JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره چهاردهم، شماره دوم، ۱۳۹۷، پیاپی ۳۷: ۳۵-۲۵

فعالیت ضدباکتریایی وآنتی‌اکسیدانی چند نوع بره موم زنبور عسل جمع آوری شده از مناطق جغرافیایی مختلف استان گلستان

مریم گرمنی[۱]، هادی کوهساری[۲*]، سیده زهرا سیدالنگی[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم وصنایع غذایی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

۲- استادیار گروه میکروبیولوژی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

۳- دانشیار گروه شیمی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

تاریخ دریافت:۹۶/۳/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۲۰

چکیده

بره موم یکی از مهم‌ترین فرآورده‌های فرعی زنبورعسل است. فعالیت‌های بیولوژیکی بره موم به موقعیت جغرافیایی و پوشش گیاهی منطقه مرتبط است. هدف از مطالعه حاضر بررسی فعالیت ضدباکتریایی و آنتی اکسیدانی سه نوع بره موم با موقعیت جغرافیایی مختلف از استان گلستان بود. ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی بر اساس انتشار در آگار و با روش چاهک انجام شد. کمترین غلظت مهارکنندگی و کمترین غلظت باکتری کشی با روش ماکرودایلوشن تعیین شد. محتوای کل فنلی و فلاونوئیدی و توانایی مهار رادیکال آزاد نمونه های بره موم نیز تعیین گردید. باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری به غلظت‌های مختلف نمونه‌های بره موم نشان دادند به طوریکه کمترین غلظت مهارکنندگی بره موم جمع آوری شده از منطقه جغرافیایی شصت کلا برای *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۰/۰۴۸ و ۰/۱۹ میلی گرم بر میلی لیتر و برای *شیگلا دیسانتری* و *اشریشیا کلی* به ترتیب۳/۱۲ و ۳/۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش شد. بره موم منطقه جهان نما با میانگین۱۴۲/۶۷ میلی گرم معادل اسیدگالیک در هرگرم و ۳۵/۲۴ میلی گرم معادل کوئرستین در هر گرم نمونه به ترتیب بیشترین محتوای کل فنلی و فلاونوئیدی را نشان دادند. نمونه شصت کلاً بیشترین فعالیت مهار رادیکال DPPH را نشان داد. بین فعالیت ضد باکتریایی نمونه های بره موم با محتوای فنلی و فلاونوئیدی آنها ارتباط مستقیم دیده شد و عدم ارتباط بین محتوای کل فنلی و فلاونوئیدی با مهار رادیکال آزاد DPPH توجیه کننده این مطلب است که فعالیت آنتی اکسیدانی بره موم به دیگر ترکیبات موجود در آن نیز مربوط شود. لذا مطالعه در خصوص شناسایی دیگر ترکیبات بره موم پیشنهاد می شود.

کلمات کلیدی: بره موم، منطقه جغرافیایی، فعالیت ضدباکتریایی، فعالیت آنتی اکسیدانی

*نویسنده مسئول: هادی کوهساری

آدرس: گروه میکروبیولوژی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران. تلفن: ۰۱۷۳۵۷۲۴۰۰۳

پست الکترونیک: hadikoohsari@yahoo.com

مقدمه

بره‌موم زنبورعسل صمغ درختان و گیاهان مختلف است که زنبوران آن را در سبدهای گرده خود جمع آوری نموده و بره موم از جمله فرآورده‌های فرعی زنبور عسل به شمار می‌روند که بشر طی قرن‌های گذشته همواره از آن‌ها در طب سنتی بهره گرفته است. بره موم عبارت است از یک ماده رزینی، سفت و قهوه‌ای رنگ که توسط زنبور عسل از صمغ درختان و گیاهان مختلف تهیه می‌شود و بعد از ترکیب آن با موم و بزاق خود به عنوان ماده درزگیر و صیقل دهنده سطوح داخل کند و ضدعفونی سلول‌های مومی بعد از خروج نوزادان و قبل ازتخم گذاری ملکه در آن‌ها و مومیایی نمودن لاشه‌های مهاجمان تلف شده در داخل کندو مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲).

این ماده حاوی حدود ۵۰ درصد صمغ یا رزین گیاهان، ۳۰ درصدموم، ۱۰ درصد اسیدهای چرب ضروری، ۵ درصد گرده گل و ۵ درصد دیگر آن از ترکیبات آلی، ویتامین‌ها و عناصر معدنی مانند نقره، سدیم، جیوه، مس، منگنز، آهن، کلسیم، وانادیم و سیلیس است. با استفاده از آنالیزهای بیوشیمیایی، ترکیبات متنوعی ازجمله فلاونوئیدها، الکل‌ها، اسیدهای آلفاتیک، آمینواسیدها، اسیدهای آروماتیک، استرهای آروماتیک، کلکون‌ها، ترپنوئیدها، قندها و استرئیدها و صدها ماده دیگر تشکیل شده است (۱).

بره موم زنبور عسل به واسطه فعالیت ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی بالا (۱۵و۵و۴)، این پتانسیل را دارد که به عنوان افزودنی طبیعی غذایی و جایگزینی مناسب برای آنتی بیوتیک ها و ترکیبات شیمیایی به کار رود تا هم از مقاومت‌های آنتی بیوتیکی کاسته شود و هم عوارض ناخواسته عوامل شیمیایی حذف گردد.

