2/47	2/03	2/97	1/98	4/30	4/97

شکل(۵): نمودار مقایسه اثر متقابل قطر هاله عدم رشد و نوع عصاره بر هر یک از باکتری‌ها به روش انتشار دیسک
*حروف مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشند (P<۰/۰۵)

بحث

در این مطالعه نتایج ارزیابی خواص ضد میکروبی عصاره‌های آبی، الکلی، و بافری بره موم بر چهار باکتری پاتوژنی گرم مثبت شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *استرپتوکوکوس موتانس* و *استرپتوکوکوس سالیواریوس* و باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* نشان داد که باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری گرم منفی حساس‌تر هستند. به‌طور کلی باکتری‌های گرم منفی نسبت به گرم مثبت‌ها به ترکیبات فنولیک موجود در بره موم مقاوم‌تر هستند که علت این مسئله به دلیل تفاوت در ساختمان دیواره سلولی آن‌ها می‌باشد چون باکتری‌های گرم مثبت فاقد دیواره لیپوپلی‌ساکاریدی است در صورتی که این دیواره در باکتری‌های گرم منفی ممکن است از ورود ترکیبات فعال به غشای سیتوپلاسمی جلوگیری به‌عمل آورد (مونتویل و برونو،[1] ۱۹۹۴)، که دلیلی بر حساسیت باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی است. نتایج این تحقیق با پژوهش‌های مازولا و همکاران[2] (۲۰۰۶) و کومار و همکاران[3] (۲۰۰۶) که نشان دادند، باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی نسبت به عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی، ترکیبات شیمیایی ضدمیکروبی، بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها و حتی بسیاری از داروها حساسیت بیشتری را نشان می‌دهند، مطابقت دارد. تقریبا همه ترکیبات ضد میکروبی شناخته شده گیاهی، به صورت آروماتیک یا ترکیبات آلی هستند و بیشتر در حلال‌های اتانولی و متانولی استخراج می‌شوند. در طب سنتی از عصاره‌های آبی استفاده می‌شود، اما تحقیقات نشان داده‌اند عصاره‌های تهیه شده با حلال‌های آلی، اثر ضدمیکروبی پایدارتر و بیشتری دارند، زیرا بیشتر ترکیبات فعال ضدمیکروبی شناخته شده، در آب نامحلول هستند و بنابراین عصاره‌های حاصل از حلال‌های آلی مانند اتانل، متانل، کلروفرم، اتر و استون برای استخراج ترکیبات ضدمیکروبی توانمندی بیشتری دارند که در بین این ترکیبات آلی اتانل کارآمدتر بوده است (Ekwenye and Elegalam, 2005; Martinotti and Ranzato, 2015). افزودن عصاره اتانولی بره موم در ترکیب دهان‌شویه ها و خمیردندان‌ها باعث جلوگیری از عفونت میکروبی شده و در درمان التهاب لثه مؤثر بوده است (Anjum et al., 2019).

باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بیش‌ترین حساسیت و بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد را نسبت به سایر باکتری‌ها در عصاره الکلی نسبت به سایر عصاره‌ها نشان داد. *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس موتانس* و *استرپتوکوکوس سالواریوس* نسبت به عصاره بافری حساسیت بیش‌تری نشان دادند و کم‌ترین قطر هاله عدم رشد مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* بود که نشان‌دهنده مقاوم‌تر بودن این باکتری نسبت به سایر باکتری‌های گرم مثبت است. نتایج حاصل شده با

