



Partial Purification and Characterization of Antimicrobial Effects from Snake (*Echis carinatus*), Scorpion (*Mesosobuthus epues*) and Bee (*Apis mellifera*) venoms

Mahdi Babaie^{1,2*} , Aram Ghaem panah¹, Zahra Mehrabi³, Ali Mollaei⁴, Sima Khalilifard Borojeni⁴

1. Young Researchers and Elites Club, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Reference Laboratory of Bovine Tuberculosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.
3. Department of Biology, Faculty of sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
4. Department of Veterinary Aerobic Bacterial Vaccines, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

 [10.30699/ijmm.14.5.450](https://doi.org/10.30699/ijmm.14.5.450)



ABSTRACT

Background: Some venoms and their isolated compounds have been shown to have antibacterial properties. Snake, scorpion and bee venoms are a complex mixture of proteins such as phospholipase and melittin, which have an effect on bacterial growth inhibition. This study aimed to investigate of antibacterial effect of three different venoms against selected bacterial strains.

Materials & Methods: Crude venoms obtained from snake (*Echis carinatus*), scorpion (*Mesosobuthus epues*) and bee (*Apis mellifera*) were selected. The crude venoms from these species was purified by using gel filtration chromatography and the molecular weights of the compounds in these venoms estimated by using SDS-PAGE. The approximate lethal dose values of venoms were determined. Antibacterial activity of venoms against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* were evaluated. Venoms and its isolated fractions and standard antibiotic were tested by using the disc diffusion method.

Results: *E. carinatus* crude venom and fraction 2 were effective against *S. aureus* and *E. coli*. *M. eupeus* crude venom and fraction 1 and 4 were effective against *B. subtilis*. *A. mellifera* crude venom demonstrated antibacterial activity against *E. coli*, *S. aureus* and Fraction 3 of this venom has an inhibition effect for *E. coli* and *S. aureus*.

Conclusion: Snake, scorpion and bee venoms inhibit the growth and survival of bacterial strains and that these venoms can be used as a complementary antimicrobial agent against pathogenic bacteria.

Keywords: *Echis carinatus*, *Mesosobuthus epues*, *Apis mellifera*, antibacterial activity, chromatography, LD₅₀

Received: 2020/01/20; Accepted: 2020/08/18; Published Online: 2020/09/26

Corresponding Information:

Mahdi Babaie, Young Researchers and Elites Club, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
Email: m.babaie@rsvri.ac.ir



Copyright © 2020. This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online



Babaie M, Ghaem panah A, Mehrabi Z, Mollaei A. Partial purification and characterization of antimicrobial effects from snake (*Echis carinatus*), scorpion (*Mesosobuthus epues*) and bee (*Apis mellifera*) venoms. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (5) :460-477

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

Introduction

Infectious diseases have increased in recent years. These diseases are caused by pathogens such as bacteria, viruses, etc. Due to the lack of useful and effective drugs for the treatment of infectious diseases, they have spread worldwide (1). Antibiotic treatment is currently used for bacterial infections. But nowadays, it has been found that the effectiveness of many antibiotics has diminished due to their overuse. This phenomenon is known as antibiotic resistance. Antibiotic resistance is a serious public health problem and this resistance is increasing in today's world. In 2014, the World Health Organization described drug resistance to antibiotics as a "major global threat." (2).

As antimicrobial resistance is spreading throughout the world, the discovery of new substances is mandatory to fight against it. This will cause researchers to conduct more studies on various natural resources in order to discover newer and more effective antibiotics (3). In fact, the vast diversity of bioactive molecules in nature has long inspired scientists in their search for potential therapeutic agents (4).

More recently, there has been a resurgence in the use of antimicrobial peptides due to the decrease in the efficiency of common treatments. Antimicrobial peptides are able to target a broad spectrum of microbes with little resistance and can have a synergistic effect with antibiotics. Animal venom is thus a particularly promising source in this search for new antimicrobial compounds. Many antimicrobial peptides from the venom have shown high efficacy in vitro and in vivo, but challenges to overcome their host toxicity (5, 6), hemolytic activity (7-11), as well as the bioavailability and stability of these peptides are still present.

With more than 100,000 venomous animals, naturally occurring antimicrobial agents present in venomous species, thus hold promises for the development of novel therapeutic agents. Currently, only few antimicrobial agents are present on the market for tropical use (12).

