Journal of Urban Management & Environmental Engineering

Journal homepage: https://jumee.kgut.ac.ir
Vol.2, No.3; 2024.pp: 16-27

Research paper

(Received July 4, 2024 Accepted Aug. 28, 2024)

Antibacterial effect of in bulk and nano Propolis on *Melissococcus plutonium* bacteria (the European foulbrood in honeybee)

Elham Rezvannejad[1*], Maryam Fayazi[2]

[1]*Associate Professor, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran*
[2]*Associate Professor, Department of Environment, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran*

Abstract

The European foulbrood disease is one of the common diseases in honey bee breeding all over the world. The main of the bacteria causing this disease is called *Melissococcus pluton.* The common antibiotics are used to control this disease. Their use in apiaries, and entry into the human body increases the possibility of antibiotic resistance. Therefore, in this research, the antibacterial effects of bee propolis and sepiolite/propolis/silver nanocomposite on *Melissococcus pluton* bacteria were studied. To carry out this research, first, the required propolis was collected from a number of apiaries in different regions of Kerman province and extracted from them in the laboratory. Then *Melissococcus plutonium* bacterium was cultured in a special environment and was affected by different dilutions of the extracts. Finally, the MIC and MBC of the samples were determined by disk diffusion and well plate tests. The obtained data were analyzed by SAS software. The results of this research showed that although the alcoholic extracts of propolis and sepiolite/propolis/silver nanocomposite had less antibacterial properties compared to the standard antibiotics used in beekeeping ($P<0.01$). But they have had a significant effect on the inhibition and lethality of *Melissococcus plutonium* bacteria. So that propolis and sepiolite/propolis/silver nanocomposite at concentrations of 80 and 90 mg/ml respectively had inhibitory properties and at 200 mg/ml concentration had the ability to kill the desired bacteria. The results showed that honey bee propolis and the nanocomposite obtained from it have antibacterial effect on the agent of European foulbrood diseases in honeybee.

Keywords: Gram-positive bacteria, European foulbrood disease, honey bee, *Melissococcus plutonium*, Propolis

*Corresponding Author: Elham Rezvannejad
Email: E.Rezvannejd@kgut.ac.ir
Phone: 09133438919

DOI: 10.48306/jumee.2024.466135.1050

نشریه علمی مدیریت شهری و مهندسی محیط زیست

آدرس نشریه:https://jumee.kgut.ac.ir

سال دوم/شماره سوم/پاییز ۱۴۰۳/صفحه ۱۶-۲۷

مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت:۱۴۰۳/۴/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۶/۷ تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۷/۱

بررسی ضدباکتریایی بره‌موم بالک و نانو بر باکتری ملیسوکوکوس پلوتونیوس (بیماری لوک اروپایی زنبور عسل)

الهام رضوان‌نژاد*[۱]،مریم فیاضی[۲]

[۱]دانشیار گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

[۲]دانشیار گروه محیط زیست، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

چکیده

بیماری لوک اروپایی یکی از بیماریهای رایج در کل دنیا در پرورش زنبورعسل می باشد. اصلی ترین باکتری مولد این بیماری *Melissococcus pluton* نام دارد. جهت کنترل این بیماری از آنتی بیوتیک های رایج استفاده می گردد که مصرف آنها در زنبورستان ها و ورود آنها به بدن انسانها امکان افزایش مقاوت های آنتی بیوتیکی را در پی دارد. در این تحقیق اثرات ضد باکتریایی بره موم زنبورعسل و نانو کامپوزیت سپیولیت/ بره موم/ نقره روی باکتری *M. pluton* مورد مطالعه قرار گرفت. ابتدا از مناطق مختلف استان کرمان بره موم موردنیاز جمع آوری و در آزمایشگاه از آنها عصاره گیری بعمل آمد. سپس باکتری ملیسوکوکوس پلوتونیوس در محیط اختصاصی کشت داده شد و تحت تاثیر رقتهای مختلف عصاره ها قرار گرفت. در نهایت MIC و MBC نمونه ها توسط تست دیسک دیفوژن و چاهک پلیت تعیین گردید. اطلاعات توسط نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که اگرچه عصاره های الکلی بره موم و نانو کامپوزیت آن در مقایسه با آنتی بیوتیک دارای خاصیت آنتی باکتریال کمتری بودند ($P<۰/۰۱$). اما تاثیر معنی داری بر میزان مهار و کشندگی باکتری ملیسوکوکوس پلوتونیوس داشته اند. به طوری که بره‌موم و نانو کامپوزیت سپیولیت/ بره موم/ نقره در غلظت های ۸۰ و ۹۰ mg/ml به ترتیب دارای خاصیت مهار و در غلظت۲۰۰ mg/ml دارای توانایی کشندگی باکتری مورد نظر بودند. نتایج نشان داد که بره‌موم زنبورعسل و نانوکامپوزیت حاصل از آن واجد اثر ضد باکتریایی بر عامل بیماری لوک اروپایی زنبورعسل می باشد.

