

## بررسی اثر ضدباکتریائی زهر خام زنبور عسل (*Apis mellifera*) و فراکسیون‌های حاصل از آن به روش انتشار از دیسک

• حسین ذوالفقاریان (نویسنده مسئول)

بخش جانوران سمی و تهیه پادزهر، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران البرز، ایران

• محمد مهاجری

گروه سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرضا، اصفهان، ایران.

• مهدی بابائی

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، تهران، ایران.

• نادر مصوری

آزمایشگاه رفانس میکوباکتریوم بیماری‌زای دام، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران البرز، ایران

• ایرج جوادی

گروه سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرضا، اصفهان، ایران.



تاریخ دریافت: ۱۳۹۴-۱۰-۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵-۰۱-۲۲

Email: zolfagharianh@yahoo.com

### چکیده

همزمان با کشف و مصرف آنتی بیوتیک‌های جدید، باکتری‌ها نیز واجد ویژگی‌هایی می‌شوند که آنتی بیوتیک‌ها بر آن‌ها بی اثر می‌شوند و مسئله مقاومت باکتریایی در چنین شرایطی مطرح می‌گردد. زهر جانوران دارای اثرات ضد باکتریائی است که در این میان زهر زنبور عسل دارای اثرات ضد سرطانی، ضد آرتروز و ضد التهابی می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات زهر خام زنبور عسل و فراکسیون‌های آن بر روی تعدادی از باکتری‌ها می‌باشد. در این مطالعه اثرات ضد باکتریایی زهر زنبور عسل گونه *Apis mellifera* و فراکسیون‌های آن بر علیه ۵ گونه باکتری شامل *اشریشیا کولی*، *سالمونلا تیپیفی موربوم*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *بورخولدريا مالئی*، *بورخولدريا سودومالئی* بررسی شد. در این راستا حجم‌های مختلف از زهر خام، همراه با دو فراکسیون آن که با روش ژل فیلتراسیون حاصل شده بودند، با آنتی بیوتیک استاندارد به عنوان کنترل مثبت به روش انتشار از دیسک مورد ارزیابی قرار گرفت و هاله ممانعت از رشد باکتری در اطراف دیسک‌ها اندازه گیری شد. این بررسی نشان داد که زهر خام زنبور عسل و فراکسیون‌های آن بر روی باکتری‌های *اشریشیا کولی* و *سالمونلا تیپیفی موربوم* اثر مثبت دارد و قطر هاله ممانعت از رشد اطراف دیسک‌ها در غلظت‌های ۲۵، ۳۵ و ۴۵ میکرولیتر برای *اشریشیا کولی* به ترتیب در حدود ۷، ۱۰ و ۱۴ میلی‌متر و برای *سالمونلا تیپیفی موربوم* به ترتیب در حدود ۷، ۹ و ۱۲ میلی‌متر بود. این زهر و فراکسیون‌های آن بر بقیه باکتری‌های مورد آزمایش تأثیری نداشت. بررسی آماری نشان داد که  $p$  کمتر از ۰/۰۵ است. بررسی حجم‌های زهر و نمونه‌های آزمایشی ثابت کرد که با افزایش حجم زهر اثر ضد باکتریائی نسبتاً افزایش می‌یابد.

کلمات کلیدی: زهر زنبور عسل، ضد باکتریائی، انتشار از دیسک، *اشریشیا کولی*، *سالمونلا تیپیفی موربوم*

- Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 114 pp: 117-126

#### Investigation of the Antibacterial Effect of Crude Venom of Honey Bee (*Apis mellifera*) and its Fractions by Disk Diffusion Method

By: Zolfagharian, H., (Corresponding Author) Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. Mohajeri, M., Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Islamic Azad University, Shahreza Branch, Isfahan, Iran. Babaie, M., Young Researchers and Elites club, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Mosavari, N., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. Javadi I., Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Islamic Azad University, Shahreza Branch, Isfahan, Iran.

Email: zolfagharianh@yahoo.com

Received: 2015-12-27 Accepted: 2016-04-10

In the world of pharmacology, along with the discovery of new antibiotics, bacteria also gain features that antibiotics are ineffective against, and the issue of bacterial resistance in such a situation arises. Venom of animals have anti-bacterial effects among which, honey bee venom has therapeutic effects including anti-cancer, anti-arthritis and anti-inflammatory effects. The aim of this study was to evaluate the effects of crude venom of honey bee and its fractions on bacteria. In this study, the antibacterial activity of honey bee venom (*Apis mellifera*) and its fractions against five bacterial species including *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudo mallei* was investigated. In this regard, different volumes of crude venom and two fractions which were obtained by gel filtration with standard antibiotic as positive controls by disc-diffusion method were evaluated and the inhibition zone was measured. The results showed that crude venom of honey bee and its fractions have a positive effect on *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. The inhibition zone around the disc in concentrations of 25, 35 and 45  $\mu$ l for *Escherichia coli* was about 7, 10 and 14 mm and for *Salmonella typhimurium* was about 7, 9 and 12, respectively. This venom and its fractions had no effect on the other tested bacteria. Statistical analysis showed that p-value was less than 0.05. Analysis of the venom volume and the test samples proved that increasing the venom volume leads to a relative increase in anti-bacterial effect.

Key words: bee venom, antibacterial, disk diffusion, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*

و رایج‌ترین دلیل بروز عفونت ادراری می‌باشد. این باکتری از طریق مسیر مدفوعی-دهانی از یک فرد به فرد دیگر منتقل می‌شود. داروهای مختلفی از جمله سفالوسپورین‌ها در درمان عفونت ادراری مورد استفاده قرار می‌گیرد. در سال‌های اخیر مقاومت نسبت به سفالوسپورین‌ها به دلیل تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف از نوع EBSL افزایش یافته است. این باکتری بیشترین حساسیت را به آنتی‌بیوتیک‌های نیتروفوران‌توئین، آمیکاسین و جنتامایسین دارد (۴).

