

## Evaluation of antibacterial properties of alcohol and water extracts of propolis on *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas syringae* and *Serratia plymuthica*

**Etminani F., MSc<sup>1</sup>, Etminani A., MSc<sup>2</sup>, Darvishi Sh., PhD<sup>3</sup>**

1. Young researchers and Elite Club, Sanandaj branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran (Corresponding Author), Tel:+98-87-33241173, Faegheh.Etminani@yahoo.com
2. Young researchers and Elite Club, Sanandaj branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran,
3. Associate Professor, Department of Food Science &Technology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

### ABSTRACT

**Background and Aim:** Propolis is one of the most important bee products which has antibacterial property. This study was conducted to investigate antibacterial activity of propolis on *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas syringae* and *Serratia plymuthica*.

**Material and Method:** After propolis collection from different parts of Kurdistan Province and preparation of its alcohol and water extracts, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) for bacterial strains were determined. Data analysis was carried out by use of SPSS software. To compare mean values we used Duncan test at the significance level of 5%.

**Results:** Use of alcoholic solvent (96% ethanol and dimethyl sulfoxide) resulted in a greater mean diameter of growth inhibitory zone in comparison to water extract solvent ( $p<0.05$ ). Inhibitory concentrations (MICs) of alcoholic extract of propolis for *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas syringae* and *Serratia plymuthica* were 0.328, 0.656 and 1.31 mg/ml and The MBCs, were 0.328, 0.656 and 1.31 mg/ml respectively. The MICs of dimethyl sulfoxide extract for *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas syringae* and *Serratia plymuthica* were 0.656, 1.31 and 1.31 mg/ml and its MBCs for the above mentioned bacteria were 0.656, 1.31 and 1.31 mg/ml respectively. MICs of water extract of propolis for *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas syringae* and *Serratia plymuthica* were 1.31, 2.62 and 2.62 and its MBCs for these bacteria were 2.62, 5.25 and 5.25 respectively.

**Conclusion:** According to the results, alcohol and water extracts of propolis showed significant effects against *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas syringae* and *Serratia plymuthica* in laboratory condition.

**Keywords:** *Bacillus*, Propolis, *Serratia*, *Pseudomonas*.

**Received:** Nov 21, 2016    **Accepted:** Jun 14, 2017

## اثر عصاره اتانولی و آبی پروپولیس استان کردستان بر باکتری باسیلوس پومیلوس، سودوموناس سرینگه و سراشیا پلیموتیکا

فایقه اطمینانی<sup>۱</sup>، ادیبه اطمینانی<sup>۲</sup>، شعله درویشی<sup>۳</sup>

۱. عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سندج، سنترج، ایران (مؤلف مسحول)، تلفن ثابت: ۰۸۷-۳۳۲۴۱۱۷۳؛ Faegheh.Etminani@yahoo.com
۲. عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سندج، سنترج، ایران.
۳. دانشیار، گروه علوم صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سندج، سنترج، ایران.

### چکیده:

**مقدمه:** یکی از محصولات مهم کندوهای عسل، پروپولیس است که خاصیت ضد باکتریایی دارد. هدف از این تحقیق، تعیین فعالیت ضد میکروبی عصاره پروپولیس بر روی سویه‌های باکتریایی باسیلوس پومیلوس، سودوموناس سرینگه و سراشیا پلیموتیکا در شرایط آزمایشگاهی است.

**روش بورسی:** پس از جمع آوری پروپولیس از مناطق مختلف استان کردستان و تهیه عصاره‌های الکلی و آبی، حداقل غلظت مهارکنندگی MIC و غلظت کشنده‌گی MBC روی سویه‌های باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت. برای آنالیز آماری، از نرم افزار SPSS در قالب طرح کاملاً تصادفی و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون آماری DUNCAN در سطح احتمال ۵ درصد استفاده گردید.

**یافته‌ها:** میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره الکلی (یا استفاده از دو حلال اتانول ۹۶ درصد و دی متیل سولفواکسید) به صورت معنی داری بیش از عصاره آبی پروپولیس بود ( $P < 0.05$ ). حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره الکلی اتانولی پروپولیس برای باکتری باسیلوس پومیلوس ۰/۳۲۸ و برای سراشیا پلیموتیکا و سودوموناس سرینگه به ترتیب ۰/۶۵۶ و ۰/۳۱ او همچنین حداقل غلظت کشنده‌گی (MBC) عصاره الکلی اتانولی پروپولیس برای باکتری‌های باسیلوس پومیلوس، سراشیا پلیموتیکا و سودوموناس سرینگه به ترتیب ۰/۳۲۸، ۰/۶۵۶ و ۰/۳۱ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره الکلی دی متیل سولفواکسید برای باکتری‌های باسیلوس پومیلوس، سودوموناس سرینگه و سراشیا پلیموتیکا به ترتیب ۰/۶۵۶، ۰/۳۱ او ۰/۳۱، همچنین حداقل غلظت کشنده‌گی (MBC) به ترتیب ۰/۶۵۶، ۰/۳۱ و ۰/۳۱ تعیین گردید. پس از آن حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره آبی برای باکتری‌های باسیلوس پومیلوس، سراشیا پلیموتیکا و سودوموناس سرینگه به ترتیب ۱/۳۱، ۲/۶۲ و ۲/۶۲ مشاهده و حداقل غلظت کشنده‌گی (MBC) عصاره آبی به ترتیب ۲/۶۲، ۰/۲۵ و ۰/۲۵ مشخص شد.