کلمات کلیدی: باکتری گرم مثبت، بیماری لوک اروپایی، زنبورعسل، ملیسوکوکوس پلوتونیوس، بره موم

* نویسنده مسئول: الهام رضوان‌نژاد

ایمیل: E.Rezvannejd@kgut.ac.ir

تلفن:۰۹۱۳۳۴۳۸۹۱۹

DOI: 10.48306/jumee.2024.466135.1050

۱-مقدمه

از جمله بیماری هایی که صنعت زنبورداری را تهدید می کند بیماری لوک اروپایی[1]است. این بیماری مخصوص شفیره ها می باشد که باعث ایجاد خسارت به صنعت زنبورداری در سراسر جهان می گردد. این بیماری یک بیماری عفونی و مسری باکتریایی لارو زنبور عسل است[1]. عمدتاً لاروهای بدون مهر و موم را تحت تأثیر قرار می دهد و آنها را در سن ۴ تا ۵ روزگی از بین می برد. لاروهای مرده مایل به زرد، سپس قهوه ای، تجزیه شده و آبکی می شوند [1]. بقایای لارو اغلب به دلیل مهاجمان ثانویه مانند *Enterococcus faecalis* و *Paenibacillus alvei* بوی بد یا ترش می دهد. این بیماری توسط باکتریهای گوناگون ایجاد میشود، مشهورترین عوامل عبارتند از [1] :

باکتری ملیسوکوکوس پلوتونیوس (*Melissococcus pluton*)یا استرپتوکوکوس پلوتون (*Streptococcus pluton*)

باکتری باسیلوس آل ویی (*Bacillus alvei*)

باکتری آکروموباکتر اوریدیس (*Achromobacter Eurydice*)

باکتری استرپتوکوکوس فکالیس *Strptococcus faecalis*

و باکتری باسیلوس لاتروسپروس (*Bacillus laterosporus*)

باکتری ملیســـو کوکوس پلوتونیوس (*Melissococcus pluton*)یا اســـترپتوکوکوس پلوتون (*Streptococcus pluton*)

این باکتری مهمترین عامل ایجاد کننده بیماری هست، که یک میکرو ارگانیسم گرم مثبت به شکل کوکسی یا دانه‌های تسبیح، چند شکلی، معمولاً بصورت کم و بیش گرد به قطر یک میکرون دیده می شوند. این باکتری گاهی بصورت تک تک و گاهی بصورت رشته یا دانه های تسبیح، ولی اغلب بصورت توده مشاهده میشود. این باکتری هاگدار یا اسپوردار نیست، لذا مقاومت اون خیلی محدود می باشد، این باکتری میتواند یک سال در شرایط خشکی و بیست و پنج روز در شرایط معمولی زندگی کند [۱] .

در حال حاضر آنتی بیوتیک های متعددی بر علیه بیماری لوک اروپایی زنبورعسل استفاده می شود ولی با توجه به عدم تاثیر آنها روی اســـپور باکتری مذکور، درمان قطعی بیماری صـــورت نمی گیرد. از طرف دیگر چون باقیمانده مواد دارویی در فراورده های زنبورعسل خطراتی برای مصرف کنندگان فراورده های زنبورعسل ایجاد می کند، لذا بایستی در پی یافتن راه‌ها و مواد دارویی موثر و کم خطر برای سلامتی انسان و زنبورعسل بود.

برخی از محصولات کندو دارای خواص آنی باکتریال می باشند که از جمله آنها می توان به موارد زیر اشاره نمود:

محصول اصلی زنبور، عسل است. عسل را زنبور عسل از شهد گیاهان مختلف با غلیظ کردنشان درست می کند. مقدار آب شهد گل ها معمولاً 25 تا 80 درصد است. شامل قندهای مختلف، مواد معدنی همچون منیزیم، پتاسیم، کلسیم، کلرید سدیم، گوگرد، آهن و فسفات همچنین ویتامین های C ، B5 ، B3، B1، B2، B6 و عناصری مثل مس، ید و روی می باشد که بنا به نوع عسل میزان آن ها متفاوت است[۲].

بره موم ماده ای شبیه موم و از تولیدات زنبور عسل می باشد ، حالت آن خمیری شکل و چسبناک با بوی مطبوع که رنگ آن از سبزتا قهوه ای تیره متغیر است. رنگ و عطر بره موم در مناطق مختلف متفاوت بوده و در هوای سرد، ترد و شکننده و در هوای گرم، نرم و چسبناک می گردد و در کندو جهت جلوگیری از نفوذ سرما و پوشش شکاف ها و چسباندن کادرهای داخل کندو استفاده می شود. زنبورها از بره موم برای درزگیری و ضدعفونی داخل کندو استفاده می کنند. بره موم تنها آنتی بیوتیک خیلی قوی طبیعی می باشد که توسط زنبور عسل از صمغ بعضی گیاهان، شهد و گرده گل درست می شود و دارای ویتامین های , B3 B1 , A , B2 و ویتامین K می باشد . بره موم خواصی شامل اثر ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد انگلی، آنتی اکسیدانی، ضد التهابی دارد [۳]..

از گذشته های دور مردم سرزمین یونان، روم، چین، مصر و ایران عسل و بره موم را به عنوان یک میکرب کش شناخته بودند و از آن استفاده می‌کردند. مطالعات زیادی در رابطه با اثرات ضدقارچی و ضد باکتری محصولات زنبورعسل تا کنون انجام شده است و اثرات آنها تایید شده است[۴].

---

[1] Europian foulbrood

همچنین دانشمندان علم فیزیک بر این باورند که بسیاری از خواص فیزیکی ماده ارتباط تنگاتنگی با آرایش اتم‌ها و ساختار اتمی ترکیب شیمیایی و اندازه یک ماده جامد در یک، دو و یا سه بعد دارد. بدیهی است با پذیرش چنین اصلی انتظار تغییر خواص فیزیکی یک ماده جامد را در اثر تغییر یافتن یکی از پارامترهای فوق، باید داشته باشیم. در ارتباط با نانو مواد گزارش‌های متعددی در خصوص تغییرات خواص فیزیکی یک جامد در اثر کاهش اندازه ذرات یا بلورها ارائه گردیده است[۵].