ترکیبات شیمیایی که مسئول فعالیت‌های بیولوژیکی سودمند بره موم بخصوص فعالیت‌های ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی هستند شامل فلاونوئیدها (فلاون ها، فلاوونول ها، فلاوان ها، دی هیدرو فلاونول ها)، و دیگر ترکیبات فنلی که اصلی‌ترین آن‌ها سینامیک اسیدها و دیگر استرها هستند. مطالعات ترکیبات شیمیایی بره موم نشان داده است که نمونه‌های مختلف بره موم از این لحاظ بسیار متنوع است و انواع مختلف ترکیبات شیمیایی بسته به منشاء گیاهی، منطقه جغرافیایی و ویژگی‌های هواشناسی منطقه که زنبور عسل از آن استفاده کرده است متغیر است (۱۴و۴)

این موارد ما را بر آن داشت که به بررسی فعالیت‌های ضدباکتریایی و آنتی اکسیدانی ۳ نوع بره موم با منشأ جغرافیایی مختلف جمع آوری شده از کندوهای زنبور عسل در استان گلستان واقع در شمال ایران بپردازیم.

مواد وروش ها

استخراج عصاره اتانولی نمونه های بره موم

نمونه های بره‌موم از کندوهای زنبور عسل واقع در سه منطقه جغرافیایی استان گلستان واقع در شمال ایران در بهمن ماه ۱۳۹۳جمع آوری شده و تا زمان آزمایش در یخچال نگهداری شدند. ویژگی‌های جغرافیایی و پوشش گیاهی این مناطق در جدول۱ آمده است. بره موم منطقه شصت کلا و جهان نما خمیری و به رنگ سبز تیره و بره موم ناحیه رامیان شکننده تر و به رنگ قهوه ای تیره بود. برای استخراج عصاره اتانولی نمونه‌های بره موم به قطعات کوچک تقسیم شد و با استفاده از اتانول ۸۰ درصد (۱ به ۱۰ وزنی /حجمی) بر روی یک شیکر در دمای اتاق به مدت ۴۸ ساعت برای عصاره گیری قرار داده شد پس از این مدت محلول عصاره اتانولی با کاغذ صافی واتمن شماره ۴ و پمپ خلأ فیلتر شد. برای تغلیظ نمونه و حذف حلال (اتانول)

در یک روتاری تحت شرایط خلأ و با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از تبخیر حلال، عصاره خام (۱۰۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) شامل یک ماده قهوه‌ای رنگ چسبناک بدست آمد. این عصاره خالص مجدداً در اتانول ۸۰ درجه برای بدست آمدن غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر(محلول کار) حل شد و با استفاده از رقت‌های پی در پی در آب مقطر، غلظت‌های مختلفی از آن برای انجام آزمون‌های ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی تهیه شد (۲۵و۱۰و۸).

جدول۱- نام و ویژگی های مناطق جمع آوری نمونه های بره موم

شماره نمونه	نام منطقه جمع آوری نمونه	ویژگی های اقلیمی، جغرافیایی و پوشش گیاهی
۱	شصت کلا	این منطقه جغرافیایی از نظر اقلیمی منطقه جنگلی می‌باشد. ارتفاع این جنگل از ۵۰۰ متر از سطح دریا شروع و تا ارتفاع ۱۴۰۰ متر از سطح دریا ادامه می‌یابد و درختان راش بطور خالص در ارتفاعات ۹۰۰ متر به بالا ظاهر می‌شوند.
۲	جهان نما	این منطقه دارای اقلیم کوهستانی و در جنوب شرقی شهرستان کردکوی در ارتفاعی بین ۶۰۰ تا ۳۰۰۰ متری از سطح دریا واقع شده است . در ارتفاعات پوشش گیاهی به دلیل شرایط آب و هوایی بسیار متنوع است. پوشش گیاهی شامل درختان پهن برگ، درختچه و بوته زار می‌باشد. ولی مهم‌ترین گونه‌های آن سرخدار، ارس، سرو کوهی، مازو، راش، ممرز، آلوچه، زرشک و نمدار می‌باشند
۳	رامیان	این منطقه دارای اقلیم جلگه ای و کوهستانی می باشد و در شرق استان گلستان واقع شده است. در ارتفاع ۳۲۰ متری از سطح دریا قرار دارد و از نظر پوشش گیاهی، منطقه‌ای بسیار غنی از درختان ازگیل وحشی، ولیک، ممرز، توسکا، انواع بلوط و گیاهان دارویی فراوان، درختان سوزنی و پهن برگ می‌باشد.

سویه های باکتریایی

سویه های باکتریهای مورد آزمون شامل دو گونه باکتری گرم منفی یعنی *اشریشیاکلی (PTCC1338)*، *شیگلا دیسانتری (PTCC1188)* و دو گونه باکتری گرم مثبت شامل *استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1112)* و *باسیلوس سرئوس (PTCC 1154)* به صورت لیوفیلیزه ازسازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران تهیه شدند و در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر در محیط BHI (Brain Heart Infusion) و به مدت۲۴ ساعت در دمای۳۷درجه سانتیگراد احیاء شدند. پس از تعیین هویت باکتری های مورد آزمون، از هر یک از سویه های باکتریایی سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$CFU/ml) تهیه شد(۹).

ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی

آزمونهای میکروبی بر اساس انتشار در آگار و به روش چاهک انجام شد. همچنین کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) و کمترین غلظت باکتری‌کشی (MBC: Minimum Bactericidal Concentration) هر یک از نمونه های بره موم به روش ماکرودایلوشن مورد آزمون قرار گرفت.

به طور خلاصه در روش چاهک، از سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/ml) بر سطح محیط مولر هینتون آگار کشت یکنواخت انجام شد. سپس با استفاده از چوب پنبه سوراخ کن چاهک هایی با قطر ۸/۲ میلی متر حفر کرده و از هریک از رقت‌های نمونه‌های بره‌موم ۱۰۰میکرولیتر در چاهک‌ها ریخته و به مدت۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از این مدت با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها حساسیت یا مقاومت باکتری‌های مورد آزمون تعیین شد (۱۱و۱۰و۹).

تعیین کمترین غلظت مهار کنندگی هر یک از نمونه ها بر اساس کدورت سنجی و با استفاده از روش ماکرودایلوشن انجام شد. به این منظور رقت های مختلف نمونه ها که در محیط کشت مولر هینتون براث تهیه شده اند در مجاورت سوسپانسیون میکروبی معادل

۵×۱۰^{۵}CFU/ml از هریک از باکتری های مورد آزمون به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در کنار این لوله ها لوله کنترل مثبت (سوسپانسیون باکتری معادل ۵×۱۰^{۵} CFU/ml) و لوله کنترل منفی (مولر هینتون براث بدون باکتری و بره‌موم) نیز قرار داده شد. پس از این مدت نتایج به صورت کدورت میکروبی قابل مشاهده و ثبت گردید . آخرین رقتی که در آن کدورت میکروبی مشاهده نشد به عنوان کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) تعیین شد. به منظور تعیین کمترین غلظت باکتری کشی (MBC) از هر یک از لوله‌های فوق در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و آخرین رقتی که در آن کلنی مشاهده نشد به عنوان کمترین غلظت باکتری‌کشی تعیین شد (۲۱و۱۰و۹).

تعیین محتوای کل فنلی

محتوای کل فنلی (TPC) با روش رنگ سنجی و با استفاده از معرف فولین سیوکالته تعیین شد. به این منظور ۰/۵ میلی لیتر نمونه بره موم (با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) با آب مقطر به حجم ۵ میلی لیتر رسید. سپس ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین سیوکالتو (۱ به ۱۰ رقیق شده با آب مقطر) به نمونه رقیق شده افزوده شد. بعد از ۳ دقیقه ۰/۵ میلی لیتر کربنات سدیم ۱۰٪ به مخلوط فوق اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق و درمکان تاریکی در آزمایشگاه قرار داده شد. پس از این مدت جذب نمونه در دمای اتاق با دستگاه اسپکتروفتومتر نوری-ماورای بنفش در ۷۶۰ نانومتر در مقابل بلانک (از محلول واکنش شامل فولین سیوکالتو و کربنات سدیم به همراه آب مقطر به جای نمونه استفاده شد) قرائت گردید. جهت رسم منحنی استاندارد از اسید گالیک (۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) استفاده شد. آزمون ها سه بار تکرار شد و محتوای کل فنلی به صورت میلی گرم معادل اسید گالیک در هر گرم نمونه بره موم (mgGAE/g) گزارش شد (۲۶و۶).

تعیین محتوای کل فلاونوئیدی

محتوای کل فلاونوئید (TFC) با روش رنگ سنجی و با استفاده از کلرید آلومینیوم اندازه گیری شد. یک میلی لیتر کلرید آلومینیوم ۲٪ به یک میلی لیتر نمونه بره موم (با غلظت ۰/۳ میلی گرم بر میلی لیتر) افزوده شد. این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در جای تاریک قرار داده شده و پس از این مدت جذب نمونه در ۴۳۰ نانومتر در مقابل بلانک (از محلول واکنش یعنی کلرید آلومینیوم ۲ درصدبه همراه آب مقطر به جای نمونه استفاده شد) قرائت گردید. از کوئرستین (۰ تا ۱۰۰ میکرو گرم در میلی‌لیتر) جهت رسم منحنی استاندارد استفاده شد. آزمون ها سه بار تکرار شد و محتوای کل فلاونوئیدی به صورت میلی‌گرم معادل کوئرستین در هر گرم نمونه بره موم (mg QE/g) گزارش شد (۲۶و۶).

