نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۴ بهار ۱۳۹۶
DOI: 10.22034/vj.2017.107803

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 رفرانس مایکوباکتریوم 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: ۰۶-۱۰-۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: ۲۲-۰۱-۱۳۹۵
Email: zolfagharianh@yahoo.com

چکیده

همزمان با کشـــف و مصرف آنتی بیوتیک‌های جدید، باکتری‌ها نیز واجد ویژگی‌هایی می‌شوند که آنتی بیوتیک‌ها بر آن‌ها بی اثر می‌شوند و مســـئله مقاومت باکتریایی در چنین شرایطی مطرح می‌گردد. زهر جانوران دارای اثرات ضد باکتریائی است که در این میان زهر زنبور عســـل دارای اثرات ضد سرطانی، ضد آرتریت و ضد التهابی می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات زهر خام زنبور عســـل و فراکسیون‌های آن بر روی تعدادی از باکتری‌ها می‌باشد. در این مطالعه اثرات ضد باکتریایی زهر زنبور عســـل گونه *Apis mellifera* و فراکسیون‌های آن بر علیه ۵ گونه باکتری شـــامل *اشریشیا کولی*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *بورخولدریا مالئی*، *بورخولدریا ســـودومالئی* بررسی شد. در این راستا حجم‌های مختلف از زهر خام، همراه با دو فراکســـیون 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 تیفی‌موریوم* اثر مثبت دارد و قطر هاله ممانعت از رشد اطراف دیسک‌ها در غلظت های ۲۵، ۳۵ و ۴۵ میکرولیتر برای *اشریشیا کولی* به ترتیب در حدود ۷، ۱۰ و ۱۴ میلی‌متر و برای ســـالمونلا *تیفی‌موریوم* به ترتیب در حدود ۷، ۹ و ۱۲ میلی‌متر بود. این زهر و فراکسیون‌های آن بر بقیه باکتری‌های مورد آزمایش تأثیری نداشـــت. 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 تیفی‌موریوم*

● 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-arthritic 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 typhyimurium, 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 µl 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 typhyimurium*

مقدمه

عـــدم وجود داروهای مفید و مؤثر بـــرای درمان بیماری‌های عفونی در ســـال‌های قبل از کشـــف آنتی بیوتیک‌ها باعث گســـترش این بیماری‌ها و مرگ و میر بســـیاری از مبتلایان گردید. میـــزان مرگ و میر بیماران مبتلا به عفونت با کشـــف داروهـــای جدید کاهش یافت، اما به مـــرور زمان و با اســـتفاده نادرســـت و بی‌رویه از ایـــن داروها موضـــوع نگران‌کننده‌ای بنام مقاومـــت باکتریایی مطرح گردید (۷). مقاومـــت باکتریایی در باکتری‌هایی نظیر *اشریشیا کولی، سالمونلا، سودوموناس آئروژینوزا و بورخولدریا مالئی* و *بورخولدریا سودومالئی* و ... رو به افزایش می‌باشد.

اشریشـــیا کولی نوعی باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است و رایج‌ترین دلیل بروز عفونت ادراری می‌باشـــد. این باکتری از طریق مسیر مدفوعی-دهانی از یک فرد به فرد دیگر منتقل می‌شـــود. داروهای مختلفی از جمله سفالوســـپورین‌ها در درمـــان عفونت ادراری مورد اســـتفاده قرار می‌گیرد. در ســـال‌های اخیر مقاومت نسبت به سفالوســـپورین‌ها به دلیل تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف از نوع EBSL افزایش یافته است. این باکتری بیشترین حساســـیت را به آنتی بیوتیک‌های نیتروفورانتوئین، آمیکاسین و جنتامایسین دارد (۴).

ســـالمونلا باکتـــری گـــرم منفی اســـت و عامـــل یکی از شـــایع‌ترین مســـمومیت‌های غذایی می‌باشـــد. اعضای خانواده *سالمونلا* از نظر مقاومت در برابر عوامل فیزیکی و شـــیمیایی شـــاخص هســـتند و به سختی نابود

می‌شـوند به طوری که شـکل کلرا سوییس آن شـاخصی برای سنجش کیفیت ضدعفونی‌کننده‌ها می‌باشـند. جدایه‌های *سـالمونلا* به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، حساس هستند (۱۳).

سـودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل بیمـاری‌زای فرصت طلب و از علل شـایع عفونت‌های بیمارستانی می‌باشـد. به رغم داروهای گسترده‌ای که دارای فعالیت ضد سودوموناسی هسـتند، عفونت‌های کشنده‌ای ناشی از ایـن باکتری باعث مرگ و میر در بیماران بسـتری می‌شـود. همچنین این ارگانیسـم به علت افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی خصوصاً بصورت چند داروئی مشـکلات بسـیاری را برای درمان عفونت‌های ناشی از آن‌ها ایجاد کرده اسـت. این باکتری بیشـتر در برابر آنتی‌بیوتیک‌های معمول پایداری می‌کند، ولی برخی گونه‌ها به جنتامایسـین، توبرامایسـین، کولیستین، نورفوکساسین و سیپروفلوکسازین پاسخ می‌دهند (۱۷).

بورخولدریا مالئی (یا *سـودوموناس مالئی*) عامل بیماری بسیار کشنده مشمشه است و از بیماری‌های مشترک انسان و دام است. انسان نیز در زمره جانداران حسـاس به این عامل عفونی است که بیشتر موارد بیماری منجر به مرگ می‌شـود. 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 کشـف داروهای جدیـد و مؤثرتر به منظـور مقابله با مقاومت‌های ایجاد شـده با این باکتری‌ها و کشف داروهای جایگزین منابع طبیعـی مختلفی از جمله پپتیدهای آنتی باکتریـال را مورد آزمایش قرار دادند. این پپتیدها در بدن جانورانی مانند زنبور عسـل و مارها بسرعت و با هزینه متابولیکی پائین سـنتز 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 غشـای خارجی، در مقایسـه 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 رشـد این نوع باکتری‌ها تأثیرگذار باشد. از جمله این تحقیقات استفاده از زهر (پروتئین‌ها و پپتیدهای) زنبور عسـل به عنوان جایگزین مناسب برای آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد (۱۰).

پپتیدهای آنتی‌باکتریال گاهی در مقایسـه با آنتی‌بیوتیک‌های موجود قابلیت بیشتر و سریع‌تری در مقابله با پاتوژن‌های مقاوم نشان داده‌اند. (۶). یکی از منابع طبیعی پپتیدهای آنتی‌باکتریال، زهر جانوران سـمی 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 اسـتفاده در این تحقیق در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های اختصاصـی خود مقاومت نشـان داده‌اند. به همین دلیـل درمان (یا دارو) جایگزین برای کنترل این باکتری‌ها ضروری به نظر می‌رسد. هدف از انجام این مطالعه بررسـی اثرات زهر خام زنبور عسل و فراکسیون‌های آن بر روی باکتری‌های *اشریشیا کولی*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *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 عسـل گونه *Apis mellifera* به صـورت لیوفیلیزه از بخش جانوران سمی موسسه واکسن و سرم سازی رازی تهیه شد و در دمای ۲۰- درجه سـانتی گراد نگهداری گردید. ۵ سویه باکتری شامل *اشریشیا کولی* (25922ATCC)، *سـالمونلا تیفی موریوم* (14028ATCC)، *سـودوموناس آئروژینوزا* (27853ATCC)، *بورخولدریا مالئی* (23344ATCC) و *بورخولدریا سـودومالئی* (23343ATCC)، از موسسـه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شد. سفادکس G-50، از فارماسیا (سوئد) 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 سـنجی 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 سـفادکس G-50 (۲cm ×۱۲۰) به مدت ۷۲ سـاعت در بافر استات آمونیوم ۰/۰۵ میلی‌مولار با pH برابر ۴/۷۵ به تعادل رسـید. ۱۰۰ میلی‌گرم زهر خام زنبور عسـل در ۱ میلی‌لیتر بافر اسـتات آمونیـوم (۰/۰۵ میلی‌مولار با pH برابـر ۴/۷۵) حل گردید. محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۴+ درجه سـانتی‌گراد در g ۲۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. پس از سانتریفیوژ، محلول پروتئینی به تدریج به روی ستون تزریق گردید. بعد از اینکه نمونه به خوبی جذب سـتون شد، شستشوی ستون با بافر ذکر شده انجام شد. محلول خروجی از ستون ژل کروماتوگرافی بوسیله دستگاه جمع‌کننده اتوماتیک با سـرعت جریان ۶۰ میلی لیتر در ساعت جمع‌آوری شـد. جذب نمونه‌های خروجی در ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و منحنی جذب بر حسـب تعداد لوله‌ها رسم گردید. تمامی فراکسیون ها ۲۴ ساعت مقابل ۱۰ حجم آب مقطر دیالیز شـدند 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 حساسـیت باکتری‌ها تسـت دیسـک دیفیـوژن (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 بوسـیله آنس برداشته و در سرم فیزیولوژی استریل حل شد و میزان باکتری موجود در آن با محلول اسـتاندارد مک فارلند نیم تنظیم گردید. تمامی مراحل در زیر لامینار هود انجام گرفت.