سپیولایت از جمله کانی‌های خاک‌های مناطق خشک و نیمه خشک جهان به شمار می‌رود. این کانی با توجه به ویژگی‌های منحصر به فردی دارد از جمله فراوانی و در دسترس بودن، ارزانی، تخلخل بالا، سطح ویژه زیاد و همچنین قدرت جذب بالای آن بعنوان یک ترکیب پایه مناسب برای ساخت ترکیبات نانو کامپوزیت مورداستفاده قرار می گیرد [۶]. همچنین بسیاری از فلزات از جمله نقره، مس، تیتانیوم، منیزیوم، روی، طلا، نقره و آلژینات از گذشته های دور بعنوان مواد ضد میکروبی مطرح بوده اند و امروزه نانوذرات آنها به علت سطح بزرگتر نسبت به حجمشان پتانسیل ضد باکتریایی قویی تری نیز دارد. از میان همه اینها ثابت شده است که نانوذرات نقره مؤثرترین عامل ضد میکروبی برعلیه باکتری ها، ویروس ها و سایر میکروارگانیسم های یوکاریوتی هستند [۷].

مطالعات زیادی در مورد تاثیر بره موم به صورت خام و در ترکیبات نانو بر روی بسیاری از باکتری های بیماری زای انسانی انجام شده است که از جمله در مورد باکتری *E. faecalis* و*S. epidermidis* تاثیر نانوذره بره موم چیتوسان تاثیر معنی داری برکاهش رشد و ممانعت از آن به عمل می آورد. همچنین نانودره بره موم از غلظت ۰/۰۲ تا ۱۰ ٪ تاثیر معنی داری بر ممانعت از رشد باکتری *E. coli* داشتند[۸].

لذا در تحقیق حاضر بررسی خواص ضدباکتریایی بره موم به عنوان یک ماده طبیعی و ایمن به صورت خام و همچنین به صورت نانوکامپوزیت در ترکیب با سپیولیت و نیترات نقره، بر علیه باکتری ملیسو کوکوس پلوتونیوس مولد بیماری لوک اروپایی در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.

۲-مواد و روشها

عصاره های مورد استفاده در تحقیق شامل بره موم خام، بره موم در ترکیب نانوکامپوزیت با سپیولیت و نیترات نقره و آنتی بیوتیک دی هیدرو استرپتومایسین می باشند که نحوه تهیه این عصاره ها در زیر بیان می شود.

۲-۱- تهیه عصاره بره موم

نمونه بره موم تهیه شده از استان کرمان، بعنوان مواد آنتی باکتریال طبیعی، در آزمایشگاه دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی کرمان، به قطعات ریزتری تبدیل شدند و سپس ۲۵ گرم از بره موم با ۲۵۰ میلی لیتر محلول اتانول ۸۰ درصد مخلوط و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق با دستگاه چرخاننده (۱۵۰ دور در دقیقه) تکان داده شد. سپس عصاره الکلی حاصل توسط کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شده و به کمک دستگاه روتاری الکل آن تبخیر و عصاره الکلی خالص به دست آمد [۹]. برای خشک شدن کامل، عصاره بره‌موم حاصله به مدت ۴۸ ساعت در دمای $40^{\circ}C$ قرار داده شد و سپس جهت تهیه غلظت‌های مورد نیاز وزن کشی شده و در داخل میزان مشخصی از اتانول حل شد تا رقت های مورد نظر بدست آید.

۲-۲- ساخت نانوکامپوزیت سپیولایت/ بره موم/ نیترات نقره

۲-۲-۱- آماده‌سازی سپیولایت

اصلاح و آماده‌سازی سپیولایت در دو مرحله صورت گرفت. برای این منظور، ابتدا یک سوسپانسیون حاوی ۱۰ گرم بر لیتر از سپیولایت تهیه و سپس به مدت ۲۴ ساعت تحت هم‌زدن قرار گرفت. بعد از گذشت ۲ دقیقه که محلول در حال سکون باقی ماند، محلول بالایی سوسپانسیون به وسیله کاغذ صافی جداسازی گردید. در پایان به منظور خشک کردن، نمونه سپیولایت خالص شده در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس برای ۲۴ ساعت قرار گرفت[۱۰].

سپس، مقدار ۱۰ گرم از سپیولایت مرحله قبل در ۱۰۰ میلی لیتر از اسید نیتریک ۱ مولار در دمای بین ۷۰ تا ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. سپس به منظور رسیدن به pH خنثی، عملیات شستشو دادن با آب،

جداسازی با سانتریفیوژ و پخش مجدد با اولتراسونیک به طور متناوب انجام شد. در نهایت رسوب در دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شد.

۲-۲-۲- آماده سازی نانوکامپوزیت سپیولایت/ بره موم/ نیترات نقره

جهت تهیه، ابتدا مخلوط بره موم و سپیولایت با نسبت ۱ به ۱ در آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با سرعت ۳۶۰ دور بر دقیقه هم خورد. سپس ماده جامد چندین دفعه با کمک سانتریفوژ جدا و با آب مقطر شستشو داده شد و در نهایت در دمای اتاق، تحت شرایط خلاء به خوبی خشک شد. به ماده حاصل نیترات نقره حل شده در آب مقطر، اضافه شد (نسبت ۱ به ۲) مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه هم خورد. سپس آسکوربیک اسید در آب حل و آرام آرام به مخلوط بالا اضافه گردید. مخلوط به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق هم خورد و در نهایت رسوب حاصل چندین دفعه با آب مقطر شستشو داده شد و در آون خشک گردید.

۲-۳- تهیه غلظت مناسب از باکتری مورد استفاده

سویه باکتری *M. pluton* تهیه شده از انستیتو موسسه رازی در کرج در محیط کشت نوترینت براث جهت ساخت مایه باکتریایی به مدت ۴۸ ساعت در دمای ^{o}C ۳۷ در انکوباتور شیکر قرار داده شد. پس از رشد، باکتری در محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد. سپس با کمک لوپ استریل چند کلونی از محیط کشت باکتری مورد استفاده به محیط کشت مولر- هینتون مایع (Mueller-Hinton broth) اضافه گردید تا کدورت محیط با لوله استاندارد نیم مک فارلند یکسان شود. باکتری مورد استفاده در غلظت استاندارد (۱*۱۰^{۶} CTU/ml) نیم مک فارلند آماده و در مرحله بعد ۵۰۰ میکرولیتر از مایه باکتریایی استاندارد حاصله با استفاده از لوپ استریل بر روی محیط کشت جامد مولر- هینتون آگار کشت داده شدند.