سالمونلا باکتری گرم منفی است و عامل یکی از شایع‌ترین مسمومیت‌های غذایی می‌باشد. اعضای خانواده سالمونلا از نظر مقاومت در برابر عوامل فیزیکی و شیمیایی شاخص هستند و به سختی نابود

#### مقدمه

عدم وجود داروهای مفید و مؤثر برای درمان بیماری‌های عفونی در سال‌های قبل از کشف آنتی‌بیوتیک‌ها باعث گسترش این بیماری‌ها و مرگ و میر بسیاری از مبتلایان گردید. میزان مرگ و میر بیماران مبتلا به عفونت با کشف داروهای جدید کاهش یافت، اما به مرور زمان و با استفاده نادرست و بی‌رویه از این داروها موضوع نگران‌کننده‌ای بنام مقاومت باکتریایی مطرح گردید (۷). مقاومت باکتریایی در باکتری‌هایی نظیر اشریشیا کولی، سالمونلا، سودوموناس آئروژینوزا و بورخولدریا مالتی و بورخولدریا سودومالتی و ... رو به افزایش می‌باشد. اشریشیا کولی نوعی باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است

بورخولدریا مالئی و بورخولدریا سودومالئی بود که میزان رشد باکتری‌ها در حضور زهر خام و فراکسیون‌های آن بررسی شد و فراکسیون‌ها و پپتیدهایی که از رشد باکتری ممانعت می‌کردند، مشخص گردید.

### مواد و روش‌ها

زهر زنبور عسل گونه *Apis mellifera* به صورت لیوفیلیزه از بخش جانوران سمی موسسه واکسن و سرم سازی رازی تهیه شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. ۵ سوبه باکتری شامل *اشریشیا کولی* (25922ATCC)، *سالمونلا تیفی موریوم* (14028ATCC)، *سودوموناس آئروژینوزا* (27853ATCC)، *بورخولدریا مالئی* (23344ATCC) و *بورخولدریا سودومالئی* (23343ATCC)، از موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی تهیه شد. سفادکس G-50، از فارماسیا (سوند) و سایر مواد شیمیایی و معرف‌ها از شرکت‌های معروف مواد شیمیایی خریداری گردید.

### اندازه‌گیری میزان پروتئین زهر خام بر اساس روش Lowry

مقدار پروتئین موجود در محلول زهر خام، به روش پروتئین سنجی Lowry و بر اساس منحنی استاندارد حاصل از سنجش غلظت‌های مختلف محلول BSA، تعیین شد (۱۲).

### انجام کروماتوگرافی زهر خام زنبور عسل

ستون ژل کروماتوگرافی سفادکس G-50 (۲cm × ۱۲۰) به مدت ۲۲ ساعت در بافر استات آمونیوم ۰/۰۵ میلی‌مولار با pH برابر ۴/۷۵ به تعادل رسید. ۱۰۰ میلی‌گرم زهر خام زنبور عسل در ۱ میلی‌لیتر بافر استات آمونیوم ۰/۰۵ میلی‌مولار با pH برابر ۴/۷۵ حل گردید. محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۴+ درجه سانتی‌گراد در ۲۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ، محلول پروتئینی به تدریج به روی ستون تزریق گردید. بعد از اینکه نمونه به خوبی جذب ستون شد، شستشوی ستون با بافر ذکر شده انجام شد. محلول خروجی از ستون ژل کروماتوگرافی بوسیله دستگاه جمع‌کننده اتوماتیک با سرعت جریان ۶۰ میلی‌لیتر در ساعت جمع‌آوری شد. جذب نمونه‌های خروجی در ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و منحنی جذب بر حسب تعداد لوله‌ها رسم گردید. تمامی فراکسیون‌ها ۲۴ ساعت مقابل ۱۰ حجم آب مقطر دیالیز شدند و در ۴ درجه سانتی‌گراد تغلیظ گردیدند (۳).

### آزمایش تعیین اثرات آنتی باکتریال زهر خام زنبور عسل و فراکسیون‌های حاصل از آن با روش انتشار از دیسک

برای تعیین حساسیت باکتری‌ها تست دیسک دیفیوژن (Disk diffusion) مورد استفاده قرار گرفت (۵). برای تهیه مایه باکتری از محلول استاندارد مک فارلند نیم استفاده گردید و بعد از کشت باکتری، مقداری از کلونی باکتری بوسیله آنس برداشته و در سرم فیزیولوژی استریل حل شد و میزان باکتری موجود در آن با محلول استاندارد مک فارلند نیم تنظیم گردید. تمامی مراحل در زیر لامینار هود انجام گرفت.

بعد از تهیه محلول باکتری، با سواب استریل محلول هم زده شد و بعد از آبکشی کردن سواب، به محیط کشت مولر هینتون آگار انتقال داده شد. برای تهیه دیسک‌های حاوی زهر خام، ابتدا یک میلی‌گرم زهر خام

می‌شوند به طوری که شکل کلرا سوییس آن شاخصی برای سنجش کیفیت ضد عفونی‌کننده‌ها می‌باشند. جدایه‌های *سالمونلا* به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، حساس هستند (۱۳).

*سودوموناس آئروژینوزا* یکی از عوامل بیماری‌زای فرصت طلب و از علل شایع عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد. به رغم داروهای گسترده‌ای که دارای فعالیت ضد سودوموناسی هستند، عفونت‌های کشنده‌ای ناشی از این باکتری باعث مرگ و میر در بیماران بستری می‌شود. همچنین این ارگانیزم به علت افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی خصوصاً بصورت چند دارویی مشکلات بسیاری را برای درمان عفونت‌های ناشی از آن‌ها ایجاد کرده است. این باکتری بیشتر در برابر آنتی‌بیوتیک‌های معمول پایداری می‌کند، ولی برخی گونه‌ها به جنتامایسین، توپرامایسین، کولیسیتین، نورفوکسازین و سیپروفلوکسازین پاسخ می‌دهند (۱۷).

*بورخولدریا مالئی* (یا *سودوموناس مالئی*) عامل بیماری بسیار کشنده مضمشه است و از بیماری‌های مشترک انسان و دام است. انسان نیز در زمره جانداران حساس به این عامل عفونی است که بیشتر موارد بیماری منجر به مرگ می‌شود. میزان مرگ و میر ناشی از آن در حدود ۶۰ درصد حتی در صورت درمان آنتی‌بیوتیکی است و مرگ در عرض چند روز می‌تواند رخ دهد (۱۵).

