



شماره ۸۳، تابستان ۱۳۸۸

نشریه دامپزشکی  
(پژوهش و سازندگی)

## بررسی اثر ضدباکتریائی بره موم زنبورعسل روی باکتری *Paenibacillus larvae* عامل بیماری لوک آمریکائی زنبورعسل

• مصطفی مرادی

موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج

تاریخ دریافت: فروردین ماه ۱۳۸۷ تاریخ پذیرش: مهرماه ۱۳۸۷

تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۶۶۵۶۱۵۴

Email: m.moradi@rvsri.ir

### چکیده

در این بررسی اثرات ضد باکتریائی بره موم زنبورعسل روی باکتری *Paenibacillus larvae* لاروا عامل بیماری لوک آمریکائی زنبورعسل مورد مطالعه قرار گرفته است. برای انجام این بررسی ابتدا از تعدادی از زنبورستان‌های مناطق مختلف استان آذربایجان غربی بره موم مورد نیاز را جمع آوری کرده و در آزمایشگاه با استفاده از الکل اتانول ۷۰ درصد از آنها عصاره‌گیری به عمل آمد و سپس باکتری *Paenibacillus larvae* را در محیط اختصاصی کشت داده و با استفاده از دو روش رقت در برات و آنتی بیوگرام تحت تأثیر رفتهای مختلف عصاره‌های الکلی بره موم قرار داده شد. در روش رقت در برات غلظت‌های ۳۲/ میلی گرم در میلی لیتر و بالاتر باعث مهار کامل رشد باکتری مذکور شده و در روش آنتی بیوگرام دیسک‌های کاغذ صافی حاوی ۰/۱ الی ۱/ میلی گرم در دیسک باعث ایجاد هاله‌ی ممانعت از رشد به قطر ۵ الی ۱۸ میلی‌متر گردیدند. به این ترتیب حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) باکتری *Paenibacillus larvae* توسط بره موم ۳۲/ میلی گرم در میلی لیتر در نظر گرفته شد که نشان دهنده‌ی اثرات ضد باکتریائی عصاره الکلی بره موم تولیدی برخی از مناطق استان آذر بایجان غربی روی باکتری پنی باسیلوس لاروا می‌باشد.

کلمات کلیدی: زنبورعسل، بره موم، باکتری *Paenibacillus larvae*، اثرات ضدباکتریائی، بیماری لوک آمریکائی

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 83 pp: 57-61

**Antibacterial effect of etanolic extract of honeybee propolis on the *Paenibacillus larvae* larvae (causative agent of honeybee American foulbrood disease)**

By: Moradi M. Razi Vaccine and Serum Institute Karaj, Iran. (Corresponding Author, Tel: +98 9126656154)

Antibacterial effects of honeybee propolis tested on the *Paenibacillus larvae* larvae, cause of honeybee American Foulbrood disease. After cultivation of bacterium in special medium we used of two antibacterial susceptibility tests: Broth Dilution Susceptibility Test and Paper Disk Susceptibility Test. In the B.D.S.T 0.32 milligrams/ml and higher concentrations of propolis inhibited growth of this bacterium completely and in the P.D.S.T paper disk that contained 0.01 to 0.1 miligrams of propolis made a growth inhibition zone about 5- 18 mm in diameter around them. These results show that produced propolis in Iran has an acceptable antibacterial effects on the P.larvae larvae and may be useful in A.F.B treatments in honeybee hives.

**Keywords: Ivermectin, Motilide, Erythromycin, Calf, Abomasum, Stomach**

است. مشخص شده که بره موم روی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی مؤثرتر است (Meresta.T and Meresta.) و (Kutluca S and Silici S ۲۰۰۵) و (et al ۲۰۰۳) و (Stepanović S ۱۹۸۸).