۲-۴- انتشار دیسک (Disk diffusion)

بعد از تهیه رقت های مختلف از عصاره های مورد نظر، کاغذ واتمن شماره دو را به وسیله دستگاه پانچ به اندازه دیسک های آنتی بیوگرام استاندارد درآورده و اتوکلاو شدند.در مرحله بعد دیسک های تهیه شده به مدت ۲ ساعت درون غلظت های مختلف نمونه ها قرار گرفتند (غوطه ور شدند) سپس دیسک ها خارج شده و به مدت ۵ ساعت برای خشک شدن کامل در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ قرار گرفتند. برای تست کنترل منفی ۱ عدد دیسک با شرایط یکسان در حجم های مشابه اتانول (۱ml) قرار گرفت. سپس دیسک های خشک شده به مدت ۱۸ ساعت در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ روی محیط کشت قرار گرفتند. هاله تشکیل شده دور هر دیسک نمایانگر ناحیه عدم رشد باکتری بود که با واحد میلی متر (قطر هاله) اندازه گیری شد.

علاوه بر این یک دیسک نیز در آنتی بیوتیک مورد استفاده در زنبورستان‌ها، جهت مبارزه با بیماری لوک اروپایی، با غلظت مشخص تهیه شد و بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار قرار داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت قرار گرفت.

تمام مراحل آزمایش برای هر نمونه سه بار تکرار شد و قطر هریک از مناطق مهاری با کولیس دیجیتال اندازه گیری شد.

۲-۵- تعیین MBC (Minimally Bactericidal Concentration) و MIC (Minimally Inhibitory Concentration)

برای تعیین غلظت مهاری (MIC) عصاره ها بر *M. pluton* ، از محیط کشت مایع برای آماده سازی سوسپانسیون باکتری در کدورت نیم مک‌فارلند استفاده گردید. در این روش جهت تعیین نسبی حداقل غلظتی که باعث مهار رشد باکتریها (MIC) و حداقل غلظتی که باعث مرگ باکتریها (MBC) می‌گردد، از عصاره نانوکامپوزیت و عصاره تغلیظ شده الکلی سریال‌های رقتی در محیط مولر-هینتون براث تهیه گردید. سپس به هرکدام از رقتها به ازای هر میلی لیتر محیط مایع، ۱۰^{۵}× ۵ باکتری فعال اضافه گردید. در کنار لوله ها از کنترل مثبت (محیط کشت حاوی باکتری، بدون عصاره) و کنترل منفی(محیط کشت بدون باکتری) استفاده گردید. در نهایت لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه و سپس نتایج قرائت گردید.

برای هر کدام از رقتهای عصاره آبی و الکلی، آخرین رقتی که در آن هیچ‌گونه کدورتی مشاهده نگردید (عدم رشد) به عنوان MIC در نظر گرفته شد و از تمام لوله های بدون کدورت روی محیط مولر -هینتون براث آگار کشت داده شد. آخرین رقتی از عصاره ها که قادر به مرگ ۹۹/۹ درصد از باکتری های زنده اولیه بود به عنوان MBC عصاره ها در نظر گرفته شد.

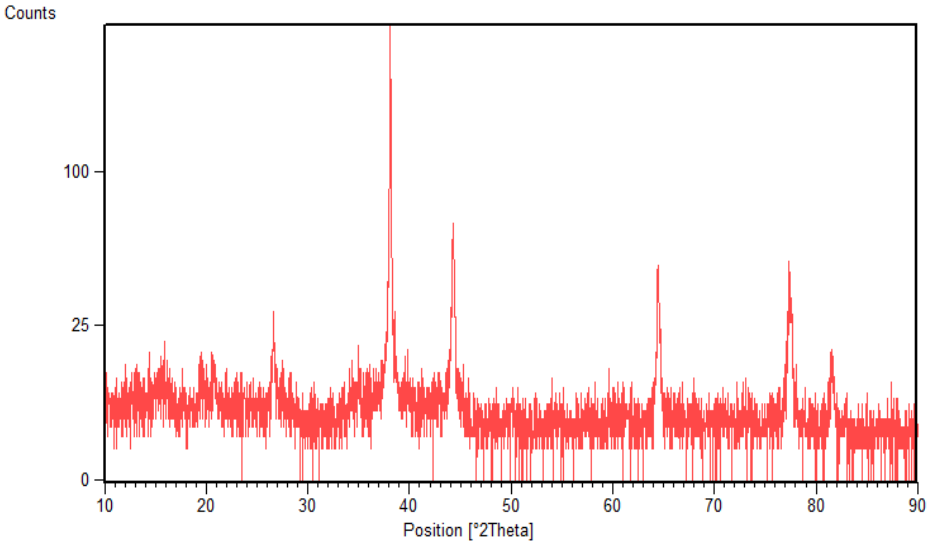
۲-۶- آنالیز آماری

برای اندازه‌گیری قطر ناحیه مهاری (Zone of inhibition)، داده ها با نرم‌افزار SAS نسخه ۹,۱ به روش ANOVA مورد آنالیز آماری قرار گرفت و مقایسه میانگین ها به روش توکی (Tukey) صورت پذیرفت.