محققین برای کشف داروهای جدید و مؤثرتر به منظور مقابله با مقاومت‌های ایجاد شده با این باکتری‌ها و کشف داروهای جایگزین منابع طبیعی مختلفی از جمله پپتیدهای آنتی باکتریال را مورد آزمایش قرار دادند. این پپتیدها در بدن جاندارانی مانند زنبور عسل و مارها سرعت و با هزینه متابولیکی پائین سنتز شده و به میزان زیاد ذخیره می‌شوند و در کمترین زمان به عنوان اولین خط دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زای مهاجم در محل عفونت وارد عمل می‌شوند. باکتری‌های گرم منفی به دلیل ساختار و ترکیبات دیواره و وجود غشای خارجی، در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت، به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم‌ترند. در تحقیقات اخیر سعی شده که نسبت به این مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی، روش‌هایی اتخاذ گردد که بر رشد این نوع باکتری‌ها تأثیرگذار باشد. از جمله این تحقیقات استفاده از زهر (پروتئین‌ها و پپتیدهای) زنبور عسل به عنوان جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد (۱۰).

پپتیدهای آنتی‌باکتریال گاهی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های موجود قابلیت بیشتر و سریع‌تری در مقابله با پاتوژن‌های مقاوم نشان داده‌اند. (۶). یکی از منابع طبیعی پپتیدهای آنتی‌باکتریال، زهر جانوران سمی از جمله زهر زنبورها، عقرب‌ها، مورچه‌ها، عنکبوت‌ها و مارها می‌باشد که در بسیاری از موارد حضور پپتیدهای آنتی‌باکتریال در زهر این جانوران به اثبات رسیده است (۱۴).

زهر زنبور عسل مخلوط پیچیده‌ای از پروتئین‌ها، پپتیدها و اجزاء با وزن مولکولی کم است و در اکثر موارد این زهر شامل ترکیباتی مانند فسفولیپاز، میلیتین، آپامین، هیستامین، دوپامین و گلوکز و ... می‌باشد (۹).

باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های اختصاصی خود مقاومت نشان داده‌اند. به همین دلیل درمان (با دارو) جایگزین برای کنترل این باکتری‌ها ضروری به نظر می‌رسد. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات زهر خام زنبور عسل و فراکسیون‌های آن بر روی باکتری‌های *اشریشیا کولی*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *سودوموناس آئروژینوزا*،

### نتایج

مقدار پروتئین موجود در محلول زهر خام زنبور عسل، به روش پروتئین سنجی Lowry با توجه به فرمول ارائه شده در نمودار استاندارد، mg/ml ۳/۶ بدست آمد.

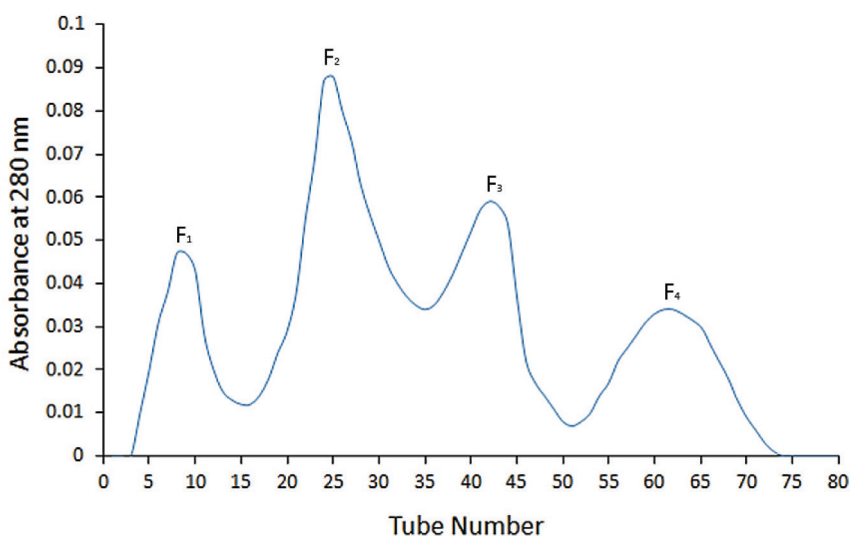
با استفاده از ژل کروماتوگرافی تعداد ۴ پیک (۴ فراکسیون) از زهر زنبور عسل بدست آمد و نمودار مربوط به آن رسم گردید (شکل ۱). این فراکسیون‌ها همراه با زهر خام زنبور عسل برای انجام تست تعیین اثرات آنتی‌باکتریال، به کار برده شدند.

نتایج حاصل از تست تعیین اثرات آنتی‌باکتریال بر روی باکتری‌های سالمونلا تیفی موریوم، بورخولدریا مالئی، بورخولدریا سودومالئی، سودوموناس آئروژینوزا و اشریشیا کولی در دو عامل زهر خام و فراکسیون‌های اول و دوم حاصل از آن در ۳ حجم ۲۵، ۳۵ و ۴۵ میکرولیتر نشان داد که زهر زنبور عسل بر روی ممانعت از رشد باکتری‌های سالمونلا تیفی موریوم و اشریشیا کولی اثر مهاری دارد (شکل ۲) و در میان ۴ فراکسیون بدست آمده فقط دو فراکسیون اول بر روی ممانعت از رشد باکتری‌ها اثر مهاری داشتند (شکل ۳). هاله ممانعت از رشد اطراف دیسک‌ها بوسیله کولیس، اندازه‌گیری شد و نتایج آن در شکل‌های ۵ و ۶ آورده شده است. این در حالی بود که این زهر و فراکسیون‌های حاصل از آن بر روی سایر باکتری‌ها (بورخولدریا مالئی، بورخولدریا سودومالئی و سودوموناس آئروژینوزا) تأثیری نداشتند (شکل ۴).