**نتیجه‌گیری:** عصاره الکلی و آبی پروپولیس قادر به کنترل باکتری‌های باسیلوس پومیلوس، سراشیا پلیموتیکا و سودوموناس سرینگه در شرایط آزمایشگاهی بودند.

**کلید واژه:** باسیلوس، پروپولیس، سراشیا، سودوموناس  
وصول مقاله: ۹۶/۳/۲۴؛ اصلاحیه نهایی: ۹۶/۲/۲۳؛ پذیرش: ۹۵/۹/۱

**مقدمه**

آنتی بیوتیک‌ها داروهای مهمی برای مبارزه با عفونت‌های ناشی از باکتری‌ها، قارچ‌ها و برخی انگل‌ها به شمار می‌روند که معمولاً موجب کاهش رشد این گروه از میکرووارگانیسم‌ها شده و یا در نهایت موجب مرگ آن‌ها می‌گردد (۱). از مدت‌ها پیش استفاده از آنتی بیوتیک‌ها برای کنترل این دسته از ریزم موجودات به کار رفته و اثرات قابل توجهی داشته است. اما از مشکلات نگران کننده در رابطه با آنتی بیوتیک‌ها، مقاومت میکرووارگانیسم‌ها به آن است. مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی بیوتیک‌ها معمولاً براساس مکانیسم‌هایی نظیر تولید آنزیم‌های تخریب کننده‌ی دارو، تغییر نفوذپذیری باکتری نسبت به دارو، تغییر در گیرنده‌های دارو در سطح سلول باکتری، تغییر در ساختار دیواره‌ی سلولی باکتری و دستیابی به مسیرهای متابولیکی فرعی که جبران کننده‌ی واکنش مهار شده توسط دارو هستند، صورت می‌گیرد که یا به صورت موتابسیون خود به خودی بر روی ژن‌های کنترل کننده‌ی حساسیت باکتری و یا از طریق انتقال پلاسمید، از یک باکتری به باکتری دیگر منتقل می‌شوند (۲).

بنا به دلایل مختلفی نظیر استفاده‌ی گستردگی و بی‌رویه آنتی بیوتیک‌ها توسط انسان، فقدان تست‌های تشخیصی سریع جهت تعیین عوامل عفونت واستفاده‌ی نابجا آنتی بیوتیک‌ها به عنوان مکمل‌های غذایی یا پروفیلاکسی در صنعت دامپروری (صنعت پرورش آبزیان، دامداری) و یا به منظور کنترل بیماری‌ها در کشاورزی، مقاومت‌های آنتی بیوتیکی به سرعت گسترش یافته است (۱). در صورت عدم کنترل و گسترش روزافزون مقاومت آنتی بیوتیک، با افزایش گونه‌های باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک و افزایش شکست درمانی در زمینه درمان عفونت با میکروب‌های مقاوم به آنتی بیوتیکی رو به رو می‌شویم که این امر خود منجر به طولانی شدن دوره‌ی بیماری و به

موازات آن افزایش احتمال انتقال بیماری به سایر افراد جامعه، افزایش طول مدت زمان بستری در بیمارستان، افزایش نیاز به داروهایی گرانتر و در عین حال با عوارض بیشتر برای درمان و افزایش خطر مرگ و میر بیماران می‌گردد (۲).

در این پژوهش، سه باکتری سراشیا<sup>۱</sup> پلیموتیکا، سودوموناس سرینگک<sup>۲</sup> و پاسیلوس پومیلوس<sup>۳</sup> مورد بررسی قرار گرفت. سراشیا پلیموتیکا باکتری گرم منفی است که از محیط‌های اکولوژیکی مختلفی از جمله خاک، آب، گیاه، بدن حیوانات و محیط‌های بیمارستانی جداسازی و شناسایی شده است اگر چه این باکتری به عنوان عامل عفونی شدیدی مطرح نیست اما در افرادی که دارای نقص سیستم ایمنی هستند، موجب بروز مشکلات اساسی می‌گردد (۳). باکتری سودوموناس سرینگک، از باکتری‌های گرم منفی محیطی است که به عنوان عامل فساد مواد غذایی، سبزیجات و میوه‌ها موجب خسارات شدیدی می‌گردد (۴). باکتری پاسیلوس پومیلوس، یک باکتری گرم مثبت است که از محیط‌های اکولوژیک مختلف از جمله بدن انسان، گیاهان و خاک جداسازی شده است. عامل بیماری در سیستم‌های خونی در افراد بزرگسال و خردسال و بیماری‌های پوستی است. هم‌چنین به عنوان بیمارگر مهم در ایجاد مسمومیت‌های غذایی به شمار می‌رود (۵).

پروپولیس یا بره‌موم یک نوع رزین طبیعی است که توسط زنبور عسل از گیاهان اطراف کندو جمع‌آوری می‌گردد. این ماده به طور طبیعی از ۳۰ درصد موم، ۵۰ درصد صمغ، ۱۰ درصد اسانس‌های ضروری، آروماتیک و مواد معطر گیاهی و ۵ درصد گرده تشکیل شده است (۶ و ۷). ترکیب شیمیایی این ماده بسیار پیچیده است و بیش از ۳۰۰ ترکیب

<sup>۱</sup>*Serratia plymuthica*  
<sup>۲</sup>*Pseudomonas syringae*  
<sup>۳</sup>*Bacillus pumilus*

قامیش و سروآباد) در اواخر شهریور سال ۱۳۹۵ نمونه برداری به عمل آمد. برهموم ها در داخل فریزر (با دمای ۲۰- درجه سانتی گراد) نگهداری و به وسیله نیتروژن مایع (دمای ۱۹۶- درجه سانتی گراد) تبدیل به پودر گردید و برای عصاره گیری مورد استفاده قرار گرفت. تمامی سویه های باکتریابی از آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه کردستان تهیه شد.