۳-نتایج و بحث

۳-۱- مشخصات نانوکامپوزیت ساخته شده

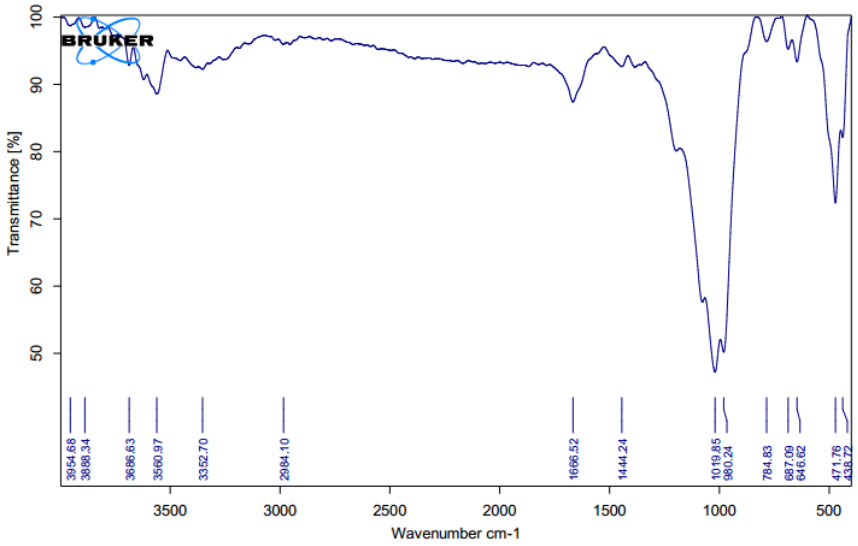
الگو XRD سپیولایت/ بره موم/ نقره در شکل ۱ نشان داده شده است ، الگوی پراش مربوط به صفحات (۱۳۰)، (۰۶۰)، (۱۳۱)، (۲۶۰)، (۲۴۱)، (۰۸۰)، (۳۳۱)، (۳۴۱)، (۴۴۱)، (۳۷۱)، (۲۰۲)، (۵۴۱) و (۷۹۱) که به ترتیب در زوایای 2θ= ۱۲/۰۳°، ۱۹/۹۶°، ۲۰/۸۳°، ۲۴/۰۳°، ۲۵/۴۳°، ۲۶/۸۲°، ۲۸/۱۹°، ۲۹/۵۶°، ۳۳/۵۱°، ۳۵/۲۳°، ۳۶/۸۵°، ۴۰/۰۸° و ۶۰/۱۰° مشاهده می‌شود، بر اساس مقایسه با الگوی استاندارد سپیولایت (JCPDS card No. 13-0595)، مطابق با ساختار سپیولایت با سلول‌های واحد ارتورومبیک می‌باشد. علاوه بر این، الگوهای موجود در زوایای (۲۰۲) ۴۴/۰۱°، (۱۲۲)° ۵۸/۲۲، (۳۰۰) ۶۲/۲۸° و (۱۲۸) ۷۲/۹۵° مربوط به صفحات شبکه کلسیت (JCPDS card No. 05-0586) می‌باشد [۱۱]. پیک‌های مربوط به نانو ذرات نقره در زوایای (۱۱۱) ۱۸/۳۸°، (۲۰۰) ۲۵/۴۴°، (۲۲۰) ۷۲/۶۴°، (۳۱۱) ۴۰/۷۷° و (۳۳۱) ۸۳/۴۵° قابل مشاهده هستند (JCPDS card No. 01-087-0719) که نشان‌دهنده سنتز موفقیت آمیز نانوکامپوزیت سپیولایت/ بره موم/ نقره می‌باشد. اما بره موم به دلیل ساختار بی شکل در الگو XRD پیک نشان نمی‌دهد و فقط منجر به کاهش شدت پیک‌های سپیولایت می‌شود.



شکل ۱- الگوی XRD سپیولایت/ بره موم/نقره

طیف FT-IR سپیولایت در شکل ۲ نشان داده شده‌اند. که باندهای جذبی مشاهده شده در ۳۵۶۰ cm^{-1}، ۳۴۲۸ cm^{-1} و ۱۶۵۵ در طیف FT-IR مربوط به گروه های هیدروکسی آب می‌باشد. پیک‌های مشخصه Si–O–Si را می‌توان در ۱۰۲۱ cm^{-1}، ۱۱۹۹ cm^{-1} و ۹۸۰ cm^{-1} مشاهده کرد. پیک جذبی در ۶۴۷ cm^{-1} نشان‌دهنده ارتعاشات خمشی پیوند Mg–OH می‌باشد [۱۲].

در نمونه سپیولایت/ بره موم/ نقره، حضور پیک های جذبی در نواحی ۱۴۳۸ cm^{-1} و ۲۹۷۹ cm^{-1} حاکی از پوشش موفقیت آمیز بره موم بر روی کانی سپیولایت است (شکل۲).



شکل ۲- طیف FT-IR نانوکامپوزیت سپیولایت/بره موم/ نقره

۳-۲- اثر باکتریایی فرم خام و نانوکامپوزیت بره موم

عصاره های الکلی بره موم و نانوکامپوزیت حاصل از آن میزان قابل توجهی از اثرات ضد میکروبی بر علیه عامل باکتریایی بر *M. pluton* داشته اند اما در مقایسه با آنتی بیوتیک استاندارد مورد استفاده در زنبورستان ها میزان اثرات آنتی باکتریالی آنها کمتر بود($P<۰/۰۱$) (جدول شماره ۱).

همانطور که در جدول شماره ۲ مشخص شده است قطر هاله ممانعت از رشد باکتری با میزان بره موم و نانوکامپوزیت سپیولیت/ بره موم/ نقره موجود در دیسکها رابطه مستقیم داشته و با افزایش میزان آنها، قطر هاله ممانعت از رشد اطراف دیسک ها نیز افزایش یافته است. تغییرات اندازه هاله رشد بر اساس غلظت در عصاره های مختلف بره موم و نانوکامپوزیت آن برای باکتری ملیسوکوکوس پلوتونیوس در شکل ۳ به صورت شماتیک نشان داده شده است

در مورد عصاره های اتانولی برهموم غلظت ۹۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای حداقل قدرت مهارکنندگی (MIC) برروی باکتری ملیسوکوکوس پلوتونیوس می باشد. درحالی که این معیار برای نانوکامپوزیت برهموم غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می باشد. (جدول شماره ۳).