بعد از تهیه محلول باکتری، با سـواب اسـتریل محلول هم زده شد و بعد از آبکشـی کردن سواب، به محیط کشت مولر هینتون آگار انتقال داده شد. برای تهیه دیسـک‌های حاوی زهر خام، ابتدا یک میلی گرم زهر خام

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 آنتی بیوگرام 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 باکتریائی فراکسیون‌های حاصل از زهر زنبور عسل پس از ژل کروماتوگرافی تکرار گردید.

برای ارزیابی اثرات ضدباکتریائی 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 آنتی بیوتیک 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.

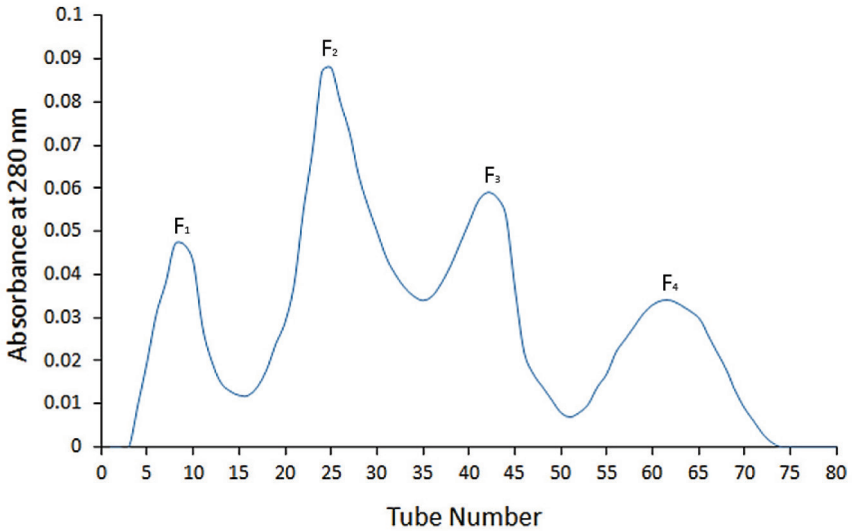
نتایج

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

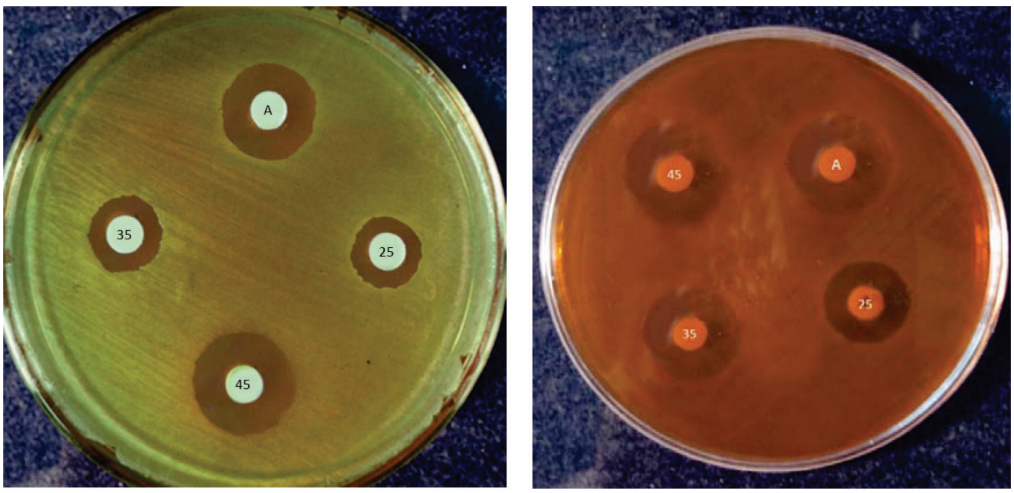
با استفاده از ژل کروماتوگرافی تعداد ۴ پیک (۴ فراکسیون) از زهر زنبور عسل بدست آمد و نمودار مربوط به آن رسم گردید (شکل ۱). این فراکسیون‌ها همراه با زهر خام زنبور عسل برای انجام تست تعیین اثرات آنتی‌باکتریال، به کار برده شدند.