1- Montvill and Bruno
2- Mazzola et al
3- Kumar et al

نتایج بهرامی و همکاران (۱۳۸۸) مطابقت دارد ولی با یافته‌های اشراقی و والافر (۱۳۸۲) مطابقت ندارد. علت این اختلاف می‌تواند ناشی از واریته گیاه، منطقه جغرافیایی، روش استخراج و نوع حلال به‌کار رفته جهت استخراج باشد (جرکویس و همکاران، ۲۰۱۱). باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* دارای کم‌ترین، حداقل غلظت مهارکنندگی به‌ترتیب ۸/۸۵ mg/mL و ۷/۱۱ بود و با نتایج (کالوگروپلوس و همکاران[1] (۲۰۰۹) در مورد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مطابقت نداشت. البته با نتایج لی‌چانگ لو و همکاران (۲۰۰۳) که بر روی برەموم از چندین منطقه مختلف، خواص ضدمیکروبی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت هم‌سو بود. هم‌چنین با نتایج پژوهش رحمان و همکاران (۲۰۱۰) که با افزایش ماده موثره برەموم میزان کشندگی باکتری‌ها به‌مراتب بیشتر شده بود کاملا مطابقت داشت. نتایج اثر ضد میکروبی عصاره آبی و بافری بر باکتری‌های مورد مطالعه مشابه‌تر بود که می‌تواند ناشی از قابلیت انحلال ترکیبات موثره محلول در آب و بافر و ایجاد خاصیت مشابه ضدباکتریایی برەموم باشد. با این حال اشراقی و سیف‌الهی (۲۰۰۳) در بررسی اثر عصاره‌های آبی و اتانولی برەموم و ژله رویال بر سویه‌های مختلف باکتری‌ها، تاثیر متفاوت این دو نوع عصاره را به دلیل قابلیت حل‌شدن متفاوت ترکیبات پروتئینی با خاصیت ضدباکتریایی مانند 10-HDA گزارش کرده اند. از آن جایی که این ترکیب مهم محلول در اتانول است، رشد همه سویه‌های مورد تیمار باعصاره الکلی کاهش بیشتری یافت.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی حاکی از آن بود که بین سه عصاره الکلی، آبی و بافری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد و به این معنا است که اثر حلال‌ها بر حلالیت ترکیبات ضد باکتریایی برەموم تقریبا یکسان است. هم‌چنین باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* بیش‌ترین مقاومت را در این آزمون از خود نشان داد و میزان مصرفی عصاره ۷۲/۵۹ mg/mL بود. باکتری *اشریشیا کلی* نسبت به همه عصاره‌ها مقاومت بالایی نشان داد.

نتایج حاصل از خاصیت ضدمیکروبی عصاره‌های برەموم در آزمون انتشار دیسک نشان داد که میزان افزایش غلظت عصاره‌ها تاثیر به‌سزایی در میزان کشندگی باکتری‌ها دارد و حساس‌ترین باکتری نسبت به عصاره‌ها باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و مقاوم‌ترین باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* شناخته شد. هم‌چنین باکتری‌ها نسبت به عصاره بافری بیش‌ترین حساسیت را از خود نشان دادند.

منابع

1. اشراقی، سیدسعید و والافر، شیرین. (۱۳۸۲). بررسی اثرات ضد باکتریایی بره موم کندوی زنبور عسل بر گونه های بیماریزای نوکاردیا. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، سال ۱۱، شماره ۲، صفحه۴۸-۴۲.

2. بهرامی، نغمه.، مومن بیت الهی، جلیل.، منصوریان، آرش.، اسماعیلی، معصومه.، امانلو، مسعود و محمدنیا، عبدالرضا. (۱۳۸۸). بررسی اثر ضد میکروبی عصاره بره موم (Propolis) بر شایعترین میکروارگانیسم های آسیب زای دهان (کاندیدا آلبیکانس، استرپتوکوک موتانس، اکتینوباسیلوس) در شرایط آزمایشگاهی. مجله انجمن اسلامی دندانپزشکی ایران، سال ۲۱، شماره ۱، صفحه ۳۹-۳۳.

3. Anjum S.I. Ullah A. Khan K.H. Ataullah M. Khan H. Ali H. Amjad bashir M. Tahir M. Ansari M.J. Ghramh H.A. Adgaba N and Canta Dash C. 2019. Composition and functional properties of propolis (bee glue):

1- Kalogeropoulos et al

A review. Saudi J. Biol. Sci. 26(7): 1695-1703.

4. Boukraa L. Abdellah F and Ait-Abderrahim L. 2013. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, Edition: Vol. 2, Chapter: Antimicrobial Properties of Bee Products and Medicinal Plants, Publisher: Formatex Research Center, Editors: A. Méndez-Vilas, pp.960-970.

5. Cheman Y and Jaswir I. 2000. Effect of rosemary and sage extracts on frying performance of refined, bleached and deodorized (RBD) palm olein during deep-fat frying. Food Chem. 69(3): 301-307.

6. Ekwenye U.N and Elegalam N.N. 2005. Antibacterial Activity of Ginger (zingiber officinale) Roscoe and Garlic (Allium sativum L.) Extracts on Escherichia coli and Salmonella typhi. Int. J Mol. Adv. Sci. 1(4): 411-417.

7. Eshraghi S and Seifollahi F. 2003. Antibacterial effects of royal jelly on different strains of bacteria. Iran J. Public Health. 32(1): 25-30.