باکتری *Paenibacillus larvae* عامل بیماری مهلک لوک آمریکائی (American foulbrood) زنبورعسل است که هر ساله در نقاط مختلف جهان خسارات زیادی را به صنعت زنبورداری کشورها وارد می آورد. این باکتری گرم مثبت، متحرک و اسپوردار است و در مقابل شرایط نامساعد محیط بسیار مقاوم بوده و قادر است سالیان سال در محیط زنبورستان‌ها به صورت نهفته باقی بماند و به محض آماده شدن شرایط، رشد نموده و ضایعاتی را در زنبورعسل ایجاد نماید. (Bailey ۱۹۸۱). در حال حاضر آنتی بیوتیک‌های متعددی بر علیه بیماری لوک آمریکائی زنبورعسل استفاده می‌شوند ولی با توجه به عدم تأثیر آنها روی اسپور باکتری مذکور، درمان قطعی بیماری صورت نمی‌گیرد. از طرف دیگر چون باقی مانده‌ی مواد دارویی در فراورده‌های زنبورعسل خطراتی برای مصرف‌کنندگان این فراورده‌ها ایجاد می‌نمایند، لذا باید در پی یافتن راه‌ها و مواد دارویی مؤثر و کم خطری برای سلامتی انسان و زنبورعسل بود.

هدف اصلی این بررسی سنجش میزان حساسیت باکتری *P. larvae* به عصاره‌های الکلی بره موم زنبورعسل و بدست آوردن حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) باکتری *P.larvae* توسط بره موم و هموار کردن راه‌های استفاده دارویی این ماده در درمان بیماری لوک آمریکائی زنبورعسل بوده است.

**مواد و روش‌ها**  
**روش‌های انجام گرفته**

**روش Antimicrobial Susceptibility Test**

برای انجام این آزمایش از روش استاندارد Kirby- Bauer Disk Diffusion استفاده گردید (Koneman, K et al ۱۹۸۳). این روش

**مقدمه**

بره موم زنبورعسل صمغ درختان و گیاهان مختلفی از جمله کاج، صنوبر، تبریزی، چنار، گیلان، آلبالو و ... است که زنبوران چراگر آن را در سبدهای گرده خود جمع‌آوری نموده و در داخل کندو بعد از ترکیب آن با موم و بزاق خود به عنوان ماده‌ای درزگیر و صیقل‌دهنده سطوح داخلی کندو، ضد عفونی سلول‌های مومی بعد از خروج نوزادان و قبل از تخم‌گذاری ملکه در آنها و مومیائی نمودن لاشه مهاجمان تلف شده در داخل کندوها مورد استفاده قرار می‌دهند (Gisalberti. EL ۱۹۶۶, ۱۹۷۹, Cheng. Paul.C and Wong. Geary).

بره موم بطور کلی از ترکیباتی از جمله موم، صمغ، گرده گل و روغن‌های فرار تشکیل شده است که با استفاده از روش‌های آنالیز بیوشیمیائی، ترکیبات متنوعی از جمله فلاونوئیدها، الکل‌ها، اسیدهای آلفاتیك، آمینو اسیدها، اسیدهای آروماتیک، استرهای آروماتیک، کالکون‌ها، تریپنوئیدها، قندها و استروئیدها و صدها ماده دیگر تشکیل شده است (Bankova ۲۰۰۰, Marcucci.MC ۱۹۹۵).

انسان از دیر باز با خواص دارویی بره موم آشنائی داشته و آنگونه که مشخص شده از ۲۰۰۰ سال پیش از بره موم به عنوان ماده‌ای ضدباکتریائی استفاده می‌کرده است (Cheng. Paul.C and Wong. Geary ۱۹۹۶). بره موم دارای خواص دارویی زیادی روی انواع باکتری‌ها، ویروس‌ها (Harish.Z, et al ۱۹۹۷)، قارچ‌ها، سلول‌های سرطانی (Yukihiro. Akao, et al ۲۰۰۳) و تومورها (Keiko. Aso, et al ۲۰۰۴) و بیماری‌های مختلف انسانی و دامی است (Marcucci. MC ۱۹۹۵). یکی از اثرات جالب توجه بره موم اثرات ضدباکتریائی آن روی باکتری‌های مختلف انسانی و دامی است و اکثر باکتری‌ها نسبت به عصاره‌های مختلف بره موم حساسیت داشته و در برخی موارد بره موم روی باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌های رایج مؤثر بوده است (Grange.J ۱۹۹۰). در یک بررسی مشخص شده است که بره موم روی ۲۰۹ سویه *Staphylococcus aureus* مؤثر بوده و حداقل غلظت ضدباکتریائی آن حدود ۱۰ الی ۱۲۰ میلی گرم در میلی لیتر بوده