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 تیفی‌موریوم* 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).

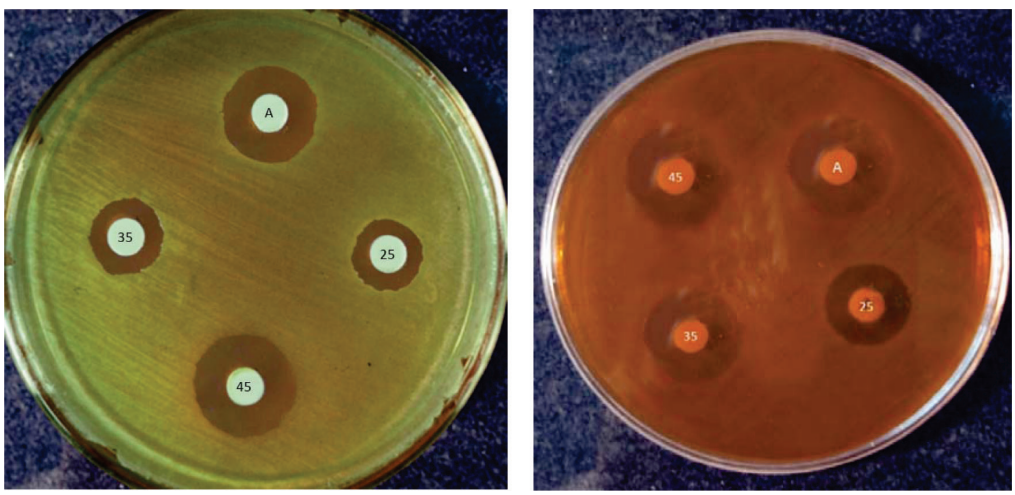
در سه نوع باکتری *بورخولدریا مالئی*، *بورخولدریا سودومالئی* و *سودوموناس آئروژینوزا* در هیچ یک از دو تکرار آزمایش، ممانعت از رشد باکتری در اطراف نمونه‌های آزمایشی در گروه زهر خام و فراکسیون اول و



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 *اشریشیا 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 *بورخولدریا مالئی*، *بورخولدریا سودومالئی* و *سودوموناس آئروژینوزا* 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.

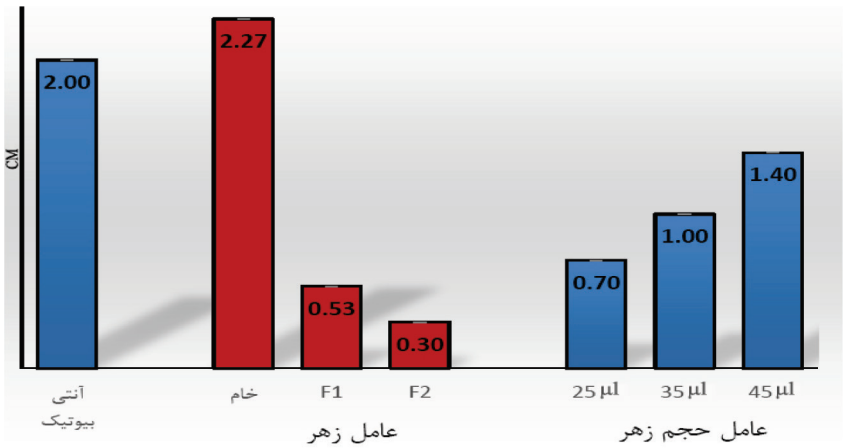
بررسی آماری اثرات متغیر زهر در سه سطح زهر خام، فراکسیون اول و دوم و سه حجم ۲۵، ۳۵ و ۴۵ میکرولیتر بر روی باکتری‌های مورد آزمایش

