

بررسی اثر ضد میکروبی بره‌موم منطقه طالقان بر برخی از باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد

نسیم علمائیان^۱، ولی اله کوه‌دار^۲، سید هدایت حسینی^۳

۱- گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

۲- نویسنده مسئول: گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران، پست الکترونیکی: dr.koohdar@gmail.com

۳- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۲/۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۰

چکیده

سابقه و هدف: بره‌موم (پروپولیس) یکی از فراآورده‌های مؤثر در مقابل باکتری‌های غذازاد (food-borne bacteria) است که ترکیبات شیمیایی آن با توجه به موقعیت جغرافیایی و پوشش گیاهی منطقه متغیر می‌باشد. مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر ضدباکتریایی عصاره الکلی بره‌موم منطقه طالقان بر چهار باکتری بیماری‌زای غذازاد انجام گردید.

مواد و روش‌ها: پس از تهیه بره‌موم، عصاره اتانولی آن گرفته شد. برای آنالیز و تعیین مواد و ترکیبات موجود در عصاره‌ها از روش HPLC (کروماتوگرافی با بازده بالا) استفاده گردید. سپس آزمون‌های میکروبی به روش انتشار در آگار و روش چاهک به منظور تعیین میزان تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره بره‌موم بر میکروب‌های مورد مطالعه انجام شد. داده‌ها با کمک آزمون‌های آماری تست دو جانبه فیشر (Fisher) و آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: بیشترین ممانعت از رشد (قطر هاله) باکتری‌های سالمونلا و استافیلوکوکوس آئوس مربوط به غلظت ۱۰۰ mg/ml و کمترین آنها مربوط به غلظت ۷۵ mg/ml عصاره بود و برای باکتری‌های اشریشیاکلی و کمپیلوباکترژوژنی بیشترین قطر هاله، مربوط به غلظت ۱۰۰ mg/ml و کمترین آنها مربوط به غلظت ۵۰ mg/ml عصاره بره‌موم بود. برای هر یک از باکتری‌ها در بازه مشخصی از غلظت‌های عصاره مورد مطالعه، خاصیت مهارکنندگی وجود داشت اما برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس عصاره مورد نظر در غلظت‌های ۱۰۰ تا ۶/۲۵ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) خاصیت مهارکنندگی از خود نشان داد، با این تفاوت که در غلظت ۱۲/۵ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) نتیجه MBC خلاف جهت نتیجه MIC را نشان داد. افزایش قطر هاله در غلظت بالاتر در همه گروه‌ها از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0/05$).

نتیجه‌گیری: تأثیر ضد میکروبی عصاره بره‌موم بر باکتری‌های بیماری‌زای مورد بررسی، به شکل چشمگیری مشاهده شد.

واژگان کلیدی: اثر ضد میکروبی، بره‌موم، اشریشیا کلی و کمپیلوباکتر، پاتوژن، سالمونلا و استافیلوکوکوس آئوس

• مقدمه

نمودن لاشه‌های مهاجمان استفاده می‌شود. ترکیب شیمیایی بره‌موم به متغیرهایی از جمله آب و هوای محیط اطراف کندو، پوشش گیاهی موجود در محل جمع‌آوری، گونه زنبور سازنده و روز و فصل جمع‌آوری عسل بستگی دارد. به طور میانگین بره‌موم از حدود ۵۰ درصد صمغ یا رزین گیاهان، ۳۰ درصد موم، ۱۰ درصد اسیدهای چرب ضروری، ۵ درصد گرد گل و ۵ درصد دیگر آن از ترکیبات آلی، ویتامین‌ها و عناصر معدنی مانند: نقره، سدیم، جیوه، مس، منگنز، آهن، کلسیم، وانادیم و سیلیس تشکیل شده است. بره‌موم بخاطر داشتن ترکیباتی

بره‌موم (propolis) یک ماده رزینی طبیعی است که توسط زنبور عسل از مواد استخراجی از گیاهان، شکوفه‌ها و صمغ‌ها ساخته می‌شود. زنبور ابتدا تکه‌های صمغ تراوش شده از جوانه یا شکوفه یا تنه برخی از درختان را به وسیله قطعات دهانی و پای خود جمع‌آوری و داخل سبد کرده نموده و به کندو حمل می‌کند. سپس با بزاق و آنزیم‌های مترشح‌شده از غدد بزاقی زنبور عسل ترکیب و ماده چسبناکی را تولید می‌کند که در کندو به عنوان درزگیر، صیقل دهنده سطوح داخل کندو، ضد عفونی کننده سلول‌های مومی قبل از تخم‌گذاری ملکه و مومیایی

لیتر اتانل ۸۰ درصد حل گردید. به منظور تصفیه، محلول الکل و بره‌موم از کاغذهای واتمن عبور داده، به منظور تبخیر اتانول از محلول و تخلیص بره‌موم حاصل، از دستگاه روتاری اوپراتور Lab TechEV311 استفاده گردید. عصاره خالص شده در ظرف در بسته، به دستگاه فریز درایر (ALPHA2-4 LD plus) جهت خشک کردن منتقل شد. برای تعیین قطر هاله عدم رشد با استفاده از روش براساس انتشار در آگار و به روش چاهک، ابتدا ۵/۲۵ میلی گرم عصاره خشک شده بره‌موم حاصل (با وزن مخصوص ۱،۴ گرم) ۱ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد حل کرده و عصاره اتانولی تهیه شد. (اتانول پس از قرار گرفتن شاهد و مشاهده عدم ایجاد هاله رشد به عنوان حلال مناسب انتخاب شد) محلول به دست آمده از فیلتر میکروبی ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد تا کاملاً استریل شود. برای کنترل منفی، محیط کشت و عصاره بره‌موم، قرار داده شد. برای کنترل مثبت از سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت استفاده شد (۱۱).