طبق مراحل زیر انجام گرفته است:

عصاره‌گیری از بره موم: برای اینکار ابتدا بره موم‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان آذربایجان غربی را به قطعات ریزتری در آورده و در الکل اتانول ۷۰ درصد ریخته و به مدت چند ساعت تا حدود یک شبانه روز در دمای آزمایشگاه قرار داده تا بره موم بخوبی در اتانول حل شود برای تسریع در حل بره موم هر از چندگاهی مخلوط حاصله را تکان داده تا بخوبی حل شود بعد از حل شدن آن را از کاغذ صافی واتمن شماره یک گذرانده تا عصاره خالص بره موم بدست آید (Brumfitt.W ۱۹۹۰).

تهیه رقت‌های مختلف عصاره الکی بره موم: برای اینکه بتوان رقت‌های دقیقی را از بره موم بدست آورد ابتدا الکل را از عصاره ها گرفته و بعد از خشک شدن کامل، میزان معینی از آنها را با ترازوی دیجیتالی وزن کرده و در داخل میزان مشخصی از اتانول حل نموده تا رقت مورد نظر بدست آید.

ساخت دیسک‌های کاغذ صافی: برای اینکار کاغذ صافی واتمن شماره دو را بوسیله دستگاه پانچ به اندازه دیسک‌های آنتی بیوگرام استاندارد در آورده و بعد از توزین، آنها را با میزان معینی از رقت‌های بره موم آغشته نموده و بعد از خشک شدن، میزان دقیق بره موم موجود در هر دیسک بر حسب میلی گرم (مشخص شده در جدول شماره ۱) محاسبه می‌گردید.

تهیه و آماده‌سازی محیط کشت ترکیبی J-Medium آگار (BaileyLeslie ۱۹۸۱)

آماده‌سازی محلول استاندارد Macfarland شماره ۱ (Koneman. K et al ۱۹۸۳)

کشت باکتری *P. larvae* در محیط کشت J-Medium آگار: جهت انجام این بررسی از سویه‌ی ATCC ۱۰۴۴ باکتری *P. larvae* موجود در بخش باکتری شناسی موسسه رازی استفاده گردیده است.

کشت باکتری *P. larvae* در محیط کشت J-Medium براث جهت ساخت مایه باکتریائی

استاندارد کردن مایه باکتریائی با استفاده از محلول استاندارد Macfarland شماره یک

آغشته کردن سطح محیط کشت با مایه باکتریائی آماده شده قرار دادن دیسک‌های آغشته به رقت‌های مختلف بره موم در سطح محیط کشت با فواصل مشخص از دیواره پلیت و دیسک‌های مجاور قرار دادن پلیت‌های کشت داده شده در انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت

قرائت نتایج حاصله (اندازه‌گیری قطر هاله ممانعت از رشد اطراف دیسک‌های کاغذی آغشته به غلظت‌های مختلف بره موم با استفاده از خط کش) (Koneman. K et al ۱۹۸۳).

#### روش رقت در براث جهت تعیین

#### (MIC) Minimum Inhibitory Concentration

این روش طبق مراحل زیر انجام گرفته است:

آماده سازی محیط کشت J-Medium براث

آماده سازی رقت‌های مختلف عصاره‌های الکی بره موم (بر حسب

میلی گرم در میلی لیتر)

آماده سازی مایه باکتریائی *P. larvae* بر اساس محلول استاندارد مک فارلند شماره یک

اضافه کردن میزان معینی از مایه باکتریائی به لوله‌های حاوی محیط کشت مایع

اضافه کردن رقت‌های مختلف عصاره‌های بره موم به لوله‌های حاوی مایه باکتریائی

قرار دادن لوله‌های آماده شده در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت

مشاهده رشد یا عدم رشد باکتری در رقت‌های مختلف بره موم: با توجه به اینکه مخلوط عصاره‌ی بره موم و محیط کشت مایع به رنگ شیری در آمده و مانع مشخص شدن وضعیت رشد باکتری در محیط کشت و تغییر رنگ حاصله می‌گردد لذا جهت مشخص نمودن میزان اثر بره موم روی رشد باکتری، محتویات هر یک از لوله‌های آزمایش را مجدداً در محیط جامد کشت داده و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. و بعد از این مدت نتایج قطعی اثرات حاصل از رقت‌های مختلف عصاره‌های بره موم روی باکتری *P. larvae* بدست آمده است.

لازم به ذکر است که در کنار هر یک از لوله‌های آزمایش حاوی رقت‌های مختلف بره موم دو عدد لوله حاوی محیط کشت و باکتری مورد نظر و میزان الکل اتانول موجود در هر یک از رقت‌های بره موم به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند و بعد از سپری شدن مدت زمان لازم محتویات همین لوله‌ها را هم کشت داده تا اثرات ضد باکتریائی الکل موجود در عصاره‌های استفاده شده مشخص گردد.

#### نتایج

جدول شماره یک نتایج حاصل از روش آنتی بیوگرام هر یک از غلظت‌های بره موم استفاده شده را نشان می‌دهد. همانطوری که در جدول مشاهده می‌شود قطر هاله‌ی ممانعت از رشد باکتری با میزان بره موم موجود در دیسک‌ها رابطه‌ی مستقیم داشته و با افزایش میزان بره موم، قطر هاله ممانعت از رشد اطراف دیسک‌ها نیز افزایش یافته است و از سوی دیگر مشخص گردید که بره موم استفاده شده دارای قدرت انتشار خوبی در سطح محیط کشت جامد می‌باشد.

در جدول شماره دو نتایج حاصل از روش رقت در براث (MIC) نشان داده شده است. همان گونه که مشاهده می‌شود در این روش هم میزان مهار رشد باکتری توسط بره موم با میزان بره موم موجود در رقت‌ها رابطه‌ی مستقیم دارد و با افزایش میزان بره موم در هر رقت از تعداد کلنی‌های باکتری بعد از کشت مجدد کاسته شده است. بطوری که در غلظت ۳۲/ میلی گرم در میلی لیتر هیچ گونه باکتری رشد ننموده است و این غلظت به عنوان حداقل غلظت ممانعت از رشد باکتری (*P. larvae* (MIC) توسط بره موم در نظر گرفته می‌شود.

#### بحث

بررسی‌های مختلف نشان داده‌اند که بره موم روی باکتری‌های گرم مثبت خیلی مؤثرتر از باکتری‌های گرم منفی است. این تفاوت تأثیر را

جدول ۱- نتایج آنتی بیوگرام غلظت‌های مختلف بره موم روی باکتری *P. larvae*

ردیف	میزان بره موم موجود در دیسک‌های کاغذ صافی (mg/disk)	قطر هاله ممانعت از رشد باکتری پنی باسیلوس لاروا (mm)
۱	دیسک کاغذی آغشته به الکل بدون بره موم	باکتری کاملاً رشد نموده است
۲	۰/۰۱	۵
۳	۰/۰۲	۸
۴	۰/۰۳	۱۰
۵	۰/۰۴	۱۳
۶	۰/۰۵	۱۴
۷	۰/۰۶	۱۵
۸	۰/۰۷	۱۶
۹	۰/۰۸	۱۶
۱۰	۰/۰۹	۱۷
۱۱	۰/۱	۱۸

جدول شماره ۲- نتایج حاصل از روش رقت در برات (MIC) بره موم روی باکتری *P. larvae*

ردیف	غلظت بره موم موجود در محیط کشت (mg/ml)	قطر هاله ممانعت از رشد باکتری پنی باسیلوس لاروا (mm)
۱	الکل اتانول ۷۰	رشد کامل باکتری
۲	۰/۰۱	۲۰
۳	۰/۰۲	۱۴
۴	۰/۰۴	۷
۵	۰/۰۸	۴
۶	۰/۱۶	۳
۷	۰/۳۲	۰
۸	۰/۶۴	۰

که تمام این باکتری‌ها نسبت به عصاره‌های بره موم حساس می‌باشند (Meresta, T and Meresta, L., ۱۹۸۰) و در سال ۱۹۸۵ MIC بره موم روی ۲۰۹ سویه‌ی مختلف *Sta.aureus* را حدود ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر و MBC آنرا حدود ۱۲۰ میلی گرم در میلی لیتر بدست آوردند (Meresta, T and Meresta, L., ۱۹۸۵).