باکتری‌های *بورخولدریا مالئی*، *بورخولدریا سودومالئی* و *سودوموناس آئروژینوزا*

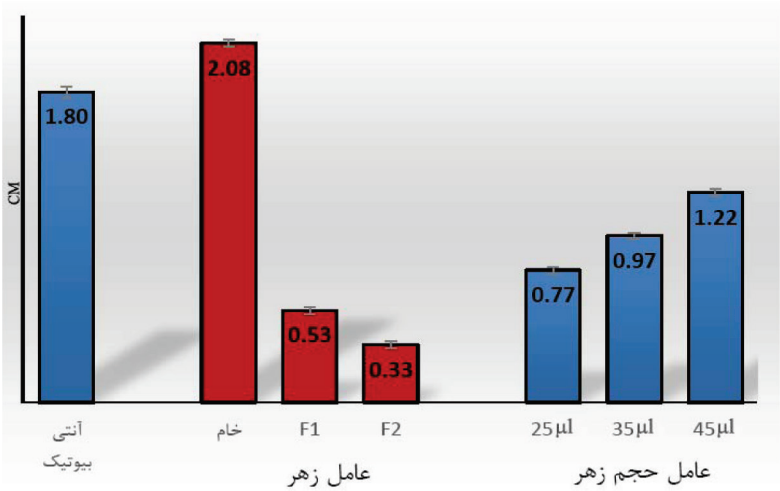
در ایـــن باکتری‌هـــا در اطراف نمونه‌هـــای آزمایشـــی، در هیچ یک از گروه‌های زهر خام و فراکســـیون اول و دوم زهر و همین طور در سه حجم ۲۵، ۳۵ و ۴۵ میکرولیتر، هاله‌ای مشاهده نگردید. با توجه به این‌که صحت اجرا به کمک گروه کنترل مثبت ارزیابی شـــده است، می‌توان گفت که زهر خام زنبور عسل و فراکسیون اول و دوم آن بر روی باکتری *بورخولدریا مالئی* خاصیت آنتی باکتریال ندارد و بیان‌کننده عدم تأثیر هر دو متغیر زهر زنبور عسل در سه سطح مورد بررســـی و همچنین متغیر عامل حجم در هر سه سطح خود بر محیط کشت باکتری است.

باکتری *اشریشیا کولی* و *سالمونلا تیفی موریوم*

آزمون آنالیز واریانس دوراهه برای بررسی تاثیر دو عامل زهر و حجم زهر بر میانگین ممانعت از رشـــد *باکتری اشریشیا کولی* و *سالمونلا تیفی‌موریوم*

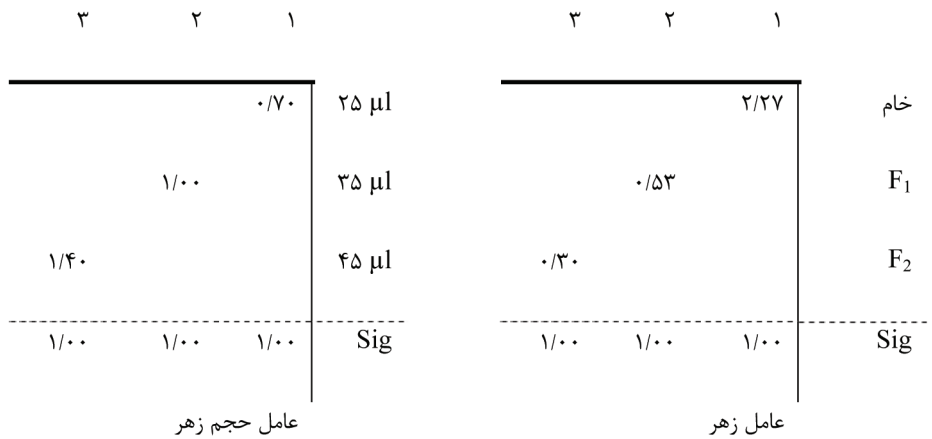


شکل ۵- میانگین حاشیه‌ای ممانعت از رشد باکتری *اشریشیا کولی* در سطوح مختلف عامل زهر و عامل حجم زهر