#### فعال سازی و کشت باکتری ها:

برای فعال سازی سویه های باکتری، از محیط کشت های نوترینت براث و تریپتون سویا براث استفاده گردید و لوله های آزمایش محتوی سوسپانسون باکتری در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت در گرم خانه Memmert نگهداری گردیدند. ۲۴ ساعت پس از فعال سازی نمونه ها، باکتری ها در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد، در زیر هود لامینار، کنار شعله چراغ الکلی و در شرایط استریل با استفاده از لوب میکروبی بر محیط کشت نوترینت آگار به صورت خطی (streak) کشت گردید (۱۱).

تهیه عصاره های الکلی و عصاره آبی پروپولیس:

پروپولیس جمع آوری شده از کندوهای مختلف در سطح استان کردستان در اواخر شهریور سال ۱۳۹۵ در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند. برای تهیه پودر آن از نیتروژن مایع کمک گرفته شد. مقدار ۲۰ گرم از پودر با استفاده از ترازوی دیجیتالی BEL با دقت ده هزارم گرم توزین و در ۱۰۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد حل گردید.

محلول حاصل در یک ظرف استریل در بسته ریخته شد و در اتفاقی تاریک با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد برای دو هفته نگهداری شد. محلول الكل از کاغذ واتمن NO.۴ و پروپولیس از کاغذ واتمن NO.۱ برای تصفیه آنها عبور داده شد. برای تبخیر حلال و تخلیص هرچه بیشتر EV311 Lab پروپولیس از دستگاه روتاری اوپرатор

در نمونه های پروپولیس شناسائی شده اند که ترکیب آن به منبع گیاهی و فلور محلی بستگی دارد. پروپولیس دارای اسید های آلیاتیک و آروماتیک، استرها، فلاونوئیدها، قندها، گلیسرول، اسید فسفریک، وانیلین، میریستین، ویتامین های تیامین، ریبوفلاوین، نیاسین، پانتوئنیک اسید، پیریدوکسین A، C و E در مقدار مختلف می باشد. همچنین دارای مواد معدنی شامل آهن، منگنز، مس، کلسیم، وانادیوم، آلومینیوم، استراتیوم، سیلیکون، روی، سدیم، ید و منیزیم است و نیز دارای مقادیر بسیار کم اسید آمینه از نوع آرژنین و پروولین می باشد.

زنبورها از این ترکیب به منظور پر کردن سوراخ های کندو، صاف کردن دیواره های داخلی کندو، تقویت شانه ها و ضد عفونی محیط کندو استفاده می کنند به دلیل خاصیت ضد عفونی پروپولیس، از زمان های بسیار دور به عنوان یک داروی سنتی در درمان بیماری ها استفاده می شده است که امروزه خاصیت آنتی باکتریال، آنتی توموری، آنتی اکسیدان، آنتی ویروس و خواص ضد التهابی آن به اثبات رسیده است (۱۰-۸).

از آن جا که معمولاً باکتری ها با به کار گیری ساز و کارهای مختلف، به آنتی بیوتیک ها مقاومت نشان داده اند، لذا استفاده از ترکیبات طبیعی همانند پروپولیس در کنترل آنها امری ارزشمند به نظر می رسد و از طرفی چون ماهیت پروپولیس بسته به محل نمونه برداری متفاوت است این پژوهش به بررسی اثر عصاره های الکلی و آبی پروپولیس کردستان بر باکتری های مذکور پرداخته است.

#### روش بررسی

این مطالعه، یک مطالعه تجربی - آزمایشگاهی با محتوای کاربردی بود. به منظور آماده سازی عصاره پروپولیس، از کندوهای مختلف زنبور عسل در مناطق مختلف استان کردستان (کامیاران، بانه، روستای چناره، دهگلان، سراب

جنتامايسين، ناليديكسيك اسيد، پلي ميكسين و كليندامايسين استفاده گردید. و سپس پليت حاوي باكتريها و ديسكها برای ۲۴ ساعت در گرمخانه Memmert ۲۸ درجه سانتي گراد قرار داده شد.

ميانيگين قطر هاله عدم رشد توسط کوليسي بحسب ملي متر اندازه گيري گردید، اين آزمون در سه تكرار انجام پذيرفت.  
(۱۲).

