

اثر ضد باکتریایی بره موم زنبور عسل روی تعدادی از باکتریهای بیماریزا

دکتر احمد فرج زاده شیخ* دکتر احمد فانی یگانه**

* استادیار گروه میکروپزشناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز

** داروساز - اهواز

چکیده

بره موم Propolis یا چسب زنبور، یک فراورده رزینی کندوی زنبور عسل می باشد که از دیرباز شناخته شده و در درمان بیماریهای عفونی مورد استفاده قرار گرفته است. این ماده نیز به دلیل داشتن اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی و دیگر اثرات فارماکولوژی سودمند مورد توجه محققان می باشد. تفاوت در نوع بره موم کشورهای مختلف ما را بر آن داشت تا به بررسی اثرات ضدباکتریایی بره موم ایران بپردازیم. در این تحقیق عصاره بره موم توسط حلالهای متانول، اتانول و کلروفرم، به روش هضم با غلظت های ۳۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، درصد وزنی تهیه گردید. جهت ارزیابی اثر ضدباکتریایی بره موم، از روش انتشاری دیسک کاغذی استفاده شد، پس از تزریق ۱۰ میکرولیتر از هر کدام از عصاره های اتانولی، متانولی و کلروفرمی در دیسک های بلانک، اثرات ضدباکتریایی عصاره ها روی باکتریای استافیلوکوک ارئوس، استرپتوکوک پیوژن، پseudomonas انووجینوزا، اشیرشیاکلی، پروتئوس و لگاریس مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که باکتری استافیلوکوک ارئوس و استرپتوکوک پیوژن نسبت به عصاره های بدست آمده از بره موم حساس و سایر باکتریهای مورد آزمایش نسبت به این ماده مقاوم می باشند. همچنین مشخص شد که عصاره های بدست آمده از حلالهای مختلف اثرات ضدباکتریایی یکسانی را روی باکتریها اعمال می نمایند.

کلید واژه ها: باکتری ها - بیماریزایی / بره موم زنبور عسل

مقدمه

موقعیت آنتی بیوتیکها در درمان بیماریها باعث شده است تا آنها یک دسته بزرگ از داروها را تشکیل دهند. از سالها پیش همواره از گیاهان و قارچها بعنوان دارو در درمان بیماریهای عفونی استفاده می شده است. ۶۰۰-۵۰۰ سال قبل از میلاد، چینی ها شیره کپک زده لوبیای شور را در درمان کورک و جوش بکار می بردند (۱). با کشف پنی سیلین باب تازه ای در درمان عفونت ها بوسیله آنتی بیوتیک باز شد. کاربرد روزافزون این مواد ضدباکتریایی مسئله مقاومت باکتریها رابطور جدی مطرح ساخت و بشر را هر چه بیشتر محتاج به کشف آنتی بیوتیکها با منابع مختلف و جدید نموده است.

بره موم یکی از موادی است که به عنوان یک ماده ضد عفونی کننده از صدها و شاید هزاران سال پیش مورد استفاده قرار می گرفته است (۱۱). فراعنه مصر برای مومیایی

اجساد از آن استفاده می نمودند (۱۰). بره موم یک ماده صمغی است که توسط زنبور عسل از جوانه درختان جمع آوری و ساخته میشود. میزان جمع آوری این ماده در نژادهای مختلف زنبور متفاوت است (۳ و ۱۱). زنبور عسل از بره موم به عنوان یک ضد عفونی کننده، برای پوشش جدار داخلی سلولها قبل و بعد از ورود لارو استفاده می کند (۳). تعدادی از ترکیبات موجود در بره موم عبارتند از: اسید آمینه پیروگلو تامیک اسید Pyroglutamic acid، اسیدهای دارای زنجیره خطی، اسیدهای اروماتیک و استرهای آن، الکلها Alcohols، الدیها Aldehyds، چالکونها Chalcones، فلانونها Flavanones، فلاونها Flavones، هیدروکربنها Hydrocarbons، ترپنوئیدها Terpenoids و استرول و علاوه بر این تعدادی از قندها گزارش گردیده است (۷). محققین مواد مؤثر ضد میکروبی بره موم را مربوط به

ATCC 25923 (*Staphylococcus aureus*)، استرپتوکوک پیوژنز (*Streptococcus pyogenes*)، اشرشیا کلی (*Escherichia coli*)، سالمونلاتیفی (*Salmonella typhi*)، پسمودوموناس اثروجینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) و پروتئوس ولگاریس (*Proteus vulgaris*) تهیه شده از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران، سوسپانسیون از این باکتریها با کدورتی برابر با استاندارد ۵/۵ مک فارلند ($10^8 \times 1/5$ Bac/ml) تهیه و توسط سوآپ بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار و باکتری استرپتوکوک پیوژنز بر روی ژلوز خوندار منتقل گردید (۴). دیسکهای تهیه شده مورد آزمایش و شاهد روی محیط کشت شده هر یک از باکتریها در روی مولر هینتون آگار گذاشته شدند و پس از ۱۸ ساعت نگهداری در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد، قطر هاله‌های عدم رشد باکتری اطراف هر دیسک توسط خط کش اندازه‌گیری شد.