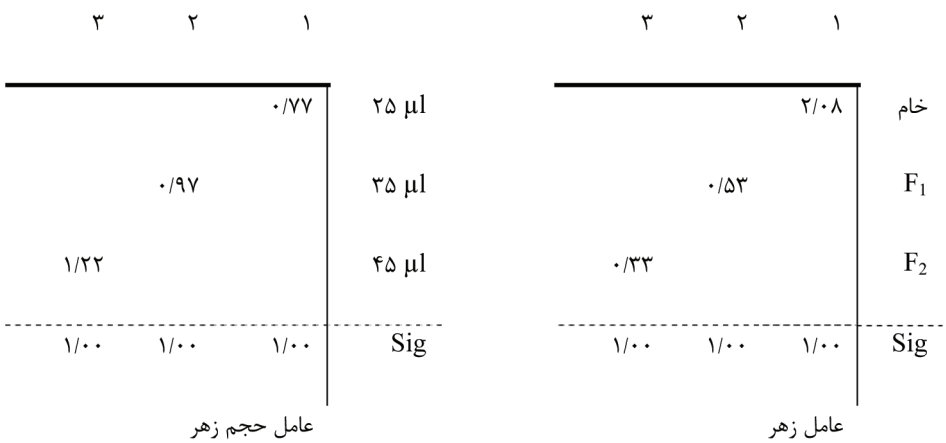


شکل ۶- برآورد میانگین حاشیه‌ای ممانعت از رشد باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* در سطوح مختلف عامل زهر و عامل حجم زهر

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 معنی‌داری اثرات نیستیم. اگر مدل آنالیز واریانس دوطرفه برازش (مناسب‌سازی) 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 می‌شود. در این صورت اثرات اصلی عامل نوع زهر و حجم زهر در سطح P>۰/۰۵ معنی‌دار خواهند بود (شکل ۵ و ۶). بنابراین می‌توان گفت هریک از اثرات اصلی نوع زهر و حجم زهر بر میانگین ممانعت از رشد باکتری در سطح P>۰/۰۵ معنی‌دار است. اگر چه بر اساس مجموع مربعات بدست آمده می‌توان استنباط نمود که نوع زهر نسبت به حجم زهر عامل بسیار مهم‌تری در تغییرات مشاهده شده در متغیر پاسخ است (این عامل برای باکتری اشریشیا کولی ۸۷ درصد کل تغییرات مشاهده شده و برای باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* ۹۳ درصد کل تغییرات مشاهده شده را تبیین می‌کند). از طرفی اثر متقابل نوع زهر و حجم زهر بر میانگین ممانعت از رشد باکتری بسیار ناچیز است (حدود ۴ درصد از کل تغییرپذیری متغیر پاسخ برای باکتری *اشریشیا کولی* و حدود ۲ درصد از کل تغییرپذیری



شکل ۷- نتیجه آزمون تعقیبی دانکن در مورد باکتری *اشریشیا کلی*



شکل ۸- نتیجه آزمون تعقیبی دانکن در مورد باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم*

متغیر پاسخ برای باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* را تبیین می‌کند).

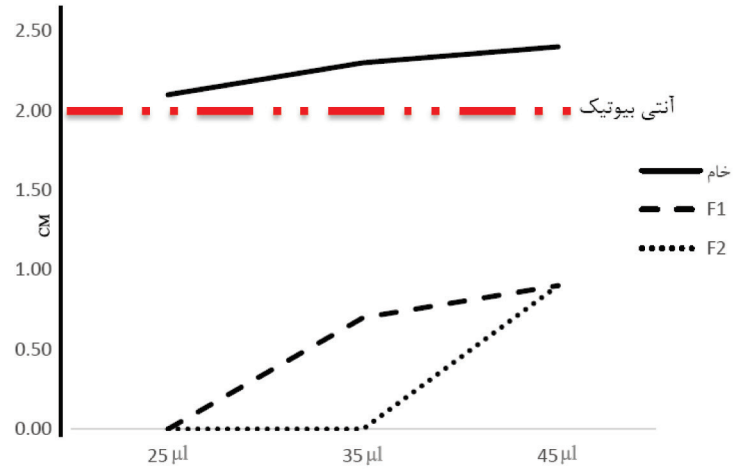
آزمون تعقیبی دانکن برای مقایسه میانگین ممانعت از رشد باکتری در سطوح مختلف هریک از عوامل زهر و حجم زهر برای باکتری‌های *اشریشیا کولی* و *سالمونلا تیفی موریوم* انجام شد و نشان داد که کدام یک از سطوح مختلف نوع زهر و حجم زهر بر میانگین ممانعت از رشد دو باکتری تاثیر معنی‌داری داشته‌اند، که نتایج آن در شکل‌های 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).