ارزیابی توانایی مهار رادیکال آزاد

فعالیت مهار رادیکال آزاد نمونه‌های بره موم بوسیله DPPH (2, 2-Diphenl-1-Picrylhydrazyl) تعیین شد (۱۷). اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال های آزاد DPPH به عنوان یک آزمون معتبر و در عین حال ساده به طور گسترده جهت بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی مورد استفاده قرار می گیرد. حساسیت بالای رادیکال های DPPH امکان تعیین فعالیت ضد رادیکالی غلظت های پایین ترکیبات آنتی اکسیدانی را نیز فراهم می نماید. DPPH نوعی رادیکال آزاد هیدروفیل و پایدار به رنگ بنفش است که به دلیل وجود الکترون های منفرد دارای حداکثر جذب در طول موج ۵۱۵-۵۱۷ نانومتر می باشد انتقال و یا اتم هیدروژن به رادیکال های DPPH از ترکیبات احیا کننده نظیر فنول ها و تبدیل

آنها به فرم غیر رادیکالی منجر به کاهش میزان جذب محلولDPPH در این طول موج و تغییر رنگ به زرد می گردد. به این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت ۱۰۰۰ پی پی ام محلول متانولی بره موم و ۱۰۰ میکرولیترDPPH۲ میلی مولار حل شده در متانول مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در مکان تاریک قرار داده شدند. پس از این مدت جذب نمونه در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت گردید.لازم به ذکر است که در کنترل، متانول به جای محلول عصاره و در بلانک، متانول به جای DPPH استفاده شد. تمامی آزمایشات با سه بار تکرار انجام گردید و درصد مهار رادیکال های آزاد DPPHبا رابطه زیر محاسبه گردید:

DPPH scavenging activity (%) = 1- (A Control – A Sample / A Control)× 100

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل بر اساس طرح کاملاً تصادفی و به کمک ANOVA آنالیز و هر آزمون حداقل در سه تکرار انجام خواهد شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی داری (P< ۰/۰۵) صورت می گیرد و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و رسم نمودارها با نرم افزار Excel صورت می‌پذیرد. برای محاسبه ضریب همبستگی بین متغیرها از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد.

نتایج

نتایج بررسی فعالیت ضد باکتریایی غلظت های مختلف عصاره اتانولی نمونه های بره موم از سه منطقه جغرافیایی استان گلستان شامل شصت کلا، جهان نما و رامیان در جدول ۲ آمده است. نتایج به دست آمده از روش چاهک نشان داد که اثرات ضدباکتریایی بره موم وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت نمونه بره موم اثرات ضدباکتریایی افزایش یافت. مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد در سه نمونه بره موم نشان داد که بره موم هر سه منطقه جغرافیایی دارای فعالیت ضد باکتریایی به خصوص علیه باکتری های گرم مثبت مورد آزمون بود بطوریکه نمونه‌های بره موم فقط در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر توانستند از رشد باکتری‌های گرم منفی مورد آزمون جلوگیری نمایند ولی باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمون حتی در غلظت ۱/۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به نمونه‌های بره موم حساسیت نشان دادند (جدول۲). این اثرات در نمونه های جمع آوری شده از مناطق شصت کلا و جهان نما در مقایسه با نمونه رامیان مشهود تر است (P< ۰/۰۵). به طوریکه حتی در غلظت ۱/۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر نیز قادر به مهار رشد باکتری های گرم مثبت مورد آزمون بوده اند (جدول۲).

در جدول ۳ کمترین غلظت مهار کنندگی و کمترین غلظت باکتری کشی هر یک از نمونه های بره موم آمده است. کمترین غلظت مهار کنندگی عصاره اتانولی نمونه های بره موم در محدوده ۰/۰۴۸ میلی گرم بر میلی لیتر تا ۶/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر متغیر است.حساسیت باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری گرم منفی در این روش نیز کاملاً مشهود است بطوریکه کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) نمونه بره موم شصت کلاً برای *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۰/۰۴۸ و۰/۱۹ میلی گرم بر میلی لیتر و برای *شیگلا دیسانتری* و *اشریشیا کلی* به ترتیب ۳/۱۲ و ۳/۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش شد. همچون روش چاهک در این روش نیز فعالیت ضد باکتریایی بره موم جمع آوری شده از کندوهای زنبور عسل منطقه شصت کلا قابل توجه می باشد به‌طوری‌که نمونه بره موم منطقه مذکور نسبت به دیگر نمونه ها در غلظت‌های کمتری باعث مهار رشد باکتری‌های مورد آزمون شده است.

جدول۲- میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری ها در حضور غلظت های مختلف نمونه های بره موم در روش چاهک