تهیه سوش‌های میکروبی: میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در این مطالعه که عبارتند از سه گونه باکتری گرم منفی اشریشیا کلی (ATCC 25920)، کمپیلوباکتر ژژونی (ATCC 33291) و سالمونلا (ATCC 13076) و یک گونه باکتری گرم مثبت، استافیلوکوکوس آرتوس (ATCC 29213) به صورت خشک شده به روش انجمادی (لیوفلیزه) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. نمونه‌های میکروبی مطابق با روش‌های استاندارد احیا شد (۱۲). تراکم سوسپانسیون میکروبی تلقیحی با استفاده از روش نیم مک فارلند استاندارد گردید. بدین منظور برای تهیه سوسپانسیون میکروبی از کشت تازه و جوان باکتری چند کلنی به محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل شد. سپس میزان جذب محلول استاندارد نیم مک فارلند در طول موج ۶۲۵ نانومتر خوانده شد (کدورت معادل $10^8 \times 1/5$ در هر میلی‌لیتر). در مرحله بعد لوله‌های برای استاندارد کردن تلقیح باکتریایی استفاده شده است و حاوی سولفات باریم بودند، جهت خوانش جذب در ۶۲۵ نانومتر مورد استفاده قرار گرفت (۱۱).

آنالیز عصاره بره‌موم: برای آنالیز مواد شیمیایی و متابولیت‌های موجود در عصاره‌ها از روش HPLC (کروماتوگرافی با بازده بالا) استفاده گردید. در این مرحله، ابتدا بره‌موم در اتانول حل شد و وارد ستون کروماتوگرافی گردید و تحت فشار بالا جریان یافت. سپس اجزای سازنده بره‌موم با توجه به میزان برهم کنش آنها با فاز ساکن که براساس قطبیت آنها انجام می‌شود، در ستون جداسازی شدند و هر

مانند فالونوئید، ترپنوئید و فنولیک دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد قارچی بوده و به عنوان ماده نگهدارنده به مواد بسته‌بندی غذایی اضافه می‌شود (۱). بیش از ۱۵۰ ترکیب مختلف از جمله ترپنوئیدها، پلی‌فنل‌ها، استروئیدها و اسیدهای آمینه و آلی در بره‌موم موجود می‌باشد که بر اساس تغییرات آب و هوایی این ترکیبات می‌تواند متفاوت باشد (۲). به‌عنوان مثال، در بره‌موم مناطق معتدل، بیشترین ترکیبات فعال بیولوژیکی پلی‌فنل‌ها، از جمله اسیدهای فنلیک و فالونوئیدها هستند (۳، ۴). مصرف روزافزون از بره‌موم نیاز به روش‌های مناسب برای تعیین کمی اجزای فعال آن دارد و از این رو، روش‌های کروماتوگرافی امکان جدا سازی و اندازه‌گیری تمام اجزای آن را میسر می‌سازد (۳). جهت استخراج این مواد، لازم است که از حلال مناسب استفاده شود و مواد زائد و بی‌فایده حذف گردد و پس از خالص‌سازی عصاره‌ی آن تهیه شود (۳، ۵، ۶).

بیماری‌هایی با منشأ غذایی (غذازاد) ناشی از میکروارگانیسم‌ها یک مشکل بهداشت عمومی بزرگ و در حال رشد می‌باشد، اکثر کشورهایی که سیستم ثبت و گزارش بیماری‌های غذازاد را دارند افزایش مشخص و بارزی در میزان وقوع این بیماری‌ها با وسیله میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی را مستندسازی و گزارش کرده‌اند. این عوامل بیماری‌زا شامل سالمونلا، کامپیلوباکتر ژژونی و اشریشیاکلی و انگل‌هایی مثل کریپتوسپوریدیوم، و ترماتودها می‌باشند (۷). یافته‌ها نشان می‌دهد بره‌موم به علت خصوصیات ضد باکتریایی، ضد عفونی‌کنندگی می‌تواند در کاهش التهاب مؤثر باشد (۸، ۶). همچنین بررسی‌های بالینی نشان داده‌اند که بره‌موم علاوه بر داشتن خواص ضد سرطانی با داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد قارچی، در افزایش عملکرد سیستم ایمنی و مهار رشد پاتوژن‌ها نقش به‌سزایی می‌تواند داشته باشد (۸-۱۰).

با توجه به موارد یاد شده و اهمیت شناخت راهکارها و درمان‌های ضد میکروبی سالم مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی اثر ضد میکروبی بره‌موم بر ۴ میکروارگانیسم بیماری‌زای غذازاد استافیلوکوکوس آرتوس (*Staphylococcus aureus*) گرم مثبت، کمپیلوباکتر (*Campylobacter jejuni*) گرم منفی، سالمونلا (*Salmonella*) گرم منفی و اشریشیاکلی (*Escherichia coli*) گرم منفی، انجام شد.