#### تعين MIC

به اين منظور ۵/۲۵ ملي گرم از عصاره الكلى پروپوليسي پودر شده را در ۱۰۰۰ ميكروليتر الكل ۹۶ درصد و عصاره آبی پروپوليسي قرار داده شد و به مدت ۲ ساعت در دستگاه شيكر گذاشته شد تا كاملاً حل شود. سپس عصاره فراهم شده از فيلتر ميكروبى ۰/۲۲ ميكرون عبور داده شد. مطابق دستورالعمل موسسه استاندارد و تحقيقات صنعتي ايران شماره ۵۸۷۵ (نگهدارندها-تعين حداقل غلظت بازدارنده (MIC)) ۱۳ لوله آزميش برای هر سويء، در فور با دمای ۱۶۰ درجه سانتي گراد نگهداري گردید تا كاملاً سترون شود. سپس در لوله هاي شماره ۲ تا ۱۰، ۱۰۰۰ ميكروليتر از تريپتون سويا برات (اسيديته ۰/۰۲ Merck ۷/۱) توزيع گردید. لوله ها در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتي گراد ۱۵ دقيقه سترون شدند. سپس درون لوله شماره ۱، ۱۰۰۰ ميكروليتر از عصاره الكلى خالص ريخته شد و در لوله شماره ۲، ۱۰۰۰ ميكروليتر عصاره خالص اضافه گردید. بعد از حل شدن كامل از لوله شماره ۲، ۱۰۰۰ ميكروليتر برداشته و به لوله شماره ۳ منتقل گردید تا رقت ۱:۴ حاصل گردد. اين کار تا لوله شماره ۱۰ تكرار گردید. در نهايت از لوله شماره ۱۰، ۱۰۰۰ ميكروليتر بيرون ريخته شد تا حجم تمام لوله ها مشابه باشد. در نهايت برای هر سه باكتري رقت هاي زير فراهم گردید. به تمام لوله ها ۱۰۰۰ ميكروليتر از باكتري با غلظت نيم مك فارلندي ( $1/5 \times 10^4$ ) CFU/ml اضافه گردید تا شرياط برای تمام تيمارهای آزميش مشابه

Tech با سرعت ۱۰۰ دور در دقيقه و دمای ۴۰ درجه سانتي گراد استفاده گردید. عصاره خالص شده در دمای ۲۰- درجه سانتي گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداري شد و CHRIST برای خشك کردن، به دستگاه فريز دراير مدل ALPHA2-4 LD plus) انتقال داده شد. يك شبانه روز پس از آن، به صورت پودر خشك شده در دمای ۲۰ درجه سانتي گراد در حالی که با فويل آلومينومي پوشانده شده بود، نگهداري گردید، اين کار برای عصاره آبی به همين صورت انجام گرفت (۱۲).

تعين قطر هاله عدم رشد:

مطابق با استانداردهای آزميشگاهی و کلينيكي (CLSI<sup>۱</sup>) پروتكل M45-A برای تعين قطر هاله عدم رشد از روش ديسك ديفيوژن استفاده گردید. در واقع در اين روش ۵/۲۵ ملي گرم از عصاره خشك شده پروپوليسي حاصل از حل الكلی و عصاره آبی، وزن گردد و در ۱ مili ليتر الكل ۹۶ درصد حل گردد. سپس بر روی دستگاه شيكر به مدت ۲ ساعت نگهداري شد.

محلول حاصل را از فيلتر ميكروبى ۰/۲۲ ميكرون عبور داده شد تا سترون شود. ديسك هاي بلانك سترون را به محلول اضافه گردید و در فور memmert ۳۰ درجه سانتي گراد برای ۲۴ ساعت نگهداري گردید تا كاملاً خشك شود. بعد از آن از كشت تازه باكتريها، سوسپانسيوني با غلظت نيم مك فارلندي ( $1/5 \times 10^4$  باكتري در مili ليتر) در محيط تريپتون سويا برات (اسيديته ۰/۰۲ Merckv/۱۰/۰۲) تهيه شد و كاملاً به صورت چمني در سطح محيط كشت مولر هيتون آغاز پخش گردید، ديسك بر روی محيط با پنس سترون قرار داده شد.

برای كترل منفي، ديسك هاي بلانك سترون در اثانول ۹۶ درصد قرار داده شد. برای كترل مثبت هم از ديسك هاي استاندارد آنتي بيويك تراسايكلين، اريترومايسين،

<sup>۱</sup>Clinical and Laboratory Standards Institute

مجله علمي دانشگاه علوم پزشکي كردستان / دوهه بيست و دوهه / شهر و آبان ۱۳۹۶

## یافته ها:

میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره های پروپولیس، آنتی بیوتیک نتایج مربوط به قطر هاله عدم رشد در جدول ۱ نشان داده شده است. بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به عصاره الكلی (با اثانول ۹۶ درصد) به ترتیب برای باکتری باسیلوس پومیلوس، سراشیا پلیموتیکا و سودوموناس سرینگ (DMSO) و پس از آن مربوط به عصاره کلی (با حلال) به ترتیب برای باکتری باسیلوس پومیلوس، سراشیا پلیموتیکا و سودوموناس سرینگ و سودوموناس سرینگ و در آخر مربوط به عصاره آبی برای باکتری باسیلوس پومیلوس، سراشیا پلیموتیکا و سودوموناس سرینگ بود.

آنالیز آماری نشان داد که میانگین قطر هاله عدم رشد، عصاره الكلی (با حلال اثانول ۹۶ درصد و دی متیل سولفواکساید) به صورت معنی داری بیشتر از عصاره آبی است ( $P<0.05$ ).

باشد، این آزمایش برای هر سه تکرار به همین صورت انجام پذیرفت (۱۲).

## تعیین MBC

برای تعیین MBC، بعد از تهیه محیط کشت مولر هیستون آگار در پلیت های ۱۰ سانتی متری توزیع گردید و هر کدام از پلیت ها به ده قسمت مساوی تقسیم شد. سپس از لوله شماره ۱ تا لوله شماره ۱۰، عصاره الكلی و عصاره MIC آبی، ۱۰ میکرولیتر را برداشته و به پلیت اضافه شد و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد در انکوباتور نگهداری گردید، این آزمایش در سه تکرار انجام پذیرفت (۱۲).