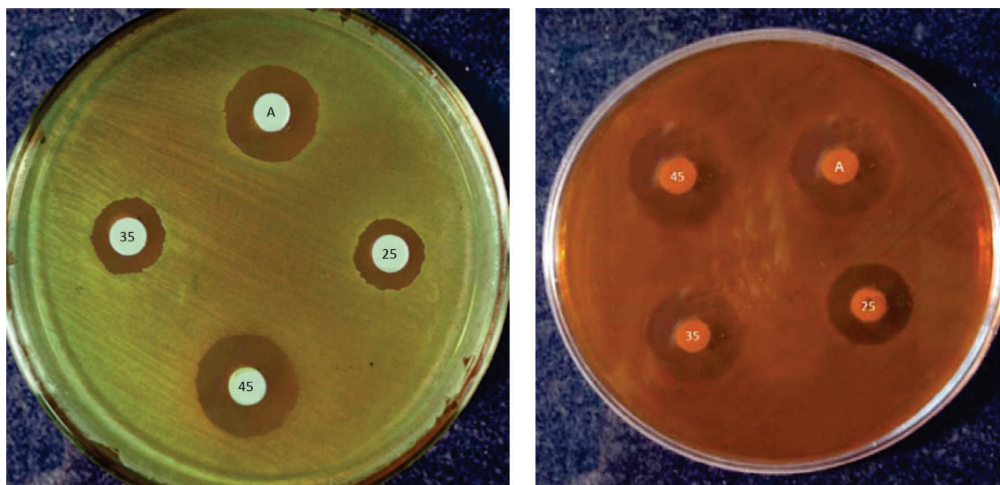
در سه نوع باکتری بورخولدریا مالئی، بورخولدریا سودومالئی و سودوموناس آئروژینوزا در هیچ یک از دو تکرار آزمایش، ممانعت از رشد باکتری در اطراف نمونه‌های آزمایشی در گروه زهر خام و فراکسیون اول و

زنبور عسل در یک میلی‌لیتر از آب مقطر استریل حل شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سه حجم ۲۵، ۳۵ و ۴۵ میکرولیتر از این محلول به دیسک‌های خام کاغذی آنتی‌بیوگرام ۵ میلی متر اضافه گردید. همچنین دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین ۱۰ میکروگرم نیز به عنوان کنترل مثبت (آنتی‌بیوتیکی که مانع از رشد باکتری می‌گردد، در مقایسه با زهر زنبور عسل) در محیط کشت قرار گرفت. بعد از کشت، دیسک‌های کاغذی (در سه غلظت از زهر خام و فراکسیون‌های حاصل از آن) بر روی محیط کشت و در فواصل مناسب قرار داده شد. پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت، قطر هاله ممانعت از رشد اطراف هر دیسک اندازه‌گیری شد. مراحل بالا برای بررسی اثرات ضد باکتریایی فراکسیون‌های حاصل از زهر زنبور عسل پس از ژل کروماتوگرافی تکرار گردید.

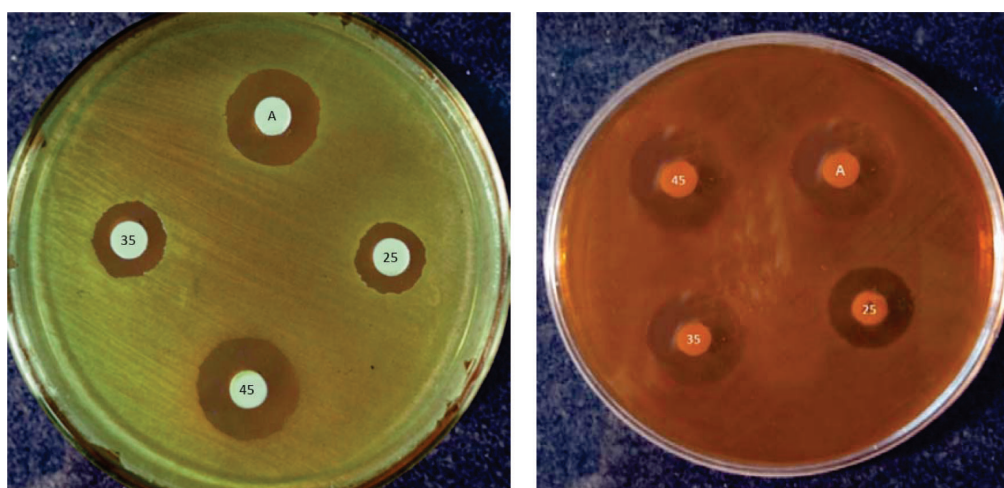
برای ارزیابی اثرات ضدباکتریایی تأثیر متغیر زهر زنبور عسل در سه سطح و فراکسیون اول و فراکسیون دوم در سه حجم بر میانگین ممانعت از رشد باکتری‌های مورد آزمایش و همچنین دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین در محیط کشت باکتری از نرم‌افزار آماری SPSS و از آزمون آنالیز واریانس دوطرفه (two-way ANOVA) استفاده شد. نحوه تأثیر سطوح این دو عامل بر ممانعت از رشد باکتری، با استفاده از میانگین حاشیه‌ای (marginal means) این متغیرها در حجم‌های مختلف هر یک از عوامل مطالعه گردید. در مواردی که سطح معنی‌داری در هر دو عامل زهر زنبور عسل و حجم در سطوح ذکر شده در ممانعت از رشد باکتری با اثر دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین به عنوان کنترل مثبت مشاهده گردید، با استفاده از آزمون تعقیبی دانکن به بررسی این دو عامل پرداخته شد.



شکل ۱- ژل کروماتوگرافی ۱۰۰ میلی‌گرم زهر خام زنبور عسل با استفاده از سفادکس G-50



شکل ۲- هاله ممانعت از رشد باکتری‌های سالمونلا تیفی‌موریوم (راست) و اشیریشیا کولی (چپ) توسط مقادیر مختلف زهر خام زنبور عسل و آنتی بیوتیک جنتامایسین



شکل ۳- هاله ممانعت از رشد باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم، توسط مقادیر مختلف فراکسیون اول (راست) و فراکسیون دوم (چپ) زهر خام زنبور عسل و آنتی بیوتیک جنتامایسین



شکل ۴- هاله ممانعت از رشد باکتری‌های بورخولدريا مالتی، بورخولدريا سودومالتی و سودوموناس آنروژینوزا توسط مقادیر مختلف زهر خام زنبور عسل و آنتی بیوتیک جنتامایسین

دوم مشاهده نگردید. به این ترتیب زهر خام زنبور عسل و فراکسیون اول و دوم آن در باکتری‌های نوع ۱ تا ۳ خاصیت آنتی‌باکتریال ندارد. با توجه به این که صحت اجرا به کمک گروه کنترل مثبت ارزیابی شده است، می‌توان گفت که زهر خام زنبور عسل و فراکسیون اول و دوم آن بر روی باکتری بورخولدريا مالمی خاصیت آنتی‌باکتریال ندارد و بیان‌کننده عدم تأثیر هر دو متغیر زهر زنبور عسل در سه سطح مورد بررسی و همچنین متغیر عامل حجم در هر سه سطح خود بر محیط کشت باکتری است.