برای بررسی قدرت پایداری اثر ضد باکتریایی بره‌موم عصاره آناتولی این ماده با غلظت ۱۰٪ به مدت ۶ ماه بر روی باکتری استاف آرئوس مورد مطالعه قرار گرفت. در این تحقیق از روش آماری آزمون تجزیه و تحلیل پراش و آزمون توکی (HSD) استفاده شد.

نتایج

ابتدا اثر عصاره متانولی، اتانولی و کلروفرمی بره‌موم با غلظت‌های مختلف بر سوش‌های باکتریهای مورد مطالعه کشت داده شده بر روی پلیت مولر هینتون آگار و ژلوز خوندار مورد بررسی قرار گرفت (هر آزمایش ۵ بار تکرار گردید که نتیجه کار بصورت میانگین X نشان داده شده است) که نتایج آن در جدول ۱ درج شده است.

آزمایشات انجام شده نشان داد که اختلاف معنی‌داری ($P < 0/005$) بین اثر ضدباکتریایی دیسکهای شاهد و دیسکهای بره‌موم وجود دارد.

در مقایسه اثر عصاره‌های متانولی، اتانولی و کلروفرمی بره‌موم روی باکتریها، از عصاره‌های بدست آمده از سه حلال، بر روی استافیلوکوک ارئوس، استرپتوکوک پیوژنز آزمایش شد و قطر هاله عدم رشد هر کدام از آنها مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در نمودار ۱ و ۲ نشان داده شده است. پایداری اثر ضدباکتریایی بره‌موم، با عصاره اتانولی این ماده بر روی استاف آرئوس مورد بررسی قرار گرفت که نتیجه آن در نمودار ۳ نشان داده شده است.

فلاونوئیدها و استرهايشان میدانند (۷، ۱۱). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که کنترل عفونتهای ویروسی هرپسی Herpes Viruses، ادنو Adeno virus، وکرونو Corona virus، با مکانیسم مهار همانندسازی ویروس و تحریک سیستم ایمنی بدن انجام می‌گیرد (۵). در سال ۱۹۸۲ عصاره آناتولی این ماده بر روی باسیلوس سوبتیلیس *Bacillus Subtilis* مورد مطالعه و اثر ضدباکتریایی آن مشخص گردید (۱۳). و در مطالعه دیگر کنترل پوسیدگی دندان در موش صحرایی بعلت اثر این ماده بر روی استرپتوکوک موتاتس *Streptococcus mutans* و استرپتوکوک سوربینوس *S. sorbinus* مشخص شد (۸). بررسی بره‌موم اروپا و اکوادور نشان داد که بره‌موم اکوادور بر خلاف نوع اروپایی، فاقد فلاونوئیدها *Flavonoids* و اسیدهای آروماتیک و استرهايشان بوده که این امر باعث بی اثر شدن این نوع بره‌موم علیه میکروبها شده است (۷). این تفاوت در بره‌موم کشورها، ما را بر آن داشت که بر روی اثرات ضد میکروبی بره‌موم ایران پردازیم.