8. Ferreira J.M. Fernandes-Silva C.C. Salatino A. Negri G and Message D. 2017. New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. J. Sci. Food Agric. 97(11): 3552-3558.

9. Halliwell B. Aeschbach R. Loliger J and Arouma O.I. 1995. The characterization of antioxidants. Food Chem. Toxicol. 33(7): 601-617.

10. Kalogeropoulos N. Konteles S. Troullidou E. Mourtzinos I and Karathanos V. 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. Food Chem. 116: 452-461.

11. Kumar V.P. Chauhan N.S. Padh H and Rajani M. 2006. Search for antibacterial and antifungal agent from India medicinal plants. J. Ethopharm. 107(2): 182-188.

12. Martinotti S and Ranzato E. 2015. Propolis: a new frontier for wound healing. Burns and Trauma, 3(1): 1-7.

13. Mello B.C.B.S and Hubinger M.D. 2012. Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. Int. J. Food Sci. Tech. 47(12): 2510-2518.

14. Motior-Rahman M. Richardson A and Sofian-Azirun M. 2010. Antibacterial activity of propolis and honey against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. African J. Microbiol. Res. 4(16): 1872-1878.

15. Montviile T.J and Bruno M.E.C. 1994. Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. Int. J. Food Microbiol. 24: 3-74.

16. Mazzola P.G. Martins A.M.S and Penna T.C.V. 2006. Chemical resistance of the gram-negative bacteria to different sanitizers in a water purification system. BMC Infect. Dis. 6:131.

17. Lu L. Chen Y and Chou C. 2005. Antibacterial activity of propolis against Staphylococcus aureus. Int. J. Food Microbiol. 102: 213-220.

18. Ozan F. Sumer Z. Polat Z.A. Er K. Ozan U and Deger O. 2007. Effect of mouthrinse containing propolis on oral microorganisms and human gingival fibroblasts. Eur. J. Dent. 1(4): 195-201.

19. Pasupuleti V.R. Sammugam L. Ramesh N and Hua Gan S. 2017. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. Oxid Med Cell Longev. doi: 10.1155/2017/1259510.

20. Sanchez-Moreno C. Larrauri J.A and Saura-Calixto F. 1999. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. Food Res. Int. 32(6): 407-412.

21. Wallace R. Dalovisio J and Pankey G. 1979. Disk diffusion testing of susceptibility of Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium chelonei to antibacterial agents. Antimicrob. Agents Chemother. 16(5): 611-614.

Antimicrobial activity of aqueous, alcoholic and buffer extracts of honey-bee propolis on oral-intestinal bacteria

Abotorab M[1], Goli M[2]*, Khosravi E[3]

1. M.Sc. Graduated, Department of Food Science and Technology, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
2. Associate professor, Department of Food Science and Technology, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
3. M.Sc., Department of Food Science and Technology, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

***Corresponding author:** *mgolifood@yahoo.com*

Received: 24 June 2019 Accepted: 25 September 2019

Abstract

Propolis plays an antibacterial, anti-fungal, anti-parasitic, antioxidant, anti-inflammatory, anti-caries role due to its plant-derived compounds such as polyphenols and proteins such as 10-HDA. It has long been a therapeutic role for diseases, especially infections. In this study antimicrobial activity of alcoholic, aqueous and buffer extract of propolis, on oral bacteria including *Streptococcus mutans*, *Streptococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, and gastro-intestinal bacteria including *Streptococcus salivarius* and *Escherichia coli* measured using micro broth dilution test for assessing of minimum inhibitory concentration (MIC) and disk diffusion test for assessing of diameter of inhibition zone. The MIC did not differ significantly between the three alcoholics, aqueous and buffer extracts, i.e., the effect of the solvents on the solubility of the antibacterial compounds was approximately the same ($P > 0.05$). The most resistant gram-positive bacterium to alcoholic and buffer extract, *Streptococcus mutans* and the most resistant to all extracts, *Escherichia coli*, were reported. There was no significant difference between the bacterial resistance in the aqueous extract of propolis ($P> 0.05$). In the disk diffusion test, increasing the concentration of extracts had a significant effect on the bacterial killing rate and was identified as the most susceptible bacterium to the extracts *Staphylococcus epidermidis* and the most resistant bacterium *Staphylococcus aureus*. The bacteria were also more sensitive to buffer extract.

Keywords: Propolis extract, Antimicrobial properties, Minimum inhibitory concentration, Disc diffusion.