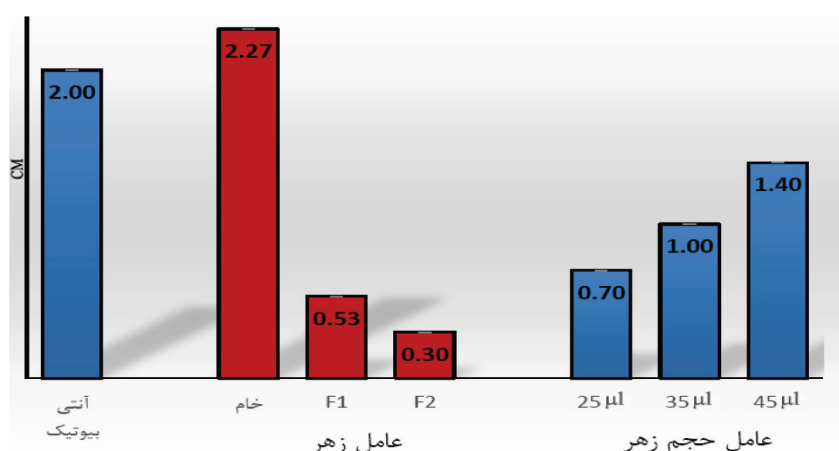
#### باکتری اشیریشیا کولی و سالمونلا تیفی موربوم

آزمون آنالیز واریانس دوره‌ها برای بررسی تأثیر دو عامل زهر و حجم زهر بر میانگین ممانعت از رشد باکتری اشیریشیا کولی و سالمونلا تیفی موربوم

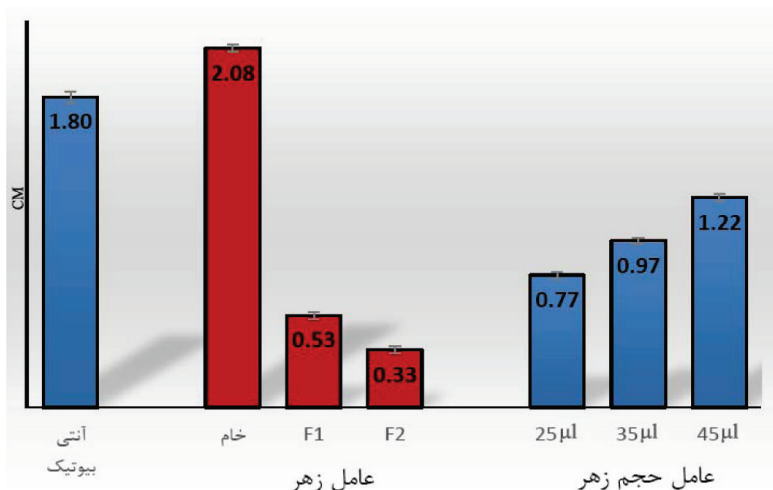
دوم مشاهده نگردید. به این ترتیب زهر خام زنبور عسل و فراکسیون اول و دوم آن در باکتری‌های نوع ۱ تا ۳ خاصیت آنتی‌باکتریال ندارد.

#### بررسی آماری اثرات متغیر زهر در سه سطح زهر خام، فراکسیون اول و دوم و سه حجم ۲۵، ۳۵ و ۴۵ میکرولیتر بر روی باکتری‌های مورد آزمایش باکتری‌های بورخولدريا مالمی، بورخولدريا سودومالمی و سودوموناس آئروژینوزا

در این باکتری‌ها در اطراف نمونه‌های آزمایشی، در هیچ یک از گروه‌های زهر خام و فراکسیون اول و دوم زهر و همین‌طور در سه حجم



شکل ۵- میانگین حاشیه‌ای ممانعت از رشد باکتری اشیریشیا کولی در سطوح مختلف عامل زهر و عامل حجم زهر



شکل ۶- برآورد میانگین حاشیه‌ای ممانعت از رشد باکتری سالمونلا تیفی موربوم در سطوح مختلف عامل زهر و عامل حجم زهر

سطح  $P > 0/05$  معنی دار خواهند بود (شکل ۵ و ۶). بنابراین می توان گفت هر یک از اثرات اصلی نوع زهر و حجم زهر بر میانگین ممانعت از رشد باکتری در سطح  $P > 0/05$  معنی دار است. اگر چه بر اساس مجموع مربعات بدست آمده می توان استنباط نمود که نوع زهر نسبت به حجم زهر عامل بسیار مهم تری در تغییرات مشاهده شده در متغیر پاسخ است (این عامل برای باکتری اشیریشیا کولی ۸۷ درصد کل تغییرات مشاهده شده و برای باکتری سالمونلا تیفی موریوم ۹۳ درصد کل تغییرات مشاهده شده را تبیین می کند). از طرفی اثر متقابل نوع زهر و حجم زهر بر میانگین ممانعت از رشد باکتری بسیار ناچیز است (حدود ۴ درصد از کل تغییر پذیری متغیر پاسخ برای باکتری اشیریشیا کولی و حدود ۲ درصد از کل تغییر پذیری

نشان دهنده این است که با توجه به نتیجه بدست آمده به ترتیب ۹۶ درصد و ۹۸ درصد تغییرات مشاهده شده در ممانعت از رشد باکتری توسط اثرات اصلی عامل زهر و عامل حجم زهر قابل تبیین است. از آنجایی برای هر دو تکرار آزمایش در هر یک از سطوح نوع زهر و حجم زهر مقادیر یکسانی مشاهده گردید، اثر مؤلفه خطا، صفر بدست آمده است. بنابراین در این شرایط قادر به محاسبه مقدار آماره F و همینطور میزان معنی داری اثرات نیستیم. اگر مدل آنالیز واریانس دوطرفه برازش (مناسب سازی) داده شده را بدون حضور اثر متقابل نوع زهر و حجم زهر مجدداً برازش دهیم، مجموع مربعات بدست آمده برای اثر متقابل نوع زهر و حجم زهر با مؤلفه خطا مخلوط می شود. در این صورت اثرات اصلی عامل نوع زهر و حجم زهر در