• مواد و روش‌ها

استخراج عصاره الکی بره‌موم: نمونه‌های بره‌موم از کندوهای زنبور عسل واقع در چند منطقه‌ی طالقان در آبان‌ماه ۱۳۹۹ جمع‌آوری شد. مقدار ۲۰ گرم بره‌موم در ۱۰۰ میلی

لوله‌های هر ردیف، صد میکرولیتر از غلظت مربوط، به هر لوله اضافه شد. در تمام لوله‌ها به استثناء یک لوله، صد میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری اضافه گردید. در کنار این لوله‌ها، لوله کنترل مثبت (سوسپانسیون باکتری معادل 5×10^5 CFU/ml و محیط کشت) و لوله کنترل منفی (محیط مولر هینتون برات بدون باکتری و عصاره بره‌موم) قرار داده شد. بلافاصله بعد از کامل شدن، جذب لوله‌ها در دستگاه ایزا ریدر در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت گردید. سپس لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد و مجدداً جذب آن توسط دستگاه ایزا خوانده شد. اولین چاهک بدون کدورت (که جذب نوری آن تغییر نکرده بود به عنوان حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) گزارش شد. MBC با توجه به نتایج MIC تعیین شد. بدین منظور برای تعیین MBC میزان ۵ میکرولیتر از چاهک‌هایی لوله‌های مربوط به MIC که رشد باکتری متوقف شده بود به پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل شد و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه پلیت‌ها از نظر رشد بررسی و آخرین غلظتی که در پلیت مربوط به آن، فاقد رشد باکتری بودند به عنوان مقادیر MBC گزارش شدند. به منظور تأیید نتایج، آزمایشات سه بار تکرار گردید.

همچنین برای سنجش میزان MIC و MBC کمپیلوباکتر از محیط کشت اختصاصی آن استفاده گردید. به این صورت که رقت‌های مختلف نمونه در محیط کشت مخصوص تهیه شد و در ادامه در مجاورت سوسپانسیون باکتری معادل 5×10^5 CFU/ml هر یک از باکتری‌های مورد مطالعه به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. در کنار این لوله‌ها، لوله کنترل مثبت (سوسپانسیون باکتری) و لوله کنترل منفی (محیط کشت مخصوص بدون باکتری و بره‌موم) قرار گرفت و خوانش جذب توسط دستگاه ایزا در ۶۳۰ نانومتر انجام شد.

برای تعیین MBC از هر یک از لوله‌های فوق در محیط کشت اختصاصی (بروسلا آگار) کشت داده شد و آخرین رقتی که در آن کلنی مشاهده نشد به عنوان MBC شناسایی گردید. در کل آزمون ضد میکروبی از داروی کلرامفنیکل به عنوان شاهد دارویی استفاده گردید. لازم به ذکر است که برای اطمینان همه آزمون‌ها سه بار تکرار شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: به منظور تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده از انجام آزمایش، از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ و آنالیز تست آزمون دو طرفه فیشر (که به بررسی وجود ارتباط و یا مستقل بودن دو کمیت گروه‌بندی شده، می‌پردازد)

کدام یک نوار را در ستون تشکیل دادند. هر دسته از این ترکیبات پس از خارج شدن از ستون و رسیدن به آشکارساز با یک پیک در کروماتوگرام نشان داده شدند و ماهیت هر پیک با استفاده از زمانی که به آشکارساز رسید، مشخص شد. همچنین میزان غلظت هر ترکیب با استفاده از اندازه سطح زیر پیک یا ارتفاع پیک اندازه‌گیری گردید.

آزمون‌های میکروبی: باکتری‌های مورد در محیط کشت BHI به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس طبق دستورالعمل احیا شدند. سپس با کمک آزمون‌های ریخت‌شناسی تحت آزمایشات رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز و اوره آز مورد شناسایی قرار گرفت (۱۳).

ارزیابی آزمون‌های ضد میکروبی عصاره الکلی بره‌موم براساس انتشار در آگار و به روش چاهک انجام گرفت. بدین صورت که تعدادی چاهک به وسیله انتهای پیت پاستور استریل به قطر ۶ میلی‌متر در سطح هر محیط کشت ایجاد شد. سپس انتهای چاهک‌ها برای جلوگیری از نفوذ و گسترش اسانس به کف پتری دیش‌ها به وسیله آگار مذاب مسدود گردید. از کشت‌ها به منظور تهیه سوسپانسیون‌های باکتریایی با کدورتی معادل نیم مک فارلند در سرم فیزیولوژی استریل استفاده شد. در این روش با استفاده از سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند در چندین نقطه از سطح محیط کشت ریخته شد، سپس توسط اسپریدرال شکل بر سطح محیط کشت پخش گردید. در مرحله بعدی، درون چاهک‌ها با سمپلر، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره بره‌موم با رقت‌های مختلف (۱۰۰، ۷۵، ۵۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) توسط فیلتر میکرون ریخته شد. چاهک وسط به عنوان چاهک شاهد در نظر گرفته شد. محیط‌های کشت باکتریایی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوباسیون‌گذاری شدند، در نهایت هاله بازدارندگی در محیط اطراف چاهک‌ها با در نظر گرفتن قطر چاهک توسط خط‌کش اندازه‌گیری و به صورت میلی‌متر ثبت شدند. برای کمپیلوباکتر همین رویه ولی با استفاده از محیط کشت مذکور انجام شد. دو چاهک آخر که یکی حاوی سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت می‌باشد و به عنوان کنترل مثبت و چاهک دیگر حاوی محیط کشت و عصاره بره‌موم به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند.