در یک بررسی اثرات ضد باکتریایی بره موم را روی ۲۶۷ سویه باکتری بی‌هوازی مطالعه نموده‌اند و مشاهده شده است که این باکتری‌ها نسبت به غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر بره موم بسیار حساس می‌باشند (Kedzia ۱۹۸۶).

در رابطه با مکانیسم اثر ضد باکتریایی بره موم تحقیقات متعددی انجام گرفته است بطوری که Takaisi نشان داده است که بره موم از تقسیم سلولی باکتری‌ها ممانعت به عمل آورده و باعث تشکیل توده‌های چندسلولی کاذب از آنها می‌گردد. از سوی دیگر بره موم باعث ایجاد تغییر در ماهیت ساختمان دیواره سیتوپلاسم و دیواره سلول باکتری می‌گردد و همچنین باعث لیز نسبی باکتری گشته و از سنتز پروتئین باکتری هم ممانعت به عمل می‌آورد (Takaisi et al ۱۹۹۴). Park و همکارانش نشان داده‌اند که بره موم باعث جلوگیری از فعالیت آنزیم گلوکز ترانسفراز باکتری‌ها می‌شود (Park et al ۱۹۹۸) از سوی دیگر اثبات شده که بره موم فعالیت آنزیم‌های RNA پلی مراز وابسته به DNA باکتری و آنزیم محدود اثر آن را مهار می‌کند (Simuth, J. ۱۹۸۶). مهم‌ترین ترکیبات ضد باکتریایی بره موم ترکیباتی از جمله پینوبانکسین، پینوسیمبرین، گالانژین، کافئیک اسید فینیل استر، دی و تری اکسی فلاون‌ها، سیناپیک اسید، ایزوفورولیک اسید، دی ترپنیک اسید و سیرینگالدئید می‌باشند که این ترکیبات یا به تنهایی یا با خاصیت سنرژیستی اثرات خود را اعمال می‌نمایند (Cheng, Paul.C and Wong, Geary ۱۹۹۶).

Meresta پیشنهاد می‌کند که بره موم باعث تخریب باکتری *Parvae* می‌شود (Meresta ۱۹۸۸). نتایج بررسی انجام گرفته هم این پیشنهاد را تأیید می‌کند چرا که وقتی محتویات لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت، باکتری و رقت‌های مختلف بره موم روی محیط جامد کشت داده شد باکتری مورد نظر هیچ‌گونه رشدی نداشته و سطح محیط کشت عاری از کلنی باکتری بود که این بدین معناست که بره موم باعث تخریب باکتری و ممانعت از تشکیل مجدد اسپور و رشد آن در محیط کشت می‌گردد و این می‌تواند نویدی برای تولید موادی با تأثیر روی اسپور باکتری‌ها و از بین بردن آنها در محیط‌های زنده باشد.

نتایج این بررسی نشان می‌دهد که بره موم زنبور عسل ایران (استان آذربایجان غربی) واجد اثر ضد باکتریایی روی باکتری *Parvae* عامل بیماری لوک آمریکائی زنبور عسل می‌باشد و در صورت انجام بررسی‌های بیشتر می‌توان به مواد طبیعی حاصل از این فرآورده‌ی زنبور عسل در جهت کنترل و درمان بیماری فوق دست یافت. از سوی دیگر با توجه به تنوع آب و هوایی و پوشش گیاهی مناطق مختلف ایران، امکان استحصال بره موم با کیفیت مناسب و حتی بهتر از بره موم تولیدی سایر نقاط جهان وجود دارد و می‌توان با استفاده از روش‌های مدرن استحصال و فرآوری بره موم، بازار مناسبی را برای صادرات این محصول