عامل حجم زهر			عامل زهر		
۳	۲	۱	۳	۲	۱
		۰/۷۰			۲/۲۷
		۲۵ $\mu$ l			خام
	۱/۰۰		۰/۵۳		F <sub>1</sub>
		۳۵ $\mu$ l			F <sub>2</sub>
۱/۴۰			۰/۳۰		
		۴۵ $\mu$ l			
۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰
		Sig			Sig

شکل ۷- نتیجه آزمون تعقیبی دانکن در مورد باکتری اشیریشیا کلی

عامل حجم زهر			عامل زهر		
۳	۲	۱	۳	۲	۱
		۰/۷۷			۲/۰۸
		۲۵ $\mu$ l			خام
	۰/۹۷		۰/۵۳		F <sub>1</sub>
		۳۵ $\mu$ l			F <sub>2</sub>
۱/۲۲			۰/۳۳		
		۴۵ $\mu$ l			
۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰
		Sig			Sig

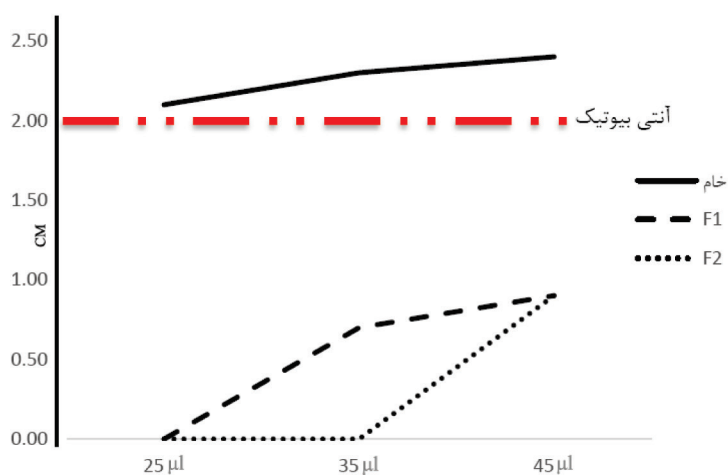
شکل ۸- نتیجه آزمون تعقیبی دانکن در مورد باکتری سالمونلا تیفی موریوم

بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده دو فرض اصلی پژوهش مبنی بر وجود خاصیت آنتی‌باکتریال برای زهر خام و فراکسیون اول و دوم آن در باکتری *اشریشیا کولی* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* تأیید می‌شود. اگرچه زهر خام زنبور عسل دارای بیش‌ترین آنتی‌باکتریال و فراکسیون دوم آن دارای کم‌ترین خاصیت آنتی‌باکتریال است.

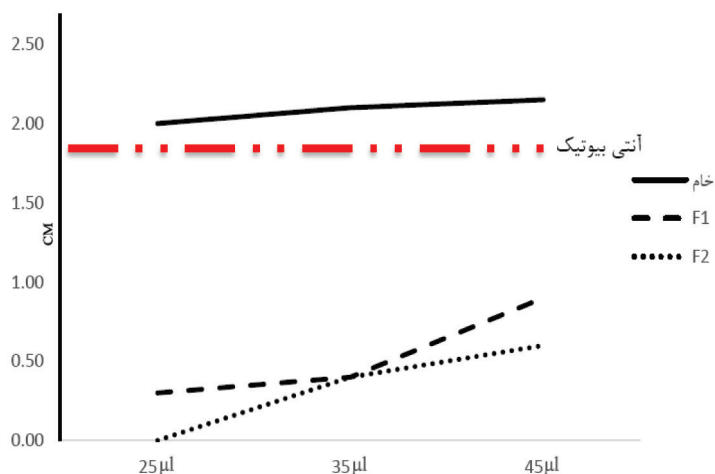
### بحث

اغلب پپتیدهای آنتی‌باکتریال دارای خصوصیتی از جمله ساختار خطی، زنجیره کوتاه، بار الکتریکی مثبت و قابلیت تبدیل شدن به مارپیچ آلفا در زمان واکنش می‌باشند. فعالیت اکثر پروتئین‌های آنتی‌باکتریال

متغیر پاسخ برای باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* را تبیین می‌کند).  
آزمون تعقیبی دانکن برای مقایسه میانگین ممانعت از رشد باکتری در سطوح مختلف هر یک از عوامل زهر و حجم زهر برای باکتری‌های *اشریشیا کولی* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* انجام شد و نشان داد که کدام یک از سطوح مختلف نوع زهر و حجم زهر بر میانگین ممانعت از رشد دو باکتری تأثیر معنی‌داری داشته‌اند، که نتایج آن در شکل‌های ۷ و ۸ آورده شده است. در عامل زهر، میانگین ممانعت از رشد باکتری در هر سه سطح زهر خام و فراکسیون اول و دوم اختلاف معنی‌داری داشتند. به علاوه با افزایش حجم زهر میانگین ممانعت از رشد باکتری‌ها به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل‌های ۹ و ۱۰).



شکل ۹- اثر متقابل زهر و حجم زهر بر میانگین ممانعت از رشد باکتری *اشریشیا کولی*



شکل ۱۰- اثر متقابل زهر و حجم زهر بر میانگین ممانعت از رشد باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم*



دو توکسین پپتیدی با نام لایکوتوسین ۱ و ۲ با فعالیت آنتی‌باکتریال از سم عنکبوت *Lycosa carolonensis* جدا شده است. این دو پپتید با انجام واکنش الکترواستاتیک با غشاء لیپیدی پاتوژن و ایجاد اختلال در نظم فسفولیپیدهای آن منجر به جلوگیری از رشد باکتری‌هایی چون اشریشیا کولی می‌گردد که به نظر می‌رسد همچون زهر زنبور عسل دارای آنزیم فسفو لیپاز A2 می‌باشد (۲۰).

از مهم‌ترین مکانیسم‌های اثر آنتی‌بیوتیک‌ها اعمال اثر بر پوشش باکتری می‌باشد. دانشمندان ضمن مطالعات انجام شده روی زهر از منابع مختلف و متعدد مشخص نمودند که هدف اولیه پپتیدهای آنتی‌باکتریال موجود در زهر، غشاء سیتوپلاسمی باکتری می‌باشد. پپتیدهای آنتی‌باکتریال با ایجاد کانال‌هایی در غشای سلولی و یا بر هم زدن نظم فسفولیپیدهای غشاء وظایف متعدد آن را که برای حیات باکتری ضروری می‌باشند، تحت تأثیر می‌گذارند و به این طریق مرگ سلول باکتری را باعث می‌شوند. بخشی از تفاوت در اثر این پپتیدها به علت اختلاف موجود در پوشش سلولی باکتری‌ها می‌باشد و از آنجا که این پوشش در باکتری‌های گرم مثبت از اجزای کمتری در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی تشکیل شده است، این پپتیدها برای اثر بر باکتری‌های گرم منفی باید قدرت بیشتری داشته باشند (۱۸).