سنجش میزان MIC و MBC: کمترین غلظت مهارکنندگی MIC و حداقل غلظت حذف‌کنندگی MBC بره‌موم به روش میکرودیالوشن انجام شد. برای این منظور رقت‌های مختلف نمونه که در محیط کشت مولر هینتون برات تهیه شد، در

قطر هاله عدم رشد باکتری‌های مورد بررسی در نتیجه اعمال عصاره بره‌موم: برای همه باکتری‌های این تحقیق بین غلظت‌های مختلف عصاره مورد مطالعه اختلاف معنی داری وجود دارد و با افزایش غلظت عصاره خاصیت ضد میکروبی نیز افزایش پیدا می‌کند (جدول ۲). در بررسی اثر ساده عصاره بر قطر ممانعت از رشد باکتری سالمونلا مشخص شد که بیشترین قطر هاله (۱۳ میلی‌متر) مربوط به غلظت ۱۰۰ mg/ml عصاره می‌باشد و کمترین آن‌ها مربوط به غلظت ۷۵ mg/ml درصد عصاره بره‌موم با قطر هاله ۹ میلی‌متری می‌باشد. همچنین در مورد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین قطر هاله (۱۴ میلی‌متر) مربوط به غلظت ۱۰۰ mg/ml عصاره می‌باشد و کمترین آن‌ها مربوط به غلظت ۵۰ mg/ml عصاره با قطر هاله ۶ میلی‌متری می‌باشد. برای باکتری اشرشیاکلی بیشترین قطر هاله (۱۳ میلی‌متر) مربوط به غلظت ۱۰۰ mg/ml عصاره می‌باشد و کمترین آن‌ها مربوط به غلظت ۵۰ mg/ml عصاره بره‌موم با قطر هاله ۸ میلی‌متری می‌باشد و در مورد اثر ساده عصاره بر قطر ممانعت از رشد کمپیلوباکتر مشخص شد که بیشترین قطر هاله (۱۶ میلی‌متر) مربوط به غلظت ۱۰۰ mg/ml عصاره مورد مطالعه می‌باشد و کمترین آن‌ها مربوط به غلظت ۵۰ mg/ml عصاره بره‌موم با قطر هاله ۹ میلی‌متری می‌باشد.

غلظت‌های بیشتر از ۵۰ (میلی‌گرم/میلی‌لیتر) عصاره بره‌موم، بیشترین قطر هاله عدم رشد را برای کمپیلوباکتر ژوژنی و کمترین قطر هاله عدم رشد را برای سالمونلا تیفی نشان می‌دهد (شکل ۱). همچنین مشخص شد که بیشترین قطر هاله عدم رشد تمام باکتری‌ها مربوط به غلظت ۱۰۰ (میلی‌گرم/میلی‌لیتر) عصاره بره‌موم و کمترین آن‌ها مربوط به غلظت ۲۵ (میلی‌گرم/میلی‌لیتر) عصاره مورد مطالعه می‌باشد. یافته‌ها نشان داده که افزایش قطر هاله در غلظت بالاتر از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$).

استفاده شد و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) بررسی‌های آماری انجام پذیرفت و در مقادیر کمتر از ۵ صدم به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