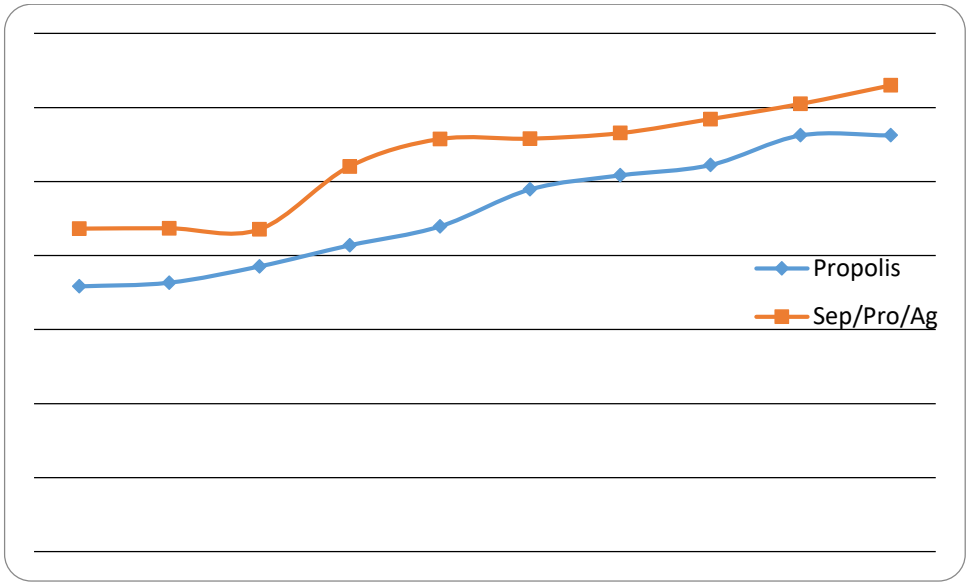
جدول۱- میانگین قطر هاله عدم رشد دیسک های حاوی عصاره های اتانولی بره موم و نانوکامپوزیت سپیولیت/ بره موم/ نقره بر باکتری ملیسوکوکوس پلوتونیوس (mm)

موادآنتی باکتریال باکتری	بره موم اتانولی	نانوکامپوزیت سپیولیت/ بره موم/ نقره	آب مقطر استریل	اتانول ۹۶٪	آنتی بیوتیک استاندارد
ملیسوکوکوس پلوتونیوس	۹/۳۷±۱/۳۰	۱۰/۶۵±۱/۱۷	*	*	۱۸/۰۱

*فاقد هاله عدم رشد

جدول۲- میزان هاله رشد در غلظت‌های مختلف عصاره های مختلف بره موم و نانوکامپوزیت سپیولیت/ بره موم/ نقره برای باکتری ملیسوکوکوس پلوتونیوس

ماده آنتی باکتریال رقت (mg/ml)	بره موم	نانوکامپوزیت سپیولیت/ بره موم/ نقره
۱۰	۷/۱۷	۸/۷۳
۲۰	۷/۲۷	۸/۷۴
۳۰	۷/۷۱	۸/۸۱
۴۰	۸/۲۸	۱۰/۴۱
۵۰	۸/۷۹	۱۱/۱۵
۶۰	۹/۷۹	۱۱/۱۶
۷۰	۱۰/۱۷	۱۱/۳۱
۸۰	۱۰/۴۵	۱۱/۶۹
۹۰	۱۱/۲۵	۱۲/۱۰
۱۰۰	۱۱/۲۵	۱۲/۶۰



شکل۳- تغییرات اندازه هاله رشد بر اساس غلظت در عصاره های مختلف بره موم و نانوکامپوزیت سپیولیت/ بره موم/ نقره برای باکتری ملیسوکوکوس پلوتونیوس

جدول ۲- نتایج حداقل ممانعت کننده رشد (MIC) حداقل غلظتی که باعث مرگ باکتری(MBC) عصاره های مختلف بره موم و نانوکامپوزیت بره موم بر باکتری ملیسوکوکوس پلوتونیوس

	MIC		MBC	
رقت (mg/ml)	بره موم	نانوکامپوزیت سپیولیت/بره موم/نقره	بره موم	نانوکامپوزیت سپیولیت/بره موم/نقره
۱۰	رشد باکتری	رشد باکتری	-	-
۲۰	رشد باکتری	رشد باکتری	-	-
۳۰	رشد باکتری	رشد باکتری	-	-
۴۰	رشد باکتری	رشد باکتری	-	-
۵۰	رشد باکتری	رشد باکتری	-	-
۶۰	رشد باکتری	رشد باکتری	-	-
۷۰	رشد باکتری	رشد باکتری	-	-
۸۰	رشد باکتری	عدم رشد باکتری	-	-
۹۰	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری	-	-
۱۰۰	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری	-	-
۲۰۰	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری	عدم زنده مانی باکتری	عدم زنده مانی باکتری

بررسی های مختلف نشان داده‌اند که بره‌موم روی باکتری های گرم مثبت خیلی موثرتر از باکتری‌های گرم منفی است. این تفاوت تاثیر را ناشی از تفاوت ساختمان دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت و منفی می‌دانند [۱۳] . از سوی دیگر منبع گیاهی و فصل تولید بره موم و نوع حلال استفاده شده هم روی اثرات ضد باکتریایی بره‌موم تاثیر چشم‌گیری دارند چرا که حلال‌های آلی ترکیبات بیشتری از بره‌موم را آزاد کرده و با این حلال‌ها اثرات ضدباکتریایی زیادی به دست می‌آید [۱۴].