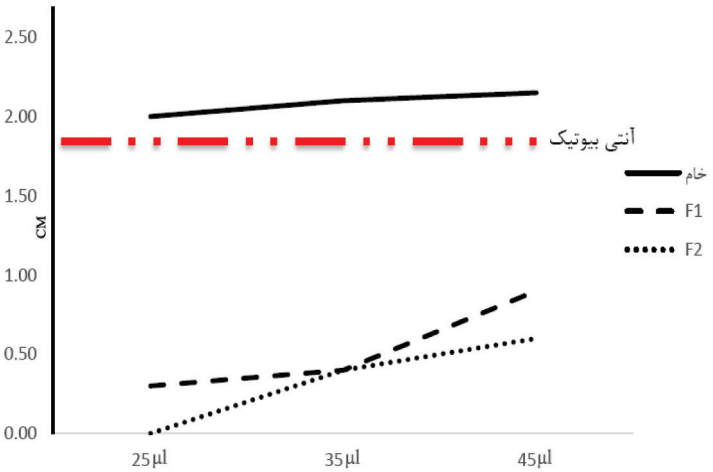
بنابراین با توجه به نتایج بدست‌آمده دو فرض اصلی پژوهش مبنی بر وجود خاصیت آنتی‌باکتریال برای زهر خام و فراکسیون اول و دوم آن در باکتری *اشریشیا کولی* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* تأیید می‌شود. اگرچه زهر خام زنبور عسل دارای بیش‌ترین آنتی‌باکتریال و فراکسیون دوم آن دارای کم‌ترین خاصیت آنتی‌باکتریال است.

بحث

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



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



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

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

با توجه به اینکـه مقاومت باکتریایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایج در حال افزایش می‌باشد و آمار بیماری و مرگ و میر ناشی از آن قابل ملاحظه است، ایده اسـتفاده از یک آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی (مانند ملیتین) جهت درمـان بیماری‌های باکتریایی مطرح گردید. اثرات آنتی‌باکتریال زهر زنبور عسـل و فراکسیون‌های حاصل از آن شـواهدی را فراهم نمود که مشخص گردید زهر زنبور عسـل بر باکتری اشریشیا کولی و سالمونلا تیفی موریوم مؤثر می‌باشد. همچنین زهر خام زنبور عسل و فراکسیون‌های مورد آزمایش در این پژوهـش بر روی باکتری‌های *بورخولدریا مالئی*، *بورخولدریا سـود مالئی* و *سـودوموناس آئروژینوزا* در محیط کشت باکتری اثر نداشت و هیچ گونه ممانعت از رشد باکتری در محیط کشت دیده نشد.

با فراکسیونه کردن زهر زنبور عسل در این تحقیق و مقایسه آن با سایر تحقیقات انجام گرفته، به نظر می‌رسد که فراکسیون‌های ابتدایی (F۱ و F۲) شامل ترکیباتی چون ملیتین و فسفولیپاز باشند (۱ و ۸).

در سـال ۲۰۱۱ یون و همکارانش با به کار گرفتن ملیتین از پانکراتیت حـاد به عنوان یکی از بیماری‌های عفونی جلوگیری کردند. در این مطالعه، ملیتین از زهر زنبور، بدسـت آمده بود. مرحله اول این تحقیق تسـت‌های *in vitro* بـود تا براسـاس نتایـج آن در مطالعه *in vivo* اسـتفاده گردد. باکتری‌های مورد بررسـی، هر کدام نماینده مناسب از دسته گرم مثبت‌ها، گرم منفی‌ها و دسـته فرصـت طلب‌ها یعنی به ترتیب، *اسـتافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشـیا کولی* و *سودوموناس آئروژینوزا* بودند. نتایج بدست آمده نشان داد زهر زنبور عسـل (حاوی ملیتین) می‌تواند بر هر سه نوع باکتری بخصوص *اشریشـیا 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 فسـفولیپید می‌باشد و پیچیدگی زیادی ندارد. به همین دلیل اثر ضدباکتری ملیتین بر آن، بیشـتر بوده اسـت. در نگاه اول به نظر می‌رسـد که *اسـتافیلوکوکس اورئوس* از دیگر باکتری‌ها نسبت به ملیتین مقاوم‌تر باشد و دلیل این موضوع می‌تواند وجود لایه‌های پلی ساکاریدی با نفوذپذیری کم در اطراف باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* باشد (۱۱).