## تجزیه و تحلیل آماری:

برای آنالیز آماری داده ها از نرم افزار SPSS V.20 در قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین آن ها با آزمون آماری DUNCAN انجام پذیرفت.

جدول ۱: میانگین قطر هاله عدم رشد دیسک های حاوی عصاره های آبی و الكلی برهموم بر باکتری های باسیلوس پومیلوس، سراشیا پلیموتیکا و سودوموناس سرینگ

مواد / قطر هاله عدم رشد (میلی متر)	عصاره آبی	سراشیا پلیموتیکا	سودوموناس سرینگ	باسیلوس پومیلوس
عصاره الكلی (athanol ۹۶ درصد)	۷/۳۳±۰/۵۸	۹/۶۶±۰/۵۸	۶/۳۳±۰/۵۸	۱۰/۶۷±۰/۰۵۸
عصاره الكلی (دی متیل سولفواکساید)	۸/۶۶±۰/۵۸	۷/۶۶±۰/۵۸	۷/۰±۱/۰	۱۲/۳۳±۰/۰۵۸
آب مقطر استریل	*	*	*	۱۴/۳۳
athanol ۹۶ درصد	*	*	*	۱۲/۳۳±۰/۰۵۸
دی متیل سولفواکساید	*	*	*	*

\* فقدان هاله عدم رشد

قطر هاله ۲۱، ۲۳، ۲۵، ۳۰ و ۲۱ حساس می باشدند اما به آنتی بیوتیک پلی میکسین مقاوم و نسبت به آنتی بیوتیک کلینیداما میسین با قطر هاله ۲۱ متوسط تعیین شد.

همچنین جدول ۲ نشان داده شده، که باکتری باسیلوس پومیلوس نسبت به آنتی بیوتیک های تتراسایکلین، اریترو ما میسین، جنتاما میسین و نالیدیکسیک اسید به ترتیب با

میکسین، کلینداماپسین و اریتروماپسین مقاوم و در برابر دیگر آنتی بیوتیک های تتراسایکلین، نالیدیک اسید و جنتامایسین به ترتیب با قطر هاله ۲۶، ۳۳، ۲۸ میلی متر حساس می باشد. دیسک های حاوی حلال (اتانول ۹۶ درصد، دی متیل سولفو اکسید) به عنوان کنترل منفی هیچ هاله عدم رشدی را نشان ندادند.

باکتری سودوموناس سرینگه نسبت به آنتی بیوتیک های تتراسایکلین، اریتروماپسین، جنتامایسین و نالیدیکسیک اسید به ترتیب با قطر هاله ۲۵، ۱۵، ۲۵، ۲۷ حساس می باشد اما به آنتی بیوتیک پلی میکسین مقاومت متوسط با قطر هاله ۱۵ و به آنتی بیوتیک کلینداماپسین مقاوم باشد. باکتری سراشیا پلیموتیکا نسبت به آنتی بیوتیک های پلی

جدول ۲- میانگین قطر هاله عدم رشد دیسک های حاوی آنتی بیوتیک های مختلف بر روی باکتری سراشیا پلیموتیکا، باسیلوس پومیلوس و سودوموناس سرینگه

CLSI			دیسک آنتی بیوتیک		
S	I	R	باسیلوس	سودوموناس سرینگه	سراشیا پلیموتیکا
پومیلوس					
≥۱۹	۱۸-۱۵	≤۱۴	۲۵	۲۵	۲۶
≥۱۵	۱۴-۱۲	≤۱۱	۲۳	۱۵	۸
≥۱۵	۱۴-۱۳	≤۱۲	۳۰	۲۵	۲۸
≥۲۱	۲۰-۱۵	≤۱۴	۲۱	۲۷	۳۳
≥۱۹	۱۸-۱۴	≤۱۳	-	۱۵	-
≥۲۳	۲۲-۱۴	≤۱۳	۲۱	-	-

کشنده (MBC) برای باکتری های باسیلوس پومیلوس، سراشیا پلیموتیکا و سودوموناس سرینگه به ترتیب ۱/۳۱ و ۱/۳۱ و ۱/۳۱ ملاحظه شد (جدول ۴). پس از آن حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) عصاره آبی برای باکتری های باسیلوس پومیلوس، سودوموناس سرینگه و سراشیا پلیموتیکا به ترتیب ۱/۳۱، ۱/۶۲ و ۲/۶۲ مشاهده و حداقل غلظت کشنده (MBC) عصاره آبی به ترتیب ۲/۶۲، ۵/۲۵ و ۵/۲۵ تعیین گردید (جدول ۵). در غلظت صفر از عصاره حلال در هیچ اثری بر کاهش یا عدم رشد باکتری نشان داده نشد.

حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) عصاره الكلی اتانولی پروپولیس برای باکتری باسیلوس پومیلوس ۰/۳۲۸ و برای سراشیا پلیموتیکا و سودوموناس سرینگه به ترتیب ۰/۶۵۶ و ۰/۳۱ و هم چنین حداقل غلظت کشنده (MBC) عصاره الكلی اتانولی پروپولیس برای باکتری های مذکور به ترتیب ۰/۳۲۸ و ۰/۶۵۶ و ۱/۳۱ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین گردید (جدول ۳).

حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) عصاره الكلی دی متیل سولفو اکسید برای باکتری های باسیلوس پومیلوس، سودوموناس سرینگه و سراشیا پلیموتیکا به ترتیب ۱/۰۳۱ و ۱/۳۱ همچنین حداقل غلظت

جدول ۳- مقدار MIC و MBC عصاره الکلی (با اتانول ۹۶ درصد) پروپولیس برای باکتری باسیلوس پومیلوس، سودوموناس سرینگه و سراشیا پلیموتیکا

سری رت	غلظت (mg/ml)	باسیلوس پومیلوس		سودوموناس سرینگه		سراشیا پلیموتیکا	
		پروپولیس	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
۱/۱	۵/۲۵	-	-	-	-	-	-
۱/۲	۲/۶۲	-	-	-	-	-	-
۱/۴	۱/۳۱	-	-	-	-	-	-
۱/۸	۰/۶۵۶	-	-	+	+	-	-
۱/۱۶	۰/۳۲۸	-	-	+	+	+	+
۱/۳۲	۰/۱۶۴	+	+	+	+	+	+
۱/۶۴	۰/۰۸۲	+	+	+	+	+	+
۱/۱۲۸	۰/۰۴۱	+	+	+	+	+	+
۱/۲۵۶	۰/۰۲	+	+	+	+	+	+
۱/۵۱۲	۰/۰۱	+	+	+	+	+	+

جدول ۴- مقدار MIC و MBC عصاره الکلی (با دی میل سولفو کسید) پروپولیس برای باکتری باسیلوس پومیلوس، سودوموناس سرینگه و سراشیا پلیموتیکا

سری رت	غلظت (mg/ml)	باسیلوس پومیلوس		سودوموناس سرینگه		سراشیا پلیموتیکا	
		پروپولیس	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
۱/۱	۵/۲۵	-	-	-	-	-	-
۱/۲	۲/۶۲	-	-	-	-	-	-
۱/۴	۱/۳۱	-	-	-	-	-	-
۱/۸	۰/۶۵۶	-	-	+	+	+	+
۱/۱۶	۰/۳۲۸	+	+	+	+	+	+
۱/۳۲	۰/۱۶۴	+	+	+	+	+	+
۱/۶۴	۰/۰۸۲	+	+	+	+	+	+
۱/۱۲۸	۰/۰۴۱	+	+	+	+	+	+
۱/۲۵۶	۰/۰۲	+	+	+	+	+	+
۱/۵۱۲	۰/۰۱	+	+	+	+	+	+

جدول ۵- مقدار MIC و MBC عصاره آبی پروپولیس برای باکتری باسیلوس پومیلوس، سودوموناس سرینگه و سراشیا پلیموتیکا

	سری رقت (mg/ml)	غاظت پروپولیس	باسیلوس پومیلوس		سودوموناس سرینگه		سراشیا پلیموتیکا	
			MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
۱/۱	۵/۲۵	-	-	-	-	-	-	-
۱/۲	۲/۶۲	-	-	-	+	-	-	+
۱/۴	۱/۳۱	-	+	+	+	+	+	+
۱/۸	۰/۶۵۶	+	+	+	+	+	+	+
۱/۱۶	۰/۳۲۸	+	+	+	+	+	+	+
۱/۳۲	۰/۱۶۴	+	+	+	+	+	+	+
۱/۶۴	۰/۰۸۲	+	+	+	+	+	+	+
۱/۱۲۸	۰/۰۴۱	+	+	+	+	+	+	+
۱/۲۵۶	۰/۰۲	+	+	+	+	+	+	+
۱/۵۱۲	۰/۰۱	+	+	+	+	+	+	+

### میکروگانیسم‌هاو یا غیر مستقیم از طریق تحریک سیستم ایمنی است (۹ و ۱۰).

Dziedzic و همکاران (۱۴) این خاصیت ضد میکروبی را به مکانیسم اثر پروپولیس بر تقسیم سلولی، تغییر ماهیت سیتوپلاسمی و غشای باکتری مرتبط می‌دانند. البته نقش پروپولیس بر فعالیت آنزیم‌های RNA پلیمرازهای واپسنه به DNA و گلوکز ترانس فراز باکتری اثر می‌گذارد که احتمالاً بی ارتباط با خاصیت ضد میکروبی پروپولیس بر باکتری‌ها نباشد.

Mohammadzadeh و همکاران (۱۵) بر این باورند که اثر پروپولیس در مهار باکتری‌های گرم مثبت بیش از باکتری‌های گرم منفی است. در تحقیق حاضر، عصاره الكلی پروپولیس بر باکتری باسیلوس پومیلوس نتایج قابل ملاحظه‌ای از عدم رشد باکتری نشان داد، اگرچه خاصیت ضد میکروبی آن علیه باکتری‌های سراشیا پلیموتیکا و سودوموناس سرینگه هم ملاحظه گردید ولی تاثیر آن بر باکتری گرم مثبت باسیلوس پومیلوس بیش از باکتری‌های گرم منفی سودوموناس سرینگه و سراشیا پلیموتیکا می‌باشد.

### بحث

محفویات و ماهیت پروپولیس به شرایط مختلفی از قبیل نوع گیاهان موجود در یک منطقه، متفاوت است. از طرفی شرایط دمایی محیط پیرامونی آن اثر به سزایی بر ماهیت آن بر جای می‌گذارد. به گونه‌ای که نتایج تحقیقات انجام پذیرفته توسط دانشمندان نشان می‌دهد که در دمای اتاق حالت چسبنده دارد اما زمانی که در دماهای پایین قرار می‌گیرد، سخت و شکننده می‌گردد (۱۳).