• یافته‌ها

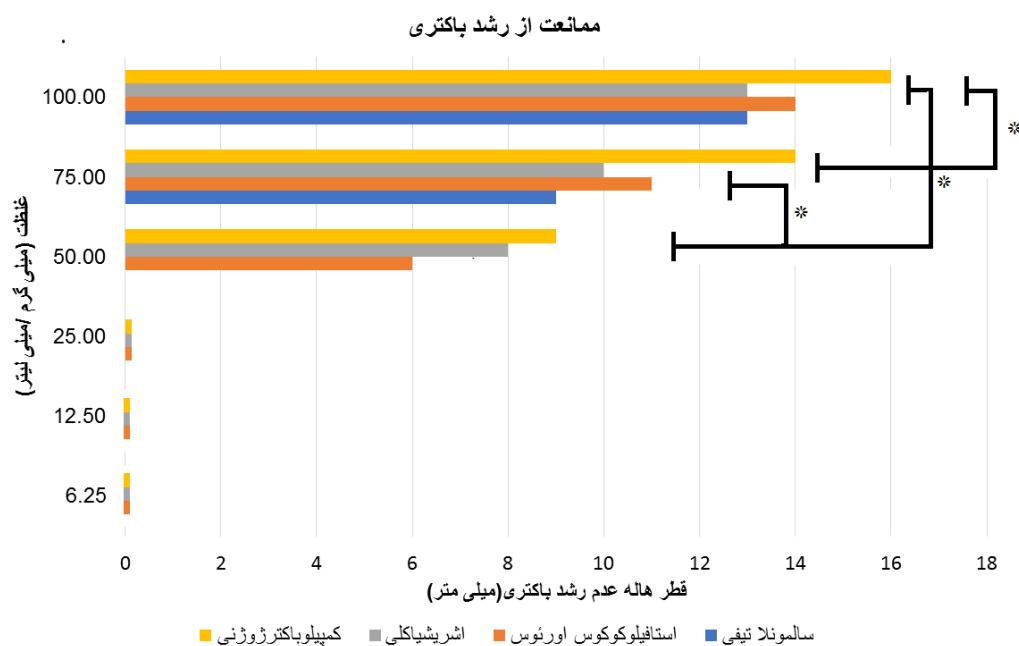
ترکیبات تشکیل دهنده عصاره بره‌موم: برای بررسی ترکیبات تشکیل دهنده عصاره بره‌موم از روش HPLC استفاده شد که نتایج آن در جدول ۱ آورده شده است. فنل‌ها و فلاونوئیدها که از جمله ترکیبات تشکیل دهنده بره‌موم هستند نه تنها اثرات آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند بلکه بر میکروارگانیسم‌ها هم اثر گذاشته و باعث تخریب یا ممانعت از رشد آنها می‌گردند. میزان کل ترکیبات فنلی و نیز محتوی ترکیبات فلاونوئیدی در نمونه‌های بره‌موم مورد استفاده به ترتیب ۵/۵۴ درصد وزنی بر حسب اسید گالیک و ۱۳/۴۴ درصد وزنی بر حسب کوئرستین به دست آمد.

جدول ۱. جدول ترکیبات تشکیل دهنده بره‌موم

ترکیبات فنلیک	زمان بازداری (دقیقه)	درصد وزنی (%)
گالیک اسید	۴۲/۰۵	۵/۵۴
کافئیک اسید	۴۱/۷۵	۳/۳۵
کانچین	۴۰/۸۰	۶/۵۶
اپیکانچین	۳۸/۲۹	۱۱/۷۲
لوتنین	۳۷/۴۴	۲/۵۹
کوئرستین	۳۹/۵۰	۱۳/۴۴
ژنیستئین	۳۷/۱۲	۵/۳۳
کرایسین	۴۳/۶۰	۳/۶۲
گلانچین	۳۳/۵۴	۲۱/۶۲
آپی ژنین	۵۱/۵۸	۱۵/۷۱
کور کومین	۴۲/۷۲	۸/۲۰
ترکیبات دیگر	۴۱/۹۳	۲/۳۲

جدول ۲. نتایج قطر هاله عدم رشد باکتری‌های تحقیق در محیط مولر هینتون آگار تحت تیمار و محیط کشت اختصاصی کمپیلوباکتر با غلظت‌های مختلف عصاره بره‌موم

قطر هاله عدم رشد باکتری (میلی‌متر)	غلظت عصاره بره‌موم (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)						میانگین (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)
	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۷۵	۱۰۰	
سالمونلا تیفی	۰	۰	۰	۰	۹	۱۳	۴۴/۷۹
استافیلوکوکوس اورئوس	۰	۰	۰	۶	۱۱	۱۴	۱۰/۳۳
اشرشیاکلی	۰	۰	۰	۸	۱۰	۱۳	۱۰/۳۳
کمپیلوباکتر	۰	۰	۰	۹	۱۴	۱۶	۱۳



شکل ۱. مقایسه نتایج ممانعت از رشد باکتری‌های مورد مطالعه در غلظت‌های مختلف عصاره برهموم، * سطح معنی‌دار کمتر از ۵ صدم

فلاونوئیدها، اسیدهای معطر، اسیدهای دی ترپنیک، و ترکیبات فنلی به عنوان اجزای اصلی که مسئول فعالیت‌های بیولوژیکی نمونه‌های برهموم هستند، ظاهر می‌شوند (۱۵). میان مقدار کل فلاونوئیدها و فعالیت بیولوژیکی و ضد میکروبی در برهموم همبستگی معنی‌داری وجود دارد (۱۶، ۱۷). برر سی ما نشان می‌دهد برهموم دارای ۳۵/۷۴ درصد ترکیبات فنلی می‌باشد و بیشترین درصد مربوط به گالانجین است. میزان کل ترکیبات فنلی و نیز محتوی ترکیبات فلاونوئیدی در نمونه برهموم مورد استفاده به ترتیب ۵/۵۴ درصد (برحسب اسید گالیک) و ۱۳/۴۴ درصد (برحسب کوئرستین) به دست آمد. نتایج به دست آمده از ترکیبات به دست آمده در این تحقیق با مطالعات قبلی مشابه بود (۲۱-۱۸).