انواع بره موم	غلظت (میلی گرم بر میلی لیتر)	*شیگلا دیسانتری*	*استافیلوکوکوس اورئوس*	*باسیلوس سرئوس*	*اشریشیا کلی*
شصت کلا	۱۰۰	۱±۱۶^{Ba}	۴۹/۳۳±۳/۰۵ ^{Aa}	۴۹/۳۳±۳/۰۵ ^{Aa}	۱۵±۱ ^{Ba}
	۵۰	-	۴۱/۶۶±۳/۵۱ ^{Ab}	۳۹±۱ ^{Bb}	-
	۲۵	-	۲۹±۱ ^{Bc}	۳۶/۶۶±۱/۵۲ ^{Ab}	-
	۱۲/۵	-	۲۷/۳۳±۱/۵۲ ^{Ac}	۲۹±/۱^{Ac}	-
	۶/۲۵	-	۱۶±۱ ^{Ad}	۱۷±۱ ^{Ad}	-
	۳/۱۲	-	۱۳±۱ ^{Bd}	۱۵±۱ ^{Ae}	-
	۱/۵۶	-	۱۳/۳۳±۱/۱۵ ^{Ad}	۱۴±۱ ^{Ae}	-
	۰/۷۸	-	-	۱۳/۳۳±۰/۵۷ ^{Ae}	-
جهان نما	۱۰۰	۱۷±۱ ^{Ba}	۳۴/۳۳±۲/۰۸^{Aa}	۳۶/۳۳±۱/۵۲^{Aa}	۱۹±/۱^{Ba}
	۵۰	-	۳۰/۳۳±۲/۰۸^{Bb}	۳۵±۱^{Aa}	۱۶±/۱^{Cb}
	۲۵	-	۲۵±۲^{Bc}	۲۸±۱^{Ab}	-
	۱۲/۵	-	۲۳/۳۳±۱/۵۲^{Bc}	۲۷±/۱^{Ab}	-
	۶/۲۵	-	۱۹/۳۳±۱/۵۲^{Ad}	۱۳/۶۶±۱/۵۲^{Bc}	-
	۳/۱۲	-	۱۵±/۱^{Ae}	۱۳/۳۳±۱/۵۲^{Bc}	-
	۱/۵۶	-	۱۴±/۱^{Ae}	۱۱±/۱^{Bc}	-
	۰/۷۸	-	۱۱±/۱^{Aa}	-	-
رامیان	۱۰۰	۱۴/۶۶±۱/۱۵^{Ca}	۲۶±/۱^{Ba}	۳۵/۶۶±۲/۵۱^{Aa}	۱۳±/۱^{Ca}
	۵۰	-	۲۵±/۱^{Ba}	۳۶±/۱^{Aa}	-
	۲۵	-	۲۱/۳۳±۱/۱۵^{Aab}	۲۲/۶۶±۱/۵۲^{Ab}	-
	۱۲/۵	-	۱۹/۶۶±۱/۵۲^{Bb}	۲۱/۳۳±۱/۵۲^{Ab}	-
	۶/۲۵	-	۱۶±/۱^{Bbc}	۱۹/۶۶±۲/۰۸^{Ab}	-
	۳/۱۲	-	۱۴/۶۶±۱/۵۲^{Ac}	۱۳±/۱^{Ac}	-
	۱/۵۶	-	-	۱۲±/۱^{Ac}	-
	۰/۷۸	-	-	-	-

حروف کوچک متفاوت در ستون ها (a, b, …) وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف را نشان می دهد.

حروف بزرگ متفاوت در ردیف ها (A, B, …) وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف را نشان می دهد.

جدول۳- کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و کمترین غلظت باکتری کشی (MBC) هر یک از نمونه‌های بره موم (میلی گرم بر میلی لیتر)

باکتری‌های مورد آزمون	جهان نما		شصت کلاً		رامیان	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
باسیلوس سرئوس	۰/۰۴۸	۰/۰۴۸	۰/۰۴۸	۰/۰۴۸	۰/۱۹	۰/۱۹
اشریشیا کلی	۶/۲۵	۶/۲۵	۳/۱۲	۳/۱۲	۶/۲۵	۶/۲۵
استافیلوکوکوس اورئوس	۰/۳۹	۰/۳۹	۰/۱۹	۰/۱۹	۱/۵۶	۱/۵۶
شیگلا دیسانتری	۳/۱۲	۳/۱۲	۳/۱۲	۳/۱۲	۳/۱۲	۶/۲۵

جدول۴- محتوای کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و درصد مهار رادیکال آزاد در نمونه های بره موم استان گلستان

نمونه‌های مورد آزمون	محتوای کل فنلی mgGAE/g	محتوای کل فلاونوئیدی mg QE/g	درصد مهار رادیکال آزاد (ppm) بره موم‌ها در غلظت ۱۰۰۰
بره موم جهان نما	۱۴۲/۶۷ ± ۱/۱۵^{a}	۳۵/۲۴ ± ۰/۱۴^{a}	۸۴/۴۷ ± ۰/۲۱^{c}
بره موم شصت کلاً	۱۲۶/۸۷± ۱/۱۵^{b}	۲۸/۶۴± ۰/۸۶ ^{b}	۹۰/۱۶ ± ۰/۰۹^{a}
بره موم رامیان	۸۹/۴۶± ۱/۴۹ ^{c}	۱۹/۱۶±۰/۱۵ ^{c}	۸۷/۴۴ ± ۰/۱۲^{b}

حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمالی ۵ ٪ می‌باشد.

محتوای کل فنلی و فلاونوئیدی و درصد مهار رادیکال آزاد DPPH را در نمونه های بره موم در جدول شماره ۴ آمده است. همانطور که مشاهده می شود بیشترین محتوای کل فنولی و فلاونوئیدی مربوط به بره موم

منطقه جهان نما می باشد و بیشترین مهار رادیکال آزاد DPPH با ۹۰/۱۶ درصد در بره موم منطقه شصت کلا دیده شد ($P < 0.05$).