در مقالات متعدد به خواص ضد میکروبی پروپولیس به وفور اشاره شده است. این توانائی ممکن است به واسطه‌ی اثرات مستقیم آن بر روی میکروگانیسم‌ها حاصل شود و یا به صورت غیر مستقیم با تحریک سیستم ایمنی موجب مرگ بیش تر میکروب‌ها گردد. به علاوه پروپولیس ممکن است با دیگر داروهای ضد میکروبی اثر سینرژیستیکی داشته باشد. مهم‌ترین خواص داروبی برهموم، اثرات آنتی‌بیوتیکی، ضد قارچی، ضد ویروسی و ضد باکتریایی آن است. فعالیت ضد میکروبی پروپولیس ممکن است به واسطه‌ی اثر مستقیم بر

مطالعه‌ی Ibanrikynti و همکاران (۱۹) نشان داد که عصاره‌ی الکلی پروپولیس می‌تواند در درمان باکتری‌های *Bacillus* بیماری‌زای مختلفی از قبیل *Staphylococcus aureus* MTCC430 و *Salmonella aureus* MTCC96 و *Escherichia coli enterica* MTCC735 موثر باشد. البته آن‌ها بیان داشتند که اثر پروپولیس در کنترل باکتری‌های گرم مثبت بیش از باکتری‌های گرم منفی است.

Basim و همکاران (۲۰) بیان داشتند که باکتری سودوموناس سرینگه از باکتری‌های حساس به پروپولیس می‌باشد. در مطالعه‌ی آن‌ها حداقل غلظت بازدارندگی مربوط به  $1/100$  از دانه گرده و بیشترین آن مربوط به  $1/1000$  از عصاره‌ی پروپولیس است، خاصیت بازدارندگی پروپولیس بیش از دانه گرده ملاحظه گردید. در حالی که در تحقیق حاضر بیشترین فعالیت ضد باکتریابی برای باکتری سودوموناس سرینگه مربوط به عصاره‌ی الکلی با سری رقت  $1/4$  ( $1/31$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) ملاحظه شد. که این اختلاف احتمالاً مرتبط با تفاوت نوع پوشش گیاهی منطقه‌ای که برهموم از آن تهیه شده است، باشد.

در رابطه با این پژوهش میزان رشد باکتری توسط پروپولیس با میزان پروپولیس موجود در رقت‌ها رابطه‌ی مستقیم دارد و با افزایش میزان بره موم در هر رقت از تعداد کلنی‌های باکتری‌ها بعد از کشت مجدد کاسته شده است. مرادی (۲۱) در پژوهش خود گزارش نمود که در غلظت  $0.32$  میلی‌گرم در میلی‌لیتر هیچ گونه کلنی باکتری *P.larve* رشد ننموده است و این غلظت را به عنوان حداقل غلظت ممانعت کننده‌ی از رشد باکتری *P.larve* توسط بره موم گزارش نمود و هم چنین نشان داد که با افزایش میزان بره موم در هر رقت از تعداد کلنی کاسته شده که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد.

که مطابق با مطالعات Pascoal و همکاران (۱۶) این تفاوت به اختلاف دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مربوط می‌شود. در این تحقیق از آن جا که از عصاره‌های حلال‌های آبی، الکلی و دی‌متیل سولفوکسید استفاده گردیده است، هر یک از مواد موجود در عصاره در حلال حل شده، و موجب شده خواص ضد میکروبی و مهاری نشان دهدند. در نتیجه وقتی از عصاره‌های رقت پایین تهیه می‌شود، اگرچه هر دو گونه این مواد غلط‌نشان کم می‌شود ولی با کاهش اثر مهاری میکروبی، اثر ضد میکروبی بیشتر خودش را نشان می‌دهد. در رابطه با عصاره‌های الکلی و دی‌متیل سولفوکسید برای هر سه باکتری مورد مطالعه در غلظت‌های مشابه MIC و MBC دیده شود. در حالی که در عصاره‌ی آبی حداقل غلظت مهارکننده‌ی (MIC) عصاره‌ی آبی برای باکتری‌های باسیلوس پومیلوس، سودوموناس سرینگه و سراشیا پلیموتیکا به ترتیب  $1/31$ ،  $2/62$  و  $2/62$  مشاهده و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌ی آبی به ترتیب  $2/62$ ،  $5/25$  و  $5/25$  تعیین گردید.

kalvandi و همکاران (۱۷) نیز اثر آن را بر باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس و استرپتوکوک موتانس بیش از باکتری گرم منفی انتروباکتر ارزیابی نمودند.

Najafi و همکاران (۱۸) در بررسی عصاره‌ی پروپولیس ایرانی، دریافتند که پروپولیس موجب کاهش رشد و اندازه سلول باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* گردید.

Mohammadzadeh و همکاران (۱۵) بر این باورند که اثر پروپولیس در مهار باکتری‌های گرم مثبت بیش از باکتری‌های گرم منفی است که نتایج آن‌ها با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد.

تحمیل هزینه‌های درمانی و عوارض جانبی برای بیماران است، لذا یافتن ترکیباتی طبیعی (از جمله پروپولیس) با خاصیت ضد میکروبی، به دلیل ماهیت طبیعی و ایمن بودن آن برای سلامت انسان و محیط زیست می‌تواند با مطالعات بیشتر توصیه گردد.