طی مطالعه حاضر بررسی خواص ضد میکروبی نشان می‌دهد که غلظت‌های بیشتر از ۵۰ mg/ml عصاره برهموم، بیشترین قطر هاله عدم رشد را بر کمپیلوباکتر ژوژنی و کمترین قطر هاله عدم رشد را برای سالمونلا تیفی نشان می‌دهد. این در حالی است که بیشترین قطر هاله عدم رشد تمام باکتری‌ها مربوط به غلظت ۱۰۰ mg/ml عصاره ی برهموم و کمترین آنها مربوط به غلظت ۲۵ mg/ml عصاره مورد مطالعه گزارش شد. در واقع میزان اثر ضد باکتریایی برهموم بسته به نوع و جنس میکروارگانیسم‌ها متفاوت می‌باشد. طی مطالعات مشابه Daikh و Bartkiene گزارش شده که باکتری‌های گرم مثبت به غلظت کم برهموم حساس هستند و باکتری‌های گرم منفی

میزان MIC و MBC همان طور که جدول ۳ نشان می‌دهد، برای هر یک از باکتری‌ها در بازه مشخصی از غلظت‌های عصاره مورد مطالعه، خاصیت مهارکنندگی وجود دارد و مقادیر MBC تأیید کننده این موضوع می‌باشد؛ اما برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس عصاره مورد نظر در غلظت‌های ۱۰۰ تا ۶/۲۵ (میلی گرم بر میلی لیتر) خاصیت مهارکنندگی از خود نشان داد و نتایج MBC هم تأیید کننده این موضوع بود، با این تفاوت که در غلظت ۱۲/۵ (میلی گرم بر میلی لیتر) نتیجه MBC خلاف جهت نتیجه MIC را نشان داد و ثابت کرد که در این غلظت باکتری توان رشد همراه با عصاره را دارد.

جدول ۳. مقادیر مربوط به MIC و MBC عصاره برهموم علیه باکتری‌های مورد مطالعه

سویه مورد مطالعه	MIC (میلی گرم/میلی لیتر)	MBC (میلی گرم/میلی لیتر)
سالمونلا تیفی	۵۰	۵۰
استافیلوکوکوس اورئوس	۶/۲۵	۱۲/۵
اشریشیاکلی	۱۲/۵	۱۲/۵
کمپیلوباکتر ژوژنی	۵۰	۵۰

• بحث

برهموم، یک نام عمومی برای مواد صمغی جمع‌آوری شده توسط زنبور عسل از جوانه منابع گیاهی است (۱۴)

یافته‌های دیگر نیز این مسئله را نشان داده اند (۳۱، ۳۲). Al-Waili و همکاران در مطالعه‌ای مشابه نشان دادند که بره‌موم و عسل فعالیت ضد باکتری علیه استافیلوکوکوس اورئوس دارد و استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با باکتری گرم منفی اشریشیا کلی برای باکتری MIC و حساسیت بیشتری دارد (۳۱).

در این مطالعه همچنین مشاهده می‌شود (جدول ۳) که مقدار MIC برای هر چهار میکروارگانیسم نسبت به نتایج گذشته بالاتر بود (۲۶). این امر می‌تواند به پایین بودن محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی موجود در این نمونه باشد.

به طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که بره‌موم مورد آزمایش دارای اثرات ضد باکتریایی قابل قبولی بود. بررسی MIC و MBC عصاره بره‌موم علیه باکتری‌های مورد بررسی به شکل چشمگیری خاصیت مهارکنندگی این عصاره را نشان می‌دهد. مقایسه نتایج گزارش شده محققین با مقادیر گزارش شده در تحقیق حاضر بیانگر مقدار پایین ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی موجود در نمونه بره‌موم مورد مطالعه است. باتوجه به اینکه بره‌موم مورد مطالعه از منطقه‌ی طالقان جمع‌آوری شده است و همچنین نظر به این نکته که استان البرز در سال‌های اخیر با کاهش بارش و نزولات جوی روبه‌رو بوده است، احتمال داده می‌شود که شرایط آب و هوایی و جغرافیایی استان البرز در سال‌های اخیر بر خصوصیات بره‌موم‌های منطقه تأثیر گذاشته باشد.

بره‌موم اثر ضد میکروبی قابل توجهی بر باکتری‌های *سالمونلا تیفی*، *اشریشیاکلی*، *کمپیلوباکتر ژوژنی* داشت. اما در رابطه با *استافیلوکوکوس* این اثر کمتر است. این در حالی است که اثربخشی بره‌موم بر روی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی بیشتر است و همچنین میزان غلظت عصاره الکلی در عملکرد ضد میکروبی و مهار رشد باکتری مهم می‌باشد. این بررسی برای اولین بار نشان داده است که عصاره بره‌موم طالقان بر پاتوژن‌های آزمایشگاهی مؤثر است؛ بنابراین از بره‌موم می‌توان در درمان‌هایی که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده و یا دچار عواض جانبی ناشی از مصرف داروهای شیمیایی قرار می‌گیرند، به عنوان مکمل استفاده نمود. پیشنهاد می‌شود تحقیقات بیشتر در مورد غلظت مناسب و ایمن بودن بره‌موم به عنوان مکمل دارویی انجام شود.