در مطالعه حاضر همان‌طور که مشاهده می شود ارتباط مستقیمی بین محتوای کل فنلی و فلاونوئیدی نمونه های بره موم با خاصیت ضد باکتریایی آنها وجود دارد به‌طوری‌که نمونه منطقه رامیان که دارای مقادیر کمتر ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی می‌باشد فعالیت ضد باکتریایی کمتری را نیز نشان داد.

البته این ارتباط مستقیم بین وجود ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی با خاصیت آنتی اکسیدانی دیده نشده است. بطوریکه بره موم جهان نما که بیشترین ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی را به خود اختصاص داده است ولی از لحاظ مهار رادیکال های آزاد DPPH توفیقی نداشته است و کمترین مهار این رادیکال ها را دارا می باشد.

صرف نظر از منطقه به طور کلی بین محتوای کل فلاونوئیدی با محتوای کل فنولی یک همبستگی مثبت بالا وجود دارد ($r = 0.987$) یعنی افزایش محتوای کل فلاونوئید با افزایش محتوای کل فنلی همراه است و یا برعکس و این همبستگی در سطح (۰/۰۱) معنی دار می‌باشد. ولی بین مهار رادیکال آزاد و محتوای کل فنولی همبستگی منفی متوسط وجود دارد ($r=-0.313$) این بدین معناست که کاهش مهار رادیکال آزاد باعث افزایش کل محتوای فنولی می‌شود و یا برعکس. همچنین بین مهار رادیکال آزاد و محتوای کل فلاونوئیدی همبستگی منفی متوسط وجود دارد ($r = -0.456$).

بحث و نتیجه گیری

یکی از مشکلات طب جدید با وجود امتیاز های ظاهری نسبت به طب سنتی که با خود به ارمغان آورده است، مصرف روزافزون داروهای شیمیایی است که متاسفانه روز به روز شکل حادتری به خود می گیرد و در این میان گسترش روزافزون مقاومت های آنتی بیوتیکی یکی از معضلاتی است که جامعه بهداشت جهانی با آن سر و کار دارند. به این دلیل ضرورت تحقیق در خصوص معرفی عوامل ضد میکروبی جدید با منشاء طبیعی به شدت احساس می شود تا هم از مقاومت های آنتی بیوتیکی کاسته شود و هم عوارض ناخواسته عوامل شیمیایی حذف گردد.

بره موم یکی از مهمترین فرآورده های فرعی زنبورعسل می باشد که به واسطه خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی بالا، پتانسیل این جایگزینی را داراست. فعالیت های بیولوژیکی سودمند بره موم بسته به منطقه جغرافیایی محل جمع آوری متغیر است (۴).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که بره موم هر سه منطقه جغرافیایی دارای فعالیت ضد باکتریایی قابل توجهی به خصوص علیه باکتری های گرم مثبت مورد آزمون می باشند و باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی حساسیت بیشتری نسبت به عصاره اتانولی نمونه های بره موم دارند. یکسان بودن کمترین غلظت مهار کنندگی با کمترین غلظت باکتری کشی نمونه های بره موم حاکی از باکتریوسید بودن این فرآورده مهم زنبور عسل می باشد. Uzel و همکاران (۲۰۰۵) نیزدر مطالعه ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی چهار نمونه بره موم در کشور ترکیه حساسیت بیشتر باکتری های گرم مثبت را نشان دادند (۲۴). حساسیت باکتری های گرم مثبت نسبت به بره موم در مطالعات دیگر نیز به اثبات رسیده است (۲۵و۱۹و۱۵و۱۳). مطالعات نشان داده است که دیواره سلولی باکتریهای گرم مثبت نسبت به باکتریهای گرم منفی در مقابل بسیاری از آنتی بیوتیک‌ها، ترکیبات شیمیائی ضد میکروبی و حتی بسیاری از داروهای گیاهی حساسیت زیادی دارند.

وجود لایه لیپوپلی ساکاریدی دیواره و نیز فضای پری پلاسمیک از دلائل مهم این مقاومت نسبی گرم منفی ها می باشد (۲۳و۱۲). البته دیگران نیز فعالیت ضعیف ضدمیکروبی نمونه های بره موم را بر علیه باکتری های گرم منفی نشان دادند (۲۲و۷).

آزمون تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و کمترین غلظت باکتری کشی (MBC)، همچون روش چاهک فعالیت ضد باکتریایی نمونه های بره موم را مورد تایید قرار داد. در این بین نمونه جمع آوری شده از کندوهای زنبور عسل منطقه شصت‌کلا در مقایسه با دو نمونه دیگر فعالیت قابل توجهی نشان داد و در غلظت‌های کمتری باعث مهار رشد باکتری‌های مورد آزمون شد. *باسیلوس سرئوس* و *اشریشیا کلی* به ترتیب حساس ترین و مقاومترین باکتری های مورد آزمون نسبت به عصاره اتانولی نمونه های بره موم گزارش شدند. Yaghobi وهمکاران (۲۰۰۷) نیز در مطالعه خود *باسیلوس سرئوس* را حساس‌ترین باکتری نسبت به عصاره اتانولی بره موم ایرانی معرفی نمودند و مقاومت قابل توجه باکتری های گرم منفی از جمله *اشریشیا کلی* را تایید کردند (۲۵). این مقاومت می تواند به دلیل وجود ترکیبات لیپیدی در غشاء خارجی این باکتری به عنوان یک باکتری گرم منفی باشد که منجر به نفوذپذیری کمتر آن می شود (۲۰).