در تحقیق حاضر مشخص گردید که دیسک های کاغذ صافی حاوی ۰/۰۱ تا ۰/۱ میلی گرم بره موم اتانولی و نانوکامپوزیت آن با ایجاد هاله ای به قطر ۷/۱۷ تا ۱۲/۶۰ میلی متر مانع رشد باکتری ملیسوکوکوس پلوتونیوس در اطراف خود شدند. اشترمارگاردیا و همکارانش [۱۵] نشان دادند که بره موم مناطق مختلف برزیل با توجه به فصول مختلف سال در غلظت های ۱/۷ تا ۰/۱۲ میلی گرم در دیسک بر باکتری باسیلوس لاروا مولد بیماری لوک آمریکایی موثر بوده‌اند و علت اصلی این وسعت دامنه‌ی تاثیر را منبع تهیه بره‌موم دانسته‌اند.

هقازی و عبدالهادی و همکاران[۱۶] در مطالعه ای در سال ۲۰۰۱ اثر آنتی میکروبیال بره موم و عسل بر روی باکتری اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس را بررسی کردند .نتایج با روش گرادیانت پلیت و قطر هاله وMBC وMIC بررسی شد. ترکیب نتایج از تمام روش ها نشان داد که هر دو بره موم و عسل فعالیت ضد باکتری علیه استافیلوکوکوس اورئوس دارد. همچنین در تحقیقی که توسط خسروی و همکاران [۱۷] انجام شد، نیز نشان داد که استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با کتری گرم منفی اشریشیا کلی برای باکتری MBC و MIC حساسیت بیشتری دارد.

همچنین پارک و همکاران[۱۰] اثر عصاره آبی بره موم را بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا و باسیلوس سرئوس بررسی کردند و نتایج این تحقیق نشان داد، عصاره آبی تاثیر یکسان بر این دو باکتری دارد.

در این بررسی نشان داده شد که غلظت ۰/۳۲ میلی گرم در میلی لیتر بره‌موم باعث مهار کامل رشد باکتری ملیسوکوکوس پلوتونیوس می گردد و این غلظت به عنوان حداقل غلظت مهارکننده رشد باکتری توسط بره‌موم در نظر گرفته شد. سایر محققین در کشورهای مختلف هم نتایج مشابهی روی باکتری های مختلف بدست آورده‌اند بطوری‌که ولازکوز و همکارانش [۱۸] MIC عصاره

اتانولی بره‌موم روی باکتری *Sta. aureus* را در حدود ۰/۱۰میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آورده اند. در یک بررسی استفانویک و همکارانش [۱۹] با استفاده از روش آگار دیفیوژن نشان داده‌اند که عصاره اتانولی بره‌موم در غلظت ۰/۰۷۸ درصد (MIC) و بالاتر باعث مهار رشد ۳۹ باکتری گرم مثبت مختلف شده است ولی غلظت آن جهت مهار رشد باکتری‌های گرم منفی بیشتر از این میزان بوده است.

۳-۳- مقایسه اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های مختلف مورد استفاده

در تحقیق حاضر مقایسه بین اثرات ضد باکتریایی عصاره های اتانولی بره‌موم، نانوکامپوزیت سپیولیت/ بره موم/ نقره و آنتی بیوتیک استاندارد مورد استفاده برای بیماری لوک اروپایی در زنبور عسل انجام شد. نتایج نشان داد که تفاوت بین تاثیر عصاره های مورد استفاده در مقایسه با آنتی بیوتیک رایج بر باکتری ملیسوکوکوس پلوتونیوس معنی دار می باشد ($P<۰/۰۱$). همچنین اختلاف بین عصاره های اتانولی بره‌موم و نانوکامپوزیت سپیولیت/ بره موم/ نقره معنی دار نبود هرچند که عصاره نانوکامپوزیت سپیولیت/ بره موم/ نقره تاثیر آنتی باکتریال بیشتری نسبت به نوع دیگر عصاره داشت ($P<۰/۰۱$). به هرحال هر دو نوع عصاره دارای تاثیر آنتی باکتریال قابل مشاهده ای بر باکتری مورد استفاده بودند.

همچنین در مطالعاتی که در گذشته انجام شده است نشان داده شده است که برای بیماری لوک آمریکایی آنتی بیوتیک تترا سایکلین دارای اثرات به مراتب قوی تری نسبت به بره موم روی باکتری *Bacillus larvae* می‌باشند. به طوری که آدریانا و همکارانش [۲۰] نشان دادند که آنتی بیوتیک تایلوزین دارای MIC ۰/۰۰۷۸ تا ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر روی ۶۷ سویه مختلف باکتری باسیلوس لاروا می باشد و این میزان در مقایسه با MIC بره موم روی این باکتری بسیار پایین است.

۴-نتیجه گیری

نتایج بررسی حاضر نشان داد که بره‌موم زنبورعسل در منطقه استان کرمان و نانوکامپوزیت سپیولیت/ بره موم/ نقره واجد اثر ضد باکتریایی بر روی باکتری ملیسوکوکوس پلوتونیوس عامل بیماری لوک اروپایی زنبورعسل می باشد. فرمولاسیون نانو بره موم مزایای متعددی نسبت به آماده سازی بره موم سنتی دارد، از جمله افزایش دسترسی زیستی، فعالیت ضد میکروبی و نفوذ بهتر بافت. این یافته ها پتانسیل نانو بره موم را به عنوان یک داروی خوراکی برای رسیدگی به شرایط مختلف سلامت نشان می دهد. با این حال، مهم است که اذعان کنیم که بره موم با عوارض جانبی متعددی از جمله درماتیت، زخم مخاط دهان، ادم حنجره و در موارد شدید، شوک آنافیلاکتیک در انسان نیز همراه بوده است. علاوه بر این، مکانیسم عمل بره موم، به ویژه در شکل نانو آن، به خوبی شناخته نشده است. بنابراین، تحقیقات بیشتری باید برای ارزیابی جامع ایمنی و کارایی نانو بره موم انجام شود. این جنبه‌ها باید در مطالعات آتی اولویت داشته باشند و توسعه و بهینه‌سازی فرمول‌های نانو بره موم را برای استفاده درمانی بالقوه هدایت کنند.