با توجه به حجم‌های انتخاب شده در این تحقیق، زهر خام زنبور عسل دارای اثر آنتی‌باکتریال مؤثرتر از فراکسیون‌های آن در این تحقیق می‌باشد و کاهش چشم‌گیری در ممانعت از رشد باکتری در حجم ۴۵ میکرولیتر در زهر خام و فراکسیون‌های حاصل از آن دیده می‌شود. هم‌چنین دیده شد که اثر حجم در ممانعت از رشد باکتری توسط زهر خام و فراکسیون‌های اول و دوم دارای اهمیت است و در حجم‌های بالاتر میزان بیشتری از ممانعت از رشد باکتری مشاهده می‌شود.

### نتیجه‌گیری

یکی از مکانیسم‌های اثر آنتی‌بیوتیک‌ها، اعمال اثر بر پوشش باکتری می‌باشد. دانشمندان مشخص نمودند که هدف اولیه پپتیدهای آنتی‌باکتریال موجود در زهر غشای سیتوپلاسمی باکتری است. در این بررسی زهر زنبور عسل به دلیل وجود فعالیت‌های آنتی‌باکتریال انتخاب شد و با توجه به روش‌های کروماتوگرافی فراکسیون‌های مختلف در آن خالص‌سازی و جداسازی گردید. با توجه به حجم‌های انتخاب شده، زهر خام زنبور عسل دارای اثر آنتی‌باکتریال مؤثرتر از فراکسیون‌های آن می‌باشد و کاهش چشم‌گیری در ممانعت از رشد باکتری در حجم ۴۵ میکرولیتر در زهر خام و فراکسیون‌های حاصل از آن دیده می‌شود. اثر حجم در ممانعت از رشد باکتری توسط زهر خام و فراکسیون‌های اول و دوم مؤثر است و در حجم‌های بالاتر میزان بیشتری از ممانعت از رشد باکتری مشاهده می‌شود.

کاربردهای زهر به جز در موارد پزشکی، هنوز شناخته شده نیست. استفاده از تزریقات زهر خالص و اثرات نیش در کشورهای غربی به عنوان جایگزین روش دارویی که اغلب همراه با اثرات جانبی متعدد همراه است، افزایش می‌یابد. به همین دلیل، این ماده به طور اختصاصی برای التهاب مفاصل (آرتریت) و دیگر التهابات رماتیسمی استفاده می‌شود (۲). چون زهر زنبور هم تأثیر موضعی و هم عمومی دارد، جایگاه درست تزریقات،

به صورت دخالت در نظم و به هم‌ریختگی غشاء فسفولیپیدی و یا نفوذ به درون سلول پاتوژن از طریق ایجاد کانال‌هایی در غشا مطرح می‌گردد. پایه تمامی این فعالیت‌ها واکنش الکترواستاتیک بین غشاء سلول پاتوژن و پپتیدهای آنتی‌باکتریال می‌باشد.

با توجه به اینکه مقاومت باکتریایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایج در حال افزایش می‌باشد و آمار بیماری و مرگ و میر ناشی از آن قابل ملاحظه است، ایده استفاده از یک آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی (مانند ملیتین) جهت درمان بیماری‌های باکتریایی مطرح گردید. اثرات آنتی‌باکتریال زهر زنبور عسل و فراکسیون‌های حاصل از آن شواهدی را فراهم نمود که مشخص گردید زهر زنبور عسل بر باکتری اشریشیا کولی و سالمونلا تیفی موربوم مؤثر می‌باشد. همچنین زهر خام زنبور عسل و فراکسیون‌های مورد آزمایش در این پژوهش بر روی باکتری‌های *بورخولدريا مالئی*، *بورخولدريا سود مالئی* و *سودوموناس آئروژینوزا* در محیط کشت باکتری اثر نداشت و هیچ‌گونه ممانعت از رشد باکتری در محیط کشت دیده نشد.

با فراکسیون کردن زهر زنبور عسل در این تحقیق و مقایسه آن با سایر تحقیقات انجام گرفته، به نظر می‌رسد که فراکسیون‌های ابتدایی (F1 و F2) شامل ترکیباتی چون ملیتین و فسفولیپاز باشند (۱ و ۸).

در سال ۲۰۱۱ یون و همکارانش با به کار گرفتن ملیتین از پانکراتیت حاد به عنوان یکی از بیماری‌های عفونی جلوگیری کردند. در این مطالعه، ملیتین از زهر زنبور، بدست آمده بود. مرحله اول این تحقیق تست‌های *in vitro* بود تا براساس نتایج آن در مطالعه *in vivo* استفاده گردد. باکتری‌های مورد بررسی، هر کدام نماینده مناسب از دسته گرم مثبت‌ها، گرم منفی‌ها و دسته فرصت طلب‌ها یعنی به ترتیب، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کولی* و *سودوموناس آئروژینوزا* بودند. نتایج بدست آمده نشان داد زهر زنبور عسل (حاوی ملیتین) می‌تواند بر هر سه نوع باکتری بخصوص *اشریشیا کولی* اثر تخریبی داشته باشد و تعداد زیادی از آن‌ها را نابود کند (۲۰). به طور مشابه در تحقیق حاضر نیز ثابت شد که این زهر بر روی ممانعت از رشد باکتری *اشریشیا کولی* تأثیر دارد.

*اشریشیا کولی* به عنوان یک باکتری گرم منفی دارای دو غشاء خارجی و داخلی از جنس فسفولیپید می‌باشد و پیچیدگی زیادی ندارد. به همین دلیل اثر ضدباکتری ملیتین بر آن، بیشتر بوده است. در نگاه اول به نظر می‌رسد که *استافیلوکوکوس اورئوس* از دیگر باکتری‌ها نسبت به ملیتین مقاوم‌تر باشد و دلیل این موضوع می‌تواند وجود لایه‌های پلی‌ساکاریدی با نفوذپذیری کم در اطراف باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* باشد (۱۱).