به نظر می‌رسد که با مطالعه‌ی پروپولیس‌های حاصل از کندوهای زنبورعسل در مناطق مختلف و بررسی خواص ضد میکروبی آن بتوان از این ترکیب طبیعی به جای آنتی‌بیوتیک‌های صنعتی استفاده نمود.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق بخشی از طرح پژوهشی با شماره ثبت ۹۴۵۷۵ است. لذا نویسنده‌گان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را نسبت به ریاست باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان واحد سنتدج به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی در اجرای این مطالعه ابراز می‌دارند.

### نتیجه‌گیری

دراین بررسی برای اولین بار مشاهده شد که عصاره‌های آبی و الکلی با حلال‌های اتانول و دی‌متیل سولفواکسید، پروپولیس کردستان بر باکتری‌های باسیلوس پومیلوس، سراشیا پلیموتیکا و سودوموناس سرینگه در شرایط آزمایشگاه موثر می‌باشد، و از آنجا که پیدایش اشکال مقاوم باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها غالباً به میزان زیاد به وقوع می‌پیوندد و از طرفی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها همراه با

### References

1. Lawrence R, Jeyakumar E. Antimicrobial Resistance: A Cause for Global Concern. *BMC Proc* 2013; 7:S1.
2. Stockwell VO, Duffy B. Use of antibiotics in plant agriculture. *Rev Sci Tech* 2012; 31: 199-210.
3. Grimont F, Grimont PAD. *Prokaryotes* 2006; 6: 219-44.
4. Ashorpour M, Niknejad Kazempour M, Ramezanie M. Bacterial canker of olives caused *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Iran. *Sciatica Horticulture* 2008; 118: 128-31.
5. Kimouli M, Vrioni G, Papadopoulou M, Koumaki V, Petropoulou D, Gounaris A, Friedrich AW, Tsakris A. Two cases of severe sepsis caused by *Bacillus pumilus* in neonatal infants. *J of Med Microbiol* 2012;61:596-9.
6. Curifuta M, Vidal J, Sanchez J, Contreras A, Salazar L, Alvear M. The in vitro antifungal evaluation of a commercial extract of Chilean propolis against six fungi of agricultural importance. *Cienc Investig Agrar* 2012; 39:347-59.
7. Demestre M, Messerill S, Celli N, Shahhossini M, Kluwe L, Mautner, V, et al. CAPE (caffeic acid phenethyl ester)- based propolis extract (Bio 30) suppresses the growth of human neurofibromatosis (NF) tumor xenografts in mice. *Phytother Res* 2009; 23: 226-30.
8. Tosi EA, Edmundo R, Ortega ME, Cazzoli AF. Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. *Food Chem* 2007; 104: 1025-29.
9. Ristivojević P, Dimkić I, Trifković J, Berić T, Vovk I, Milojković-Opsenica, D, et al. Antimicrobial activity of Serbian propolis evaluated by means of MIC, HPTLC, Bioautography and Chemometrics. *PLoS ONE* 2016; 11:1-15.

10. Orsi RO, Sforcin J, Funari SRC, Fernandes JRA, Rodrigues P, Bankova V. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on *Salmonella* serovars. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2007; 13:748-57.
11. Bonnie H, Ownley R, Trigiano N. Plant Pathology Concepts and Laboratory Exercises. 3th ed. Taylor and Francis Group, 2016; 582.
12. Jafarzadeh Kashi TS, Kasra Kermanshahi R, Erfan M, Vahid Dastjerdi E, Rezaei Y, Tabatabaei FS. Evaluating the In-vitro Antibacterial Effect of Iranian Propolis on Oral Microorganisms. *Iran J Pharm Res* 2011;10: 363-8.
13. Bassani-Silva S, Sforcin JM, Amaral AS, GasparLF,& Rocha NS. Propolis effect in vitro on canine transmissible venereal tumor cells. *Rev port ciênc* 2007; 102: 261-5.
14. Dziedzic A, Kubina R, Wojtyczka RD, Kabala-Dzik A, Tanasiewicz M, Morawiec T. The antibacterial effect of ethanol extract of polish propolis on mutans streptococci and lactobacilli isolated from saliva. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013: 1-12.
15. Mohammadzadeh S, Shariatpanahi M, Hamedi M, Ahmadkhaniha R, Samadi N, Ostad SN. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chem* 2007; 103: 1097-103.
16. Pascoal A, Rodrigues S, Teixeira A, Fe?as X, & Estevinho, L. M.. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food Chem Toxicol* 2014; 63: 233-9.
17. Kalvandi R, Darvishi S, & Davari, K. Evaluation of antibacterial properties of ethanol and oil extracts of propolis in Kurdistan Province, on *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans* and *Entrobacter aerogenes*. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences (SJKUMS)* 2016; 21: 85-93. [In Persian]
18. Najafi MF, Vahedy F, Seyyedin M, Jomehzadeh HR, Bozary K. Effect of the water extracts of propolis on stimulation and inhibition of different cells. *Cytotechnology* 2007; 54:49-56.
19. Ibanrikynti T, Fenella MWN, Santa RJ, Surya BP. Antibacterial and antitumor activity of methanolic extract of Propolis from Meghalaya. *World J Pharm Pharm Sci* 2015; 4: 1809-21.
20. Basim E, Basim H, & ?zcan, M. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *J Food Eng* 2006; 77: 992-6.
21. Moradi M. Antibacterial effect of etanolic extract of honeybee propolis on the *Paenibacillus larvae* larvae (causative agent of honeybee American foulbrood disease). *Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi)* 2009; 83: 57-61. [In Persian]