و در صورت انجام بررسی های بیشتر امکان استحصال ماده موثره اصلی از این فراورده ها امکان پذیر است. بعلاوه چالش‌های پیش روی توسعه نانو فرمول‌ها در مقیاس بزرگ برای تجاری‌سازی آن‌ها نیازمند پیشرفت‌هایی مانند سنتز نانوحامل، روش ارزیابی استاندارد در چارچوب بهبود فرآیند استراتژی شیوه‌های تولید خوب است. علاوه بر این، با توجه به تنوع آب و هوایی و پوشش گیاهی مناطق مختلف ایران، امکان استحصال بره موم با کیفیت مناسب وجود دارد و در نهایت می توان با استفاده از روشهای مدرن ساخت نانوذرات و فراوری بره‌موم، بازار مساعدی را برای صادرات این محصول در خارج از کشور فراهم نمود.

۵-منابع

1- Arai R, Tominaga K, Wu M, Okura M, Ito K, Okamura N, Onishi H, Osaki M, Sugimura Y, Yoshiyama M, Takamatsu D. Diversity of Melissococcus plutonius from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates. PLoS One. 2012;7(3):e33708. doi: 10.1371/journal.pone.0033708. Epub 2012 Mar 19. PMID: 22442715; PMCID: PMC3307753.

2- Kaiser, C., and M. Ernst. 2014. Beekeeping and Honey Production, Center for Crop Diversification Crop Profile, https://www.uky.edu/Ag/CCD/introsheets/honey.pdf
3- Huang, S., C. P. Zhang, K. Wang, G. Q. Li and F. L. Hu. 2014. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, *19*, 19610-19632
4- Ebad, F., and Azimi, A., 2017. A review on the biological function of royal jelly with an emphasis on its effects on health and longevity, National Conference on Bee Products from the Perspective of Biology, Health and Economy, Isfahan
5- Pileni M.P., 2007. Size and morphology control of nanoparticle growth in organized surfactant assemblies. Nanoparticles and nanostructured films: Wiley-VCH Verlag GmbH. 71-89.
6- Murray, H.H., 2006. Chapter 7 Palygorskite and Sepiolite Applications. In: Haydn HM, editor. Developments in Clay Science: Elsevier. p. 131-40.
7- Shahrestani, N. 2015. Honeybees and its culture: the complete revision and the latest achievements of beekeeping. Sepehr Publishers, Tehran. (In Farsi)
8- Kustiawan, P. M., Syaifie, P. H., Al Khairy Siregar, K. A., Ibadillah, D., & Mardliyati, E. 2024. New insights of propolis nanoformulation and its therapeutic potential in human diseases. *ADMET & DMPK*, *12*(1), 1–26. https://doi.org/10.5599/admet.2128
9- Brumfitt,W., J. M. Miller and I. Franklin. 1990. Antibiotic activity of natural products : 1.Propolis. *Microbios* 62(250): 19-22.
10- Park, Y. K., M. H. Koo, J. A. Abreu, M. Ikegaki, J. A. Cury and P. L. Rosalen. 1998. Antimicrobial activioty of propolis on oral microorganisms. *Current Microbiology* 36(1): 24 - 28.
11- Sheikhhosseini, A., Shirvani, M., and Shariatmadari, H., 2013. Competitive sorption of nickel, cadmium, zinc and copper on palygorskite and sepiolite silicate clay minerals. Geoderma. 192: 249-53.
12- Tabak, A., Eren, E., Afsin, B., and Caglar, B., 2009. Determination of adsorptive properties of a Turkish Sepiolite for removal of Reactive Blue 15 anionic dye from aqueous solutions. J Hazardous Material. 161(2–3): 1087-94.
13- Brumfitt,W., J. M. Miller and I. Franklin. 1990. Antibiotic activity of natural products : 1.Propolis. *Microbios* 62(250): 19-22.
14- Cheng, P. C. and G. Wong. 1996. Honeybee propolis : prospects in medicine. *Bee world* 77(1): 8-15
15- Esther Margarida A. F. B, M. Michael Simone, D. Daniela Macedo Jorge, A. E. Egea Soares and M. Spivak. 2008. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis. *Journal of Invertebrate Pathology* 97: 273–281
16- Hegazi, A. G. andf. K. Abd El Hady. 2001. Egyptian propolis: 1- antimicrobial activity and chemical composition of upper Egypt. In: Proceeding of 37th International Apicultural Congress. Durban, South Africa

17- Neshat Khosravi, N., S. Darvishi and K. Davari. 2016. obial activity of aqueous and alcoholic extracts of Kurdistan propolis on Staphylococcus aureus, Bacillus cereus and Pseudomonas aeruginosa**.** *Scientific Journal of Kurdestan University* 20(6): 97-106

18- Velazquez, C., M. Navarro, A. Acosta, A. Angulo, Z. Dominguez, R. Robles, R. Robles-Zepeda, E. Lug .2007. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiol*ogy 103(5): 1747-56.

19- Stepanović, S., N. Antić, I. Dakić and M. Svabić-Vlahović. 2003. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol Reseach*. 158(4): 353-7

20- Alippi, A. M., G. N. Albo, F. J. Reynaldi and M. R. De Giusti. 2005. *In vitro* and *in vivo* susceptibility of the honeybee bacterial pathogen Paenibacillus larvae subsp. larvae to the antibiotic tylosin. *Veterinary Microbiology* 109(1-2):47-55