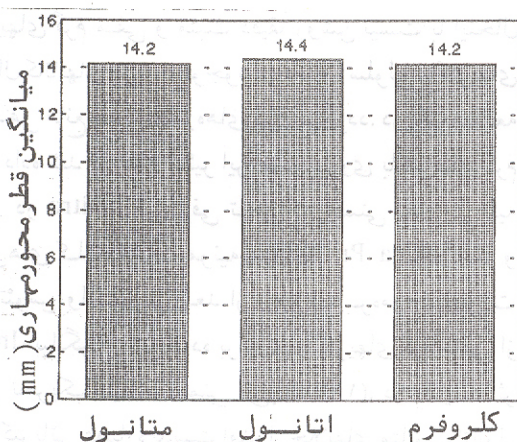
روش کار

به منظور ارزیابی اثرات ضدباکتریایی بره‌موم اقدام به جمع‌آوری این ماده از کندوهای شهرستان بروجرد نمودیم. برای عصاره‌گیری این ماده از روش هضم (Digestion) با حلالهای آناتول ۷۰٪، متانول و کلروفرم استفاده شد (۲). عصاره بدست آمده از سه حلال را تعیین چگالی (درصد وزنی حجمی) نمودیم (۹). برای آنتی‌بیوگرام از دیسکهای بلانک شرکت پادتن طب استفاده گردید. از هر کدام از عصاره‌های بدست آمده از سه حلال اتانولی، متانولی و کلروفرمی در رقت‌های ۳۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵ درصد حجمی وزنی (در آزمایشات اولیه pilot study افزایش غلظت مشخص گردید که این ماده از غلظت ۱/۲۵٪ به بالا روی باکتریها تاثیر دارد)، ۱۰ میکرولیتر برداشت شده و به دیسک‌های بلانک استریل شده تزریق گردید. بدین ترتیب دیسکهای حاوی ۳، ۲، ۵/۵، ۲۵/۵، ۱۲۵/۵ میلی گرم بره‌موم تهیه شد. از حلال‌های اتانول، متانول و کلروفرم هر کدام بطور خالص بعنوان شاهد بمقدار ۱۰ میکرولیتر در دیسکهای بلانک استریل تزریق گردید. دیسکهای مورد آزمایش و شاهد را به منظور تبخیر حلال، بمدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه قرار دادیم. برای بررسی سنجش حساسیت باکتریهای: استاف آرئوس سوش

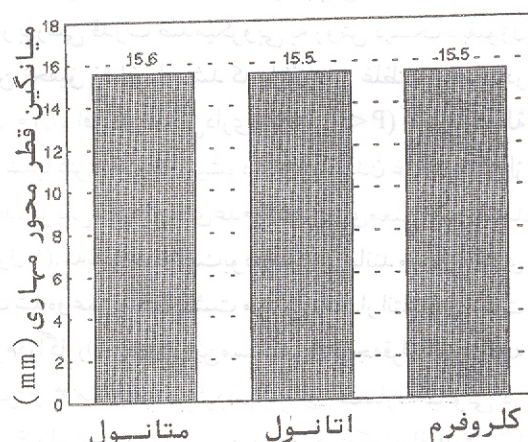
جدول ۱ قطر هاله عدم رشد ($\bar{X}$ میلیمتر) باکتری، تحت تأثیر عصاره‌های متانولی، اتانولی و کلروفرمی

$\bar{X}$ mg	$\bar{X}$ mg	$\bar{X}$ mg	$\bar{X}$ mg	$\bar{X}$ mg	$\bar{X}$ mg	میلی گرم ماده در دیسک ←	
						عصاره ↓	↓ باکتری
۱۴/۷۲mm	۱۴/۴۴mm	۱۴/۴۶mm	۱۲/۶mm	۱۱/۲۴mm	۹/۳۹mm	اتانولی	استرپتوکوک پیوژنز
۱۴/۶۶mm	۱۴/۵۴mm	۱۴/۲mm	۱۲/۷۶mm	۱۱/۳۶mm	۹/۳mm	متانولی	
۱۴/۶۴mm	۱۴/۶mm	۱۴/۲۴mm	۱۲/۷mm	۱۱/۲۲mm	۹/۴۴mm	کلروفرمی	
۱۵/۵۸mm	۱۵/۵۶mm	۱۵/۵mm	۱۴/۲mm	۱۲/۵۶mm	۱۱/۱mm	اتانولی	استافیلوکوک ارئوس
۱۵/۸۶mm	۱۵/۷۸mm	۱۵/۶۴mm	۱۴/۱mm	۱۲/۴mm	۱۱/۲mm	متانولی	
۱۵/۸۶mm	۱۵/۷mm	۱۵/۵۶mm	۱۴/۲۶mm	۱۲/۷۲mm	۱۱/۰۸mm	کلروفرمی	
---	---	---	---	---	---	اتانولی	اشیرشیا کلی، پسودوموناس اثر و جینوزا،
---	---	---	---	---	---	متانولی	
---	---	---	---	---	---	کلروفرمی	سالمونلا تیفی، پروتئوس

- = عدم تأثیر ماده بر باکتری



نمودار شماره ۲: میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره‌های متانولی، اتانولی و کلروفرمی بره موم با غلظت ۱۰٪ بر روی سوش استرپتوکوک پیوژنز ($\bar{X} \pm SE$)