Tabatabaei و همکاران (۲۰۱۱) کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و کمترین غلظت باکتری کشی (MBC) عصاره اتانولی بره موم ایرانی را علیه باکتری‌های گرم مثبت در محدوده ۲۵۰ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش کردند که با نتایج مطالعه ما هم خوانی دارد (۱۰). همانطور که اشاره شد حساسیت بیشتر باکتری های گرم مثبت به ساختار دیواره سلولی آنها مربوط می شود (۲۰).

در مطالعه‌ای مشابه کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) نمونه‌های بره موم با منشأ جغرافیایی مختلف علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شد که با نتایج تحقیق ما هم خوانی دارد در این مطالعه ارتباطی بین مقادیر ترکیبات فنلی با خاصیت ضدباکتریایی مشاهده نشد (۲۱).

رنگ و ترکیبات شیمیایی بره موم گرفته شده از مناطق جغرافیایی مختلف بسته به منشأ گیاهی، گونه زنبور عسل، و فصل بسیار متفاوت است این تنوع ترکیبات شیمیایی باعث می‌شود فعالیت‌های بیولوژیکی بره موم نیز بسیار متنوع شود (۳).

نقش مهم ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در فعالیت های بیولوژیک بره موم به خصوص فعالیت های ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی آن غیر قابل چشم پوشی است و در مطالعات متعددی به آن اشاره شده است (۱۴و۴). همانطور که گفته شد بین فعالیت ضد باکتریایی نمونه های بره موم با محتوای فنلی و فلاونوئیدی آنها ارتباط مستقیم دیده شد ولی این ارتباط مستقیم بین وجود ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی با خاصیت آنتی اکسیدانی دیده نشده است.

عدم ارتباط بین محتوای کل فنولی و فلاونوئیدی با مهار رادیکال آزاد DPPH در مطالعات دیگر نیز مشاهده شده است (۱۸و۱۷). در مطالعه ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های آبی و اتانولی نمونه های بره موم در جنوب پرتقال از ۱۳ مکانی که نمونه‌های بره موم جمع آوری شده بودند، فقط در سه مورد، محتوای بالای فنلی منجر به خاصیت آنتی اکسیدانی بالاتر شده بود که با مطالعه حاضر همخوانی دارد (۱۶).

می‌توان این‌طور نتیجه گرفت که ممکن است فعالیت آنتی اکسیدانی بالای بره موم به دیگر ترکیبات موجود

در آن نیز مربوط شود (۱۸). علاوه بـر ایـن فاکتورهـای متعددی از جملـه فصـل، پوشـش گیـاهی منطقـه، منشـأ جغرافیایی و شرایط بره موم از نظر تازگی و سن وابسـته اسـت (۱۶) لـذا مطالعـه در خصـوص شناسـایی دیگـر ترکیبات موجود در نمونه های بره موم و ارتباط آنهـا بـا قـدرت مهـار رادیکـال هـای آزادDPPH پیشـنهاد مـی شود.

منابع

1. Bankova, V.B., De Castro, S.L., Marcucci, M.C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* **31**: 3–15.
2. Bankova, V. (2009). Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *Journal of Api Product and Api Medical Science* **1**: 23-28.
3. Bankova, V., Atanassov, A., Denev, R., Shishinjova, M. (2012). Bulgarian Bee Products and Their Health Promoting Potential. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **26**: 3086-308.
4. Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolisand the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology* **100**: 114–117.
5. Banskota, A.H., Tezuka, Y., Kadota, S.H. (2001).Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research* **15**: 561–571.
6. Boufadi, Y.M., Soubhye, J., Riazi, A., Roubhye, J., Vanhaeverbeek, M., Neve, J., Boudjeltia, K.Z., Antwerpen, P.V. (2014). Characterization and Antioxidant properties of six Algerian propolis Extract: Ethyl Acetate Extracts Inhibit Myeloperoxidase Activity. *International journal of molecular sciences* **15**: 2328-2347.
7. Dobrowolski, J.W., Vohora, S.B., Sharma, K., Shah, S.A., Naqvi, S.A.H., Dandiya, P.C. (1991). Antibacterial, antifungal, antiamoebic, anti inflammatory and anti pyreticstudies on propolis bee products. *Journal of Etnopharmacology* **35**: 77-82.
8. Dziedzic, A., Kubina, R., Wojtyczka, R.D., KabaBa-Dzik, A., Tanasiewicz, M., Morawiec, T. (2013). The Antibacterial Effect of Ethanol Extract of Polish Propolis on Mutans *Streptococci* and *Lactobacilli* Isolated from Saliva. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2013**: 1-12.
9. Franklin, R., Cockerill, I.I.I., Matthew, A., Wikler, M.B.A., FIDSA Jeff Alder, Michael, N., and et al. (2012). Methods forDilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute* M07-A9 32(2).
10. JafarzadehKashi, T.S., KasraKermanshahi, R., Erfan, M., VahidDastjerdi, E., Rezaei, Y., Tabatabaei, F.S. (2011). Evaluating the In-vitro Antibacterial Effect of Iranian Propolis on Oral Microorganisms. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* **10**: 363-368.
11. Katirciolu, H., Mercan, N. (2006). Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkishpropolis from different regions. *African Journal of Biotechnology* **5**: 1151-1153.
12. Krittika, N. (2007). Antimicrobial effect of five Zingiberaceae Essential oils. *Molecules* **12**: 2047-2060.
13. Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y.U., Bankova, V.S., Christov, R., Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology* **64**: 235-240.
14. Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of variousgeographic origins. *Food Chemistry* **84**: 329-370.
15. Marcucci, M.C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* **26**: 83-99.
16. Miguel, M.G., Nunes, S., Dandlen, S.A., Cavaco, A.M., Antunes, M.D. (2014). Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve South of Portugal. *Food Science and Technology* **34**: 16-23.
17. Moein, M.R., Moein, S., Ahmadizadeh, S. (2008). Radical scavenging and reducing Power of *Salvia mirzayanii*ubfractions. *Molecules* **13**:2804-2013.
18. Moreira, L., Dias, L.G., Pereira, J.A., Estevinho, L. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis

of propolis samples from *Portugal*. *Food and Chemical Toxicology* **46**: 3482-3485.
19. Nieva, M.M.I., Isla, M.I., Cudmani, N.G., Vattuone, M.A., Sampietro, A.R. (1999). Screening of antibacterial activity of Amaichadel Valle (Tucuman, Argentina) propolis. *Journal of Ethnopharmacology* **68**: 97-102.
20. Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**: 593-656.
21. Popova, M., Bankova, V.S., Bogdanov, S., Tsvetkova, I., Naydenski, C.H., Marcazzan, G.L., Sabatini, A.G. (2007). Chemical Characteristics of poplar Type propolis of different geographic origin. *Apidologie* **38**: 306-311.
22. Sforcin, J.M., Fernandes, A., Lopes, C.A.M., Bankova, V., Funari, S.R.C. (2000). Seasonal effect on Brazilianpropolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* **73**: 243-249.
23. Sharifa, A.A., Neoh, Y.L., Iswadi, M.I., Khairul, O., Abdul Halim, M., Jamaludin, M., Mohamed Azman, A.B., Hing, H.L. (2008). Effects of Methanol, Ethanol and Aqueous Extract of *Plantago major* on Gram Positive Bacteria, Gram Negative Bacteria and Yeast. *Annals of Microscopy*. **8**: 42-44.
24. Uzel, A., Sorkun, K., Oncag, O., Cogulu, D., Gencay, O., Salih, B. (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research* **160**: 189-195.
25. Yaghobi, S.M.J., Ghorbani, G.R., Soleimanianzad, S., Satari, R. (2007). Antimicrobial activity of Iranian Propolis and Its chemical composition. *DARU* **15**: 45-48.
26. Yang, H., Dong, Y., Du, H., Shi, H., Peng, Y., Li, X. (2011). Antioxidant Compounds from Propolis Collected in Anhui, China. *Molecules* **16**: 3444-3455.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 14, Issue 2, 2018

The antibactrial and antioxidant activity of several types of beepropolis collected from different geographic regions of Golestan province

Garmani, M.[1], Koohsari, H.[2]*, Seyyed Alangi, S.Z.[3]

1. Graduated student of Food Science and technology, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran
2. Assistant Professor of Microbiology, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran
3. Associate Professor of Chemistry, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran

Received: 14 June 2017 Accepted: 20 June 2018

Abstract

Propolis is one of the byproducts of bees. Biological activities of propolis is related to geographical and botanical origion. The aim of this study was to evaluate the antibacterial and antioxidant activity the three types of propolis with different geographical origion from Golestan province in northern Iran.The evaluation of antibacterial activity by using agar well diffusion method was performed. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of propolis samples were determined by using broth macrodilution tube method. Also the total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TPC) and free radical scavenging activity of propolis samples were determined. Gram-positive bacteria compared to gram-negative bacteria showed more sensivity to different concentrations of propolis samples. As MIC of propolis collected from the geographic region of the Shast Kola for B. cereus and S. aureus was, 0/048 and 0/19 mg/ml respectively and for S. dysentery and E.coli 3.12 and 3.12 mg/ml respectively. Propolis sample of JahanNama area with mean of 142.67 mgGAE/g sample and 35.24 mgQE/g sample showed highest TPC and TFC. The highest DPPH radical scavenging activity was related to Shast Kola propolis sample. The antibacterial activity of propolis samples had direct correlation with phenolic and flavonoid content. The total phenolic and flavonoid content had negative correlation with free radical scavenging DPPH, explain that the antioxidant activity of propolis also is related to other components. So the identification of other compounds of propolis is recommended.

Keywords: Propolis, Geographical region, Antibacterial activity, Antioxidant activity

**Corresponding author: Koohsari, H.*
Address: Department of Microbiology, Azadshahr branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran. Tel: +981735724003
E-mail address: hadikoohsari@yahoo.com