سازمان بهداشت و همکارانش در سال ۲۰۰۶ بر روی زهر دو حشره (*Rhynocoris catamirus* و *Marginatus brevipennis*) که نوعی آفت غلات محسوب می‌شوند تحقیقاتی انجام دادند. نتایج این بررسی مشخص کرد که زهر این دو حشره دارای اثرات آنتی‌باکتریال می‌باشد و بر روی باکتری‌هایی چون *سالمونلا تیفی موربوم* و *اشریشیا کولی* اثرات قابل توجهی دارد. نتایج این تحقیق با نتایج حاضر هم‌گرایی دارد و تثبیتی بر اثرات آنتی‌باکتریال پپتیدهای موجود در ساختار سموم طبیعی است (۱۹).

همانطور که مشاهده شد هر چه غلظت زهر بیشتر شود اثرات ممانعت از رشد باکتری آن نیز بیشتر می‌گردد. این تأثیر در موارد زیادی به اثبات رسیده است که نتایج آن تأیید کننده اثر سم با غلظت بیشتر آن می‌باشد (۱۶).

- ods. *Int J Curr Microbiol App Sci* 4(4): 141-149.
- 9- Hider, R.C. (1988); Honeybee venom: A rich source of pharmacologically active peptides. *Endeavour* 12(2): 60-65.
- 10- Kuhn-Nentwig, L. (2003); Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cellular and molecular life sciences* 60: 2651-2668.
- 11- Leandro, L.F., Mendes, C.A., Casemiro, L.A., Vinholis, A.H., Cunha, W.R., de Almeida, R., et al. (2015); Antimicrobial activity of apitoxin, melittin and phospholipase A<sub>2</sub> of honey bee (*Apis mellifera*) venom against oral pathogens. *An Acad Bras Cienc* 87(1): 147-155.
- 12- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951); Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- 13- Luo, F., Sun, X., Qu, Z. and Zhang, X. (2016); *Salmonella typhimurium*-induced M1 macrophage polarization is dependent on the bacterial O antigen. *World J Microbiol Biotechnol* 32(2): 22-27.
- 14- Mirshafiey, M. (2007); Venom therapy in multiple sclerosis, A Review. *Neuropharmacology* 53: 353-361.
- 15- Malik, P., Singha, H., Goyal, S.K., Khurana, S.K., Tripathi, B.N., Dutt, A., et al. (2015); Incidence of *Burkholderia mallei* infection among indigenous equines in India. *Vet Rec Open* 24(2): 87-94.
- 16- Nahed, M.A. and Amany, M.H. (2010); Bee Venom-Lead Acetate Toxicity Interaction. *Aust J Basic & Appl Sci* 4(8): 2206-2221.
- 17- Oh, M.H., Park, B.Y., Jo, H., Lee, S., Lee, H., Choi, K.H. and Yoon, Y. (2014); Use of Antimicrobial Food Additives as Potential Dipping Solutions to Control *Pseudomona* spp. Contamination in the Frankfurters and Ham. *Korean J Food Sci Anim Resour* 34(5): 591-596.
- 18- Pimentel, R.B., da Costa, C.A., Albuquerque, P.M., Junior, S.D. (2013); Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manaoensis* and commercial honey. *BMC Complement Altern Med* 1(13): 151-158.
- 19- Sahayaraj, K., Borgio, J.F., Muthukumar, S. and Anandh, P. (2006); Antibacterial activity of *Rhynocoris marginatus* and *Catamirus brevipennis* venoms against human pathogens. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 12: 487-496.
- 20- Yan, L. and Adams, E. (1998); Lycotoxin, antimicrobial peptid from venom of wolf spider *Lycosa carolinensis*. *J Biol Chem* 273: 2059-2064.

نیش ها و دزها خیلی مهم می باشند، چون در موارد درمان نادرست، ممکن است کل بدن دچار تورم، تورم عروقی منتشر، بروز اشکال در تنفس و آنافیلاکسی شدید همراه با شوک و سقوط فشار خون شود. بنابراین، درمان با زهر زنبور باید به طور کامل آموزش داده شود.

### تشکر قدردانی

این مطالعه از نظر مالی توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی مورد حمایت قرار گرفته است. با سپاس فراوان از تمام کارکنان موسسه رازی به ویژه بخش تحقیق و تهیه توپرکولین و مالئین که در این تحقیق ما را یاری کردند.

### منابع مورد استفاده

- 1- Altmann, F., Kubelka, V., Staudacher, E., Uhl, K. and Marz, L. (1991); Characterization of the isoforms of Phospholipase A<sub>2</sub> from honeybee venom. *Insect Biochem* 21(5): 467-472.
- 2- Al Samie Mohamed Ali, M.A. (2012); Studies on bee venom and its medical uses. *International Journal of Advancements in Research & Technology* 1(2): 1-15.i/u/e
- 3- Babaie, M., Zolfagharian, H., Salmanizadeh, H., Mirakabadi, A. Z. and Alizadeh, H. (2013); Isolation and partial purification of anticoagulant fractions from the venom of the Iranian snake *Echis carinatus*. *Acta Biochimica Polonica* 60(1): 17-20.
- 4- Battistuzzi, F.U., Feijao, A. and Hedges, S.B. (2004); A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC Evol Biol* 4: 44-49.
- 5- Boorn, K.L., Khor, Y.Y., Sweetman, E., Tan, F., Heard, T.A. and Hammer, K.A. (2010); Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigona carbonaria* determined by agar diffusion, agar dilution, broth microdilution and time-kill methodology. *J Appl Microbiol* 108(5): 1534-1543.
- 6- Choi, J.H., Jang, A.Y., Lin, S., Lim, S., Kim, D., Park, K., et al. (2015); Melittin, a honeybee venom derived antimicrobial peptide, may target methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Mol Med Rep* 12(5): 6483-6490.
- 7- Dathe, M. and Wieprecht, T. (1999); Structural feature of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim Biophysica Acta* J 1462: 71-87.
- 8- Hegazi, A.G., Feel, M.A., Abdel-Rahman, E.H. Al-Fattah, A.M. (2015); Antibacterial activity of bee venom collected from *Apis mellifera* carniolan pure and hybrid races by two collection meth-