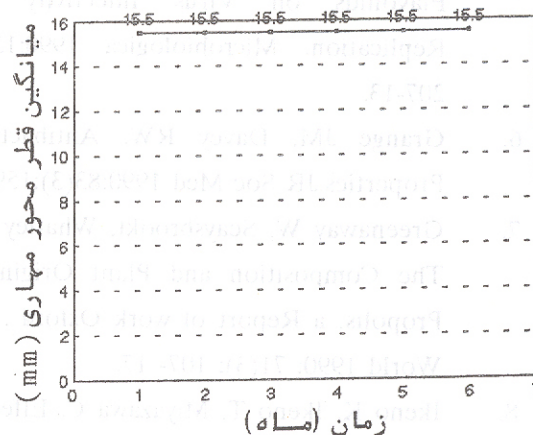


نمودار شماره ۱: میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره‌های متانولی، اتانولی و کلروفرمی بره موم با غلظت ۱۰٪ بر روی سوش استاندارد استافیلوکوک اورئوس ($\bar{X} \pm SE$) ATCC 25923

بحث

عصاره بره موم حاصل از ۳ حلال، پس از اندازه‌گیری چگالی و توزیع در دیسکهای بلانک همراه با شاهد بر روی باکتریهای استاف ارئوس سوش ATCC 25923، استرپتوکوک پیوژنز، اشیرشیا کلی، سالمونلاتیفی، پسودوموناس اثر و جینوزا و پروتئوس و لگاریس مورد مطالعه قرار گرفت و در جداول مربوطه ثبت گردید.

چنانچه در جدول ۱ ملاحظه می‌گردد، عصاره‌های اتانولی (۷۰٪)، متانولی و کلروفرمی بره موم بر روی باکتریهای گرم مثبت استافیلوکوک ارئوس و استرپتوکوک پیوژنز مؤثر می‌باشد. این تأثیر حتی در غلظت‌های پائین نیز اعمال می‌گردد. چنانچه در این جدول نشان داده شده، باکتریهای گرم منفی سالمونلاتیفی، اشیرشیا کلی،



نمودار شماره ۳: تعیین طول مدت پایداری عصاره اتانولی بره موم با بررسی قطر هاله عدم رشد حاصل از غلظت ۱۰٪ بر روی استافیلوکوک ATCC 25923

فوق الذکر نشان داده شد که دیسکهای شاهد فاقد هرگونه اثر بر روی باکتریها و دارای اختلاف معنی داری ($P < 0/005$) با اثر ضد باکتریائی دیسکهای تهیه شده از عصاره های بدست آمده از حلالهای سه گانه است. این آزمایش نشان داد که اثر ضد باکتریائی مربوط به مواد موثر موجود در برهموم است و دیسکهای تهیه شده از حلالهای مربوط به عصاره گیری بعد از نگهداری در گرماخانه ۳۷ درجه بمدت ۱ ساعت فاقد هرگونه اثری روی باکتریها میباشد. در مقایسه عصاره های بدست آمده از حلالهای متانولی، اتانولی ۷۰٪ و کلروفرمی بر روی باکتریهای مورد آزمایش، عدم تأثیر حلال در توان ضد باکتریائی برهموم مشخص گردید. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که اختلاف در توان ضد میکروبی این سه عصاره معنی دار نمی باشد (نمودار ۱ و ۲). در بررسی قدرت ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوژن در این تحقیق نشان داده شد که با افزایش غلظت ماده تا در میزان ۱۰٪، افزایش معنی داری ($P < 0/005$) در قطر هاله عدم رشد باکتری مشاهده میشود. و با زیاد شدن غلظت بیش از این حد، افزایش قطر هاله های عدم رشد باکتری معنی دار نمیشد (جدول ۱). که با توجه به ثابت بودن مواردی مانند مقدار باکتری کشت شده و عمق محیط کشت می توان مقدار انتشار حلالیت برهموم در آگار را در پیدایش این مسئله مورد توجه قرار داد. چنانچه در نمودار ۳ ملاحظه می گردد پایداری عصاره اتانولی در مدت ۶ ماه ثابت بوده در این مدت هیچگونه افزایش یا کاهش قدرت ضد باکتریائی در عصاره اتانولی بوجود نیامد.