ناشی از تفاوت ساختمان دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌دانند (Brumfitt.W ۱۹۹۰). از سوی دیگر منبع گیاهی و فصل تولید بره موم و نوع حلال استفاده شده هم روی اثرات ضدباکتریایی بره موم تأثیر چشم‌گیری دارند چرا که حلال‌های آلی ترکیبات بیشتری از بره موم را آزاد کرده و با این حلال‌ها اثرات ضدباکتریایی زیادی به دست می‌آید (Cheng, Paul.C and Wong, Geary ۱۹۹۶).

در بررسی انجام گرفته مشخص گردید که دیسک‌های کاغذ صافی حاوی ۰/۱ الی ۰/۱ میلی گرم بره موم با ایجاد هاله‌ای به قطر ۵ الی ۱۸ میلی‌متر مانع از رشد باکتری *Parvae arvae* در اطراف خود شده‌اند و این نتایج مشابه با نتایج حاصل از تحقیقات Esther Margardia A.F.Bastos و همکارانش روی اثرات ضد باکتریایی بره موم روی باکتری *Parvae* است چرا که ایشان نشان دادند که بره موم مناطق مختلف برزلی با توجه به فصول مختلف سال در غلظت‌های ۱/۷ الی ۰/۱۲ میلی گرم در دیسک بر این باکتری موثر بوده‌اند و علت اصلی این وسعت دامنه‌ی تأثیر را منبع تهیه بره موم دانسته‌اند. (Esther Margardia A.F.Bastos et al ۲۰۰۸ همچنین Brumfitt) و همکارانش با بررسی اثرات ضد باکتریایی بره موم روی باکتری‌های *Candida albicans* و *Sta.aureus, Bacteriodis subtilis* قطر هاله‌ی ممانعت‌کننده از رشد را ۷ الی ۱۴ میلی متر بدست آورده‌اند (Brumfitt ۱۹۹۰).

در این بررسی نشان داده شد که غلظت ۰/۳۲ میلی گرم در میلی لیتر بره موم باعث مهار کامل رشد باکتری *Parvae* می‌گردد و این غلظت به عنوان حداقل غلظت مهارکننده (Minmum Inhibitory Concentration) رشد باکتری *Parvae* توسط بره موم در نظر گرفته شد. سایر محققین در کشورهای مختلف هم نتایج مشابهی روی باکتری‌های مختلف بدست آورده‌اند بطوری که Velazquez C و همکارانش MIC عصاره اتانولی بره موم روی باکتری *Sta.aureus* را در حدود ۱/۱۰ میلی گرم در میلی لیتر بدست آورده‌اند (Velazquez C et al ۲۰۰۷). در یک بررسی Stepanovic S و همکارانش با استفاده از روش آگار دیفیوژن نشان داده‌اند که عصاره‌ی اتانولی بره موم در غلظت ۰/۷۸ 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 (Stepanovic S et al ۲۰۰۳).

در این بررسی مقایسه‌ای بین اثرات ضدباکتریایی بره موم با آنتی بیوتیک‌های رایج در درمان بیماری لوک آمریکائی صورت نگرفته است ولی در بررسی‌های سایر محققین مشاهده شده است که آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلین و تایلوزین دارای اثرات ضدباکتریایی به مراتب قوی‌تری نسبت به بره موم روی باکتری *Parvae* می‌باشند. بطوری که Adriana M و همکارانش نشان دادند که آنتی بیوتیک تایلوزین دارای MIC ۰/۰۷۸ تا ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر روی ۶۷ سویه‌ی مختلف از باکتری *Parvae* می‌باشد و این میزان در مقایسه با MIC بره موم روی این باکتری بسیار پائین است (Adriana M ۲۰۰۵). Meresta, L و Meresta, T در سال ۱۹۸۰ با بررسی اثرات ضد باکتریایی بره موم روی ۷۵ سویه از باکتری‌های مختلف نشان دادند