سـاهایاریچ و همکارانـش در سـال ۲۰۰۶ بـر روی زهر دو حشـره (*Rhynocoris catamirus* و *Marginatus brevipennis*) کـه نوعـی آفت غلات محسـوب می‌شوند تحقیقاتی انجام دادند. نتایج این بررسی مشخص کرد که زهر این دو حشـره دارای اثرات آنتی باکتریال می‌باشـد و بر روی باکتری‌هایی چون *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *اشریشیا کولی* اثرات قابل توجهی دارد. نتایج این تحقیق با نتایج حاضر هم‌گرایی دارد و تثبیتی بر اثرات آنتی باکتریال پپتیدهای موجود در ساختار سموم طبیعی است (۱۹).

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

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

از مهم‌ترین مکانیسم‌های اثر آنتی‌بیوتیک‌ها اعمال اثر بر پوشش باکتری می‌باشـد. دانشمندان ضمن مطالعات انجام شده روی زهر از منابع مختلف و متعدد مشـخص نمودند که هدف اولیـه پپتیدهای آنتی‌باکتریال موجود در زهر، غشـاء سیتوپلاسمی باکتری می‌باشـد. 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 می‌باشـند، تحت تاثیر می‌گذارند و به این طریق مرگ سـلول باکتری را باعث می‌شـوند. بخشی از تفـاوت در اثر این پپتیدها به علت اختلاف موجود در پوشـش سـلولی باکتری‌ها می‌باشـد و از آنجا که این پوشـش در باکتری‌های گرم مثبت از اجزای کمتری در مقایسـه با باکتری‌های گرم منفی تشـکیل شده است، این پپتیدها برای اثر بر باکتری‌های گرم منفی باید قدرت بیشـتری 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 فراکسـیون‌های حاصل از آن دیده می‌شود. هم چنین دیده شد که اثر حجم در ممانعت از رشـد باکتری توسط زهر خام و فراکسیون‌های اول و دوم دارای اهمیـت اسـت و در حجم‌های بالاتر میزان بیشـتری از ممانعت از رشد باکتری مشاهده می‌شود.

نتیجه‌گیری

یکی از مکانیسـم‌های اثر آنتی بیوتیک‌ها، اعمال اثر بر پوشش باکتری می‌باشـد. دانشـمندان مشـخص نمودند که هدف اولیه پپتیدهای آنتی باکتریال موجود در زهر غشـای سیتوپلاسمی باکتری است. در این بررسی زهر زنبور عسـل به دلیل وجود فعالیت‌های آنتی باکتریال انتخاب شد و با توجه به روش‌های کروماتوگرافی فراکسیون‌های مختلف در آن خالص‌سازی و جداسـازی گردید. بـا توجه به حجم‌های انتخاب شـده، زهر خام زنبور عسل دارای اثر آنتی‌باکتریال مؤثرتر از فراکسیون‌های آن می‌باشد و کاهش چشـم‌گیری در ممانعت از رشـد باکتری در حجم ۴۵ میکرولیتر در زهر خام و فراکسـیون‌های حاصل از آن دیده می‌شـود. اثـر حجم در ممانعت از رشـد باکتری توسـط زهر خام و فراکسـیون‌های اول و دوم مؤثر است و در حجم‌های بالاتر میزان بیشـتری از ممانعت از رشـد باکتری مشاهده می‌شود.

کاربردهای زهر به جز در موارد پزشـکی، هنوز شـناخته شده نیست. اسـتفاده از تزریقات زهر خالص و اثرات نیش در کشورهای غربی به عنوان جایگزین روش دارویی که اغلب همراه با اثرات جانبی متعدد همراه اسـت، افزایـش می‌یابد. به همین دلیل، این مـاده به طور اختصاصی برای التهاب مفاصل (آرتریت) و دیگر التهابات رماتیسـمی اسـتفاده می‌شود (۲). چون زهـر زنبور هم تأثیر موضعی و هم عمومی دارد، جایگاه درسـت تزریقات،

نیش ها و دزها خیلی مهم می‌باشند، چون در موارد درمان نادرست، ممکن اســت کل بدن دچار تورم، تورم عروقی منتشــر، بروز اشــکال 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 توســط موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی مورد حمایت قرار گرفته اســت. با ســپاس فــراوان از تمام کارکنان موسســه رازی به ویژه بخش تحقیق و تهیه توبرکولین 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 A2 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 methods. *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_2 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 manaosensis* 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.