پستودوموناس اترجینوزا و پروتئوس ولگاریس نسبت به عصاره های مختلف به این ماده مقاوم میباشند این بررسی نشان میدهد که برهموم بر روی باکتریهای گرم مثبت استاف و استرپتوکوک مؤثر و بر روی باکتریهای گرم منفی مورد آزمایش فاقد تأثیر می باشد. در تحقیقی که در سال ۱۹۸۲ انجام شد اثر برهموم را بر روی باسیلوس سوبتیلیس *Bacillus subtilis* نشان داد (۱۲) و در مطالعه ای دیگر که توسط مثبت Grange انجام گرفت نشان داده شد که باسیلهای گرم به این ماده حساسیت خوبی نشان میدهند (۶). در سال ۱۹۹۱ Ikeno و همکارانش اثر این ماده را روی استرپتوکوک سوربینوس *Streptococcus subinus* و استرپتوکوک موتانس *Streptococcus Mutans* نشان دادند (۸). دلیل اصلی و یا مکانیسم اختلاف تأثیر بر باکتریهای گرم منفی و مثبت دقیقاً روشن نیست با اینحال احتمال کانالهای پورین موجود در دیواره سلولی باکتریهای گرم منفی مانع نفوذ عصاره های فوق میگردد. در یک مطالعه نشان داده شد که عدم تأثیر این ماده بر روی باکتریهای گرم منفی در *invitro*، از طرفی تحریک ایمنی بدن بر علیه سوش های کلبسیلا پنومونیه *Klebsiella Pneumonia* و پروتئوس ولگاریس بعد از مصرف برهموم بصورت *Invivo*، بیانگر اثر این ماده بر روی باکتریهای گرم منفی از طریق تحریک سیستم ایمنی می باشد (۱۱). در مقایسه اثر ضد باکتریائی عصاره بدست آمده از حلالهای متانول، اتانول و کلروفرم با دیسکهای شاهد تهیه شده از حلالهای

منابع:

۱. رئیسی، احمد: آنتی بیوتیکهای طبیعی و نیمه ساختگی. اصفهان: دانشگاه اصفهان، ۱۳۶۲، صص: ۵-۱.
۲. صمصام شریعت، هادی: عصاره گیری و استخراج مواد مؤثره گیاهان دارویی و روشهای شناسایی و ارزشیابی آنها. تهران: انتشارات مانی، ۱۳۷۱، صص: ۲۰-۱۰.
۳. شهرستانی، نعمت اله: زنبور عسل و پرورش آن. تهران: دانشگاه تهران، ۱۳۵۸، صص: ۶۶-۱۴۴.
4. Collee JG, et al. Practical Medical Microbiology. 13th ed. New York: Churchill Livingstone, 1989: 163- 69, 304- 6, 317- 18, 432, 436, 422-30.
5. Debiaygi M, Tatco F. Effect of Propolis
6. Grange JM, Davey RW. Antibacterial Properties. JR Soc Med 1990;83(3):159-60.
7. Greenaway W, Scaysbrook, Whatley FR. The Composition and Plant Origins of Propolis: a Report of work Oxford . Bee World 1990: 71(3): 107- 17.
8. Ikeno K, Ikeno T, Miyazawa C. Effect of Propolis on Dentar Caries in Rats. Caries Res 1991: 25(5): 347- 51.
9. Jenkins. Quantitative Pharmaceutical 12.
10. Flavonids on Virus Infectivity and Replication. Microbiologica 1990;13(3): 207-13.

Study of Antibacterial Effect of Honeybee propolis on the *S. aureus*, *Strep. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Sal. typhi* and *Proteus vulgaris*

Faraj Zadeh Sheikh, Fani Yeganeh.A

ABSTRACT

Propolis or bee glue is a production of hive with resin nature which had been known from ancient times and was used in treatment of infectious disease. At present time it is still widely used in the eastern parts of Europe. The use of propolis for its antibacterial, antiviral, antifungal and certain other useful pharmacologic effects is increasing. Because of difference between the sort of propolis from various countries, we decided to investigate the propolis of a specific part of Iran. To do this, the antibacterial effect of Borougerd city propolis was evaluated. In this study, ethanol (70%), methanol and chloroform extracted from propolis on the concentrations of 30, 20, 10, 5, 2.5 and 1.25% W/V were prepared by digestion method. Paper disk method was used for evaluation of the antibacterial effect of the extracts because of the advantages claimed for this method. To prepare the disk, ten microliter of the above mentioned concentrations were added to the blank disks, so after drying, the disks contained 3, 2, 1, 0.25 and 0.125 miligram of each extract. The effect of the extracts were then investigated on the *S. aureus*, *Strep. pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sal. typhi* and *proteus vulgaris* cultured on muller- Hinton agar. The inhibition zones produced by the disks were assessed after 18 to 24 hours. According to the results obtained, it was concluded that only *S. aureus* and *Strep. pyogenes* are sensitive to the propolis extract and other strains of the bacteria are resistant to it. It was also shown that propolis extracts in the above mentioned concentrations have inhibitory effect on the growth of the sensitive bacteria. There was not any significant difference between ethanol, methanol or chloroform extracts, so it suggests that the extracting solvent does not have any influence on the antibacterial effect. For statistical evaluation, analysis of variance and tukey tests were used.

Keywords: Bacteria- Pathogenicity/ Propolis