را فقط می‌توان با دوز بالاتر بره‌موم مهار نمود (۲۳، ۲۲). پیشنهاد شده است که مقاومت باکتری‌های گرم منفی می‌تواند به دلیل وجود پمپ‌های خروجی باشد که از ورود اجزای بره‌موم به داخل سلول جلوگیری می‌کند. اثر ضعیف بر روی باکتری‌های گرم منفی را می‌توان با این واقعیت نیز توضیح داد که بره‌موم عمدتاً حاوی مواد تشکیل دهنده رزین‌های گیاهی است و رزین‌ها توسط گیاهان ترشح می‌شوند تا بیشتر از عوامل بیماری‌زا گرم مثبت محافظت کنند (۲۴). بررسی‌ها نشان می‌دهد که بره‌موم می‌تواند اثرات هم‌افزایی با داروهای ضد میکروبی داشته باشد. این ماده می‌تواند ماکروفاژها را فعال کرده، فعالیت میکروب‌کشی آنها را افزایش دهد و نیز تولید آنتی‌بادی‌ها را تحریک کند. بره‌موم به علت داشتن فالوونوئیدهایی مانند کوئرستین و روتین دارای خاصیت ضد میکروبی بوده که مکانیسم بازداری این ترکیبات به مهار پلیمرز باکتری برمی‌گردد (۲۵).

نتایج این تحقیق نشان داد که باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به دو باکتری گرم منفی اشریشیاکلی و سالمونلا حساسیت بیشتری را به عصاره بره‌موم نشان داد. یافته‌های Uzel و همکاران نیز در مطالعه خود نشان دادند که عصاره الکلی بره‌موم روی باکتری‌های گرم مثبت تأثیر قابل توجهی داشته و تقریباً رشد همه باکتری‌های مورد آزمایش را به صورت معنی‌داری مهار نموده است. برخلاف باکتری‌های گرم مثبت، بره‌موم بر رشد باکتری‌های گرم منفی تأثیر معنی‌داری نداشت (۲۶). وجود لایه پلی ساکارییدی دیواره و نیز فضای پری پلاسمیک از دلایل مهم این مقاومت نسبی گرم منفی‌ها می‌باشد که با نتایج حاصل از آزمون چاهک در این تحقیق مطابقت دارد. البته قابل ذکر است که در میان میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه در این تحقیق، کمپیلوباکتر جزو آن دسته از باکتری‌های گرم منفی است که با وجود گرم منفی بودن و مقاومت نسبی به آنتی‌بیوتیک‌های رایج نسبت به غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی بره‌موم دارد. (۲۹-۲۷).

در تحقیق ما برای سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اورئوس و کمپیلوباکتر میزان MIC و MBC یکسانی بدست آمد که این نشان دهنده قدرت بالای بره‌موم در خاصیت کشندگی (*bactericidal*) این میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. هرچه میزان MIC به MBC نزدیکتر باشد میزان کشندگی آن ماده مؤثره بیشتر می‌باشد. Widelski و همکاران در سال ۲۰۲۲ در بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی بره‌موم روی هلیکوباکتر پیلوری مشاهده کردند که در غلظت یکسان عصاره بره‌موم برای این باکتری میزان MIC و MBC یکسان درآمده است (۳۰).

• References

- Shabani M, Mokhtarian M, Kalbasi-Ashtari A, Kazempoor R. Effects of extracted propolis (*Apis mellifera*) on physicochemical and microbial properties of rainbow-trout fish burger patties. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2021;45(12). <https://doi.org/10.1111/jfpp.16027>.
- Socha R, Juszczak L, Pietrzyk S, Galkowska D, Fortuna T, Witczak T. Phenolic profile and antioxidant properties of Polish honeys: Antioxidant properties of honeys. *Int J Food Sci Technol* [Internet]. 2011;46(3):528–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02517.x>
- Tosic S, Stojanovic G, Mitic S, Pavlovic A, Alagic S. Mineral composition of selected Serbian Propolis samples. *J Apic Sci* [Internet]. 2017;61(1):5–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1515/jas-2017-0001>
- Kashi J, Kermanshahi K, Erfan R, Dastjerdi V, Rezaei E, Tabatabaei Y. Evaluating the In-vitro Antibacterial Effect of Iranian Propolis on Oral Microorganisms. *Iran J Pharm Res*. 2011;10:363–8.
- Franklin R, Cockerill III, Matthew A, Wikler MBA, Fidsa J, Michael N. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute M07-A9. 2012;32.
- Katirciolu H, Mercan N. Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions. *African Journal of Biotechnology*. 2006;5:1151–3.
- Pourjafar S, Mashak Z, Mirzaei M. The survey of microbial properties in commercial ready-to-eat foods at manufactures and hypermarkets in Alborz province. *Journal of Food Microbiology*, 2021. 8(1),73-87.
- Chethana GS, Venkatesh H, Gopinath KR. Preliminary phytochemical analysis of *Clerodendrum inerme*. *International Research Journal of Pharmacy*. 2013;4(5):208–9.
- Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie (Celle)* [Internet]. 1995;26(2):83–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1051/apido:19950202>
- Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem* [Internet]. 2004;84(3):329–39.
- Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests- Approved Standard, Eleventh Edition; M02–A11, Vol. 32 No. 1, January 2012
- Brown A., Smith H., Benson's Microbiological Applications, Laboratory Manual in General Microbiology, 2014, McGraw-Hill Education
- Sánchez-Moreno C, A. Larrauri J, Saura-Calixto F. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Res Int* [Internet]. 1999;32(6):407–12.
- Chethana, GS, Hari Venkatesh KR, Gopinath S.M. Preliminary phytochemical analysis of *Clerodendrum inerme*. *International Research Journal of Pharmacy* 2013;4(5): 208-209.
- Mutlu Sariguzel F, Berk E, Koc AN, Sav H, Demir G. Antifungal activity of propolis against yeasts isolated from blood culture: In vitro evaluation. *J. Clin. Lab. Anal*. 2016, 30, 513–516.
- Moreira L, Dias LG, Pereira JA, Estevinho L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2008;46(11):3482–5.
- Silva JC, Rodrigues S, Feás X, Estevinho LM. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2012;50(5):1790–5.
- Kalogeropoulos N, Konteles SJ, Troullidou E, Mourtzinis I, Karathanos VT. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chem* [Internet]. 2009;116(2):452–61.
- Kim JI, Pant HR, Sim H-J, Lee KM, Kim CS. Electrospun propolis/polyurethane composite nanofibers for biomedical applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* [Internet]. 2014;44:52–7.
- Shahedi M. Study on antimicrobial effect of propolis extract on some foodborne pathogenic bacteria [dissertation]. [Shahrekord Branch]: PhD Thesis in Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University; 2011 [in Persian].
- Anjum SI, Ullah A, Khan KA, Attaullah M, Khan H, Ali H, et al. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. 2019;26(7):1695–703.
- Bartkiene E, Lele V, Sakiene V, Zavistanaviciute P, Zokaityte E, Dauksiene A, et al. Variations of the antimicrobial, antioxidant, sensory attributes and biogenic amines content in Lithuania-derived bee products. *LWT-Food Sci. Technol*. 2020; 118, 108793.
- Daikh A, Segueni N, Dogan NM, Arslan S, Mutlu D, Kivrak I, et al. Comparative study of antibiofilm, cytotoxic activity and chemical composition of Algerian propolis. *J. Apicult. Res*. 2020, 59, 2.
- Seidel V, Peyfoon E, Watson DG, Fearnley J. Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones. *Phytother. Res*. 2008, 22, 1256–1263
- Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 1999;64(3):235–40. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741\(98\)00131-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741(98)00131-7).
- Uzel A, Sorkun K, Onçağ O, Cogulu D, Gençay O, Salih B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res* [Internet]. 2005;160(2):189–95.
- Sharifa AA, Neoh YL, Iswadi MI, Khairul O, Abdul Halim M, Jamaludin M, et al. Effects of Methanol, Ethanol and Aqueous Extract of *Plantago major* on Gram Positive Bacteria, Gram Negative Bacteria and Yeast. *Annals of Microscopy*. 2008.

28. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2003;67(4):593–656.
29. Boukraa L, Aitabderrahim L. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Méndez-Vilas A, editor. *Antimicrobial Properties of Bee Products and Medicinal Plants*. 2013;2:960–70.
30. Widelski J, Okińczyk P, Paluch E, Mroczek T, Szperlik J, Żuk, M, et al. The Antimicrobial Properties of Poplar and Aspen–Poplar Propolis and Their Active Components against Selected Microorganisms, including *Helicobacter pylori*. *Pathogens* 2022, 11, 191.
31. Vică ML, Glevitzky M, Hegheduș-Mîndru R.C, Glevitzky I, Matei H, Balici S, et al. Potential Effects of Romanian Propolis Extracts against Pathogen Strains. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2022, 19, 2640.
32. Al-Waili N, Al-Ghamdi A, Ansari MJ, Al-Attal Y, Salom K. Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* isolates in single and polymicrobial cultures. *Int J Med Sci*. 2012;9(9):793-800. doi:10.7150/ijms.4722.

Assessment of the Antimicrobial Effects of Propolis from Taleghan Region on Foodborne Pathogenic Bacteria

Olamaeian N¹, Kouhdar V^{*2}, Hosseini H³

1- Department of Health and Food Quality Control, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

2- *Corresponding author: Department of Health and Food Quality Control, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

3- Department of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received 30 Jan, 2022

Accepted 24 Apr, 2022

Background and Objectives: Propolis is one of the effective products against foodborne bacteria, which chemical composition varies based on the geographical location and vegetation of the region. The aim of this study was to investigate antibacterial effects of the alcoholic extract of propolis of Taleghan region on four bacteria, disease and food poisoning.

Materials & Methods: After preparing propolis, its alcoholic extract was collected. High pressure liquid chromatography was used to analyze substances and compounds of the extract. Then, microbial assessments were carried out using agar diffusion and well methods to assess effects of various concentrations of propolis extract on the bacteria. Data were analyzed using Fisher's exact test and analysis of variance.

Results: The maximum growth inhibitions of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* occurred at concentrations of 100 and 75 mg/ml of the extract. The minimum growth inhibition belonged to the concentration of 50 mg/ml of bromine extract. For each of the bacteria in a certain range of the extract concentrations, inhibitory characteristics and minimum bactericidal concentration values verified this. For *Staphylococcus aureus*, desired extract in concentrations of 100–6.25 mg/ml showed inhibitory characteristics with a difference that at a concentration of 12.5 mg/ml, minimum bactericidal concentration results were in contrast to minimum inhibitory concentration results.

Conclusion: Antimicrobial effects of the bromine extract on the pathogenic bacteria were demonstrated in the present study.

Keywords: Antimicrobial effects, *Escherichia coli* and *Campylobacter*, Pathogens, *Salmonella* and *Staphylococcus aureus*