Venoms from some animals, including snakes, scorpions, spiders, bees, etc. can be interesting and powerful alternatives to antibiotics (13). In venoms of these animals, bioactive proteins and peptides are found that have various useful pharmacological properties and are stored in large quantities (14).

One of the important reasons for the effectiveness or ineffectiveness of different animal venoms on various bacterial species is their mechanisms of action on the bacterial cell envelope. Bacterial cytoplasmic membrane is the primary target of the antibacterial peptides in venoms. Antibacterial peptides form channels in the bacterial cell membrane or disrupt phospholipid bilayers of bacterial membrane, thereby influencing its numerous functions that are necessary for the survival of the bacteria and thus cause bacterial cell death. As pointed

out in some of these studies, some of the differences in the effects of these peptides stem from the differences in bacterial cell envelopes. Since these envelopes in Gram-positive bacteria consist of fewer layers compared to Gram-negative bacteria, antibacterial peptides must be more powerful in order to affect Gram-negative bacteria (15).

Today, many studies have been conducted using molecular methods on a variety of antimicrobial peptides and how they work (16-18).

The findings indicate that some of peptides present in the venom of these animals have antimicrobial properties and prevent the growth of pathogens. Antimicrobial peptides have been shown to inhibit the growth of many resistant pathogens. However, many antibiotics do not show such efficacy (19). They can be useful and valuable as pharmacological tools in drug research, as potential drug design templates, and as therapeutic agents (20).

Here we have characterized and investigated antimicrobial effect from Snake (*Echis carinatus*), scorpion (*Mesosobuthus epues*) and bee (*Apis mellifera*) venoms.

Materials and Methods

Bacterial Strains

Four clinical isolates of bacteria, including *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC: 6633) were purchased from the China Center of Type Culture Collection (CCTCC).

Experimental Animals

Animal studies were performed in compliance with the regulations of Razi vaccine and serum research institute (RVSRI), and with generally accepted guidelines governing such works. For this aim, normal male mice, weighing between 25 and 30 g were injected with venoms and investigated.

Other Materials and Equipment

The following Equipment and materials were used for laboratory work; Millipore filter (Biofil 0.45µm, China), Centrifuge (Hermle Z513K, Germany), Freeze dryer (Christ alpha 1-4 lsc, Germany), UV spectrophotometer (UNICO SQ2800, USA), Electric heater (Electrothermal M105, England), Electrophoresis and protein markers (Bio-Rad, USA), Incubator (Memmert, Germany), Sephadex G-50 (Pharmacia, Sweden), and the Standard antibiotic gentamicin (Liofilchem S.r.l, Italy). Other reagents and chemicals were of analytical grade from Merck and Fluka.

Venoms Preparation

Lyophilized crude venom of *Echis carinatus* (Lot No. V8250) and *Apis mellifera* (Lot No. V3375) were purchased (Sigma Aldrich, Germany). Crude venom of *Mesobuthus eupeus* scorpion was obtained by the electrical stimulation at the end of the tail (128 Hz, 20 V). After lyophilization, it was stored at -20°C. The freeze-dried venoms were dissolved in distilled water or a suitable buffer and then venom solutions were centrifuged at 12000 g for 4 mins and the supernatant was collected.

Venoms Purification

Lyophilized crude venoms (200 mg) were dissolved in 4 mL of 0.1 M ammonium acetate buffer (pH 8.6) and the insoluble material was removed by centrifugation (12000 g, 4 min) and filtration. Supernatant was applied to a column of sephadex G-50 (2.5×150 cm) equilibrated with 0.1 M ammonium acetate buffer (pH 8.6). The elution was carried out with the same buffer at a flow rate of 60 mL/h. Volumes of 10 mL were collected and each fraction was identified by UV spectrophotometer (280 nm), mixed and lyophilized (5).

Venoms protein concentration

Protein content in the crude venom was determined by Lowry (6) and Kjeldahl method with some modifications (21). Fourteen mL of distilled water and 2 mL of trichloroacetic acid (100% w/v) was added to 5 mL of protein solution. The solution was mixed and allowed to stand for 5 min and then centrifuged for 10 min at 2000 g. The supernatant liquid was discarded and the residue was dissolved in 0.5 mL of 10 N NaOH. Dissolved residue was adjusted to 25 mL with distilled water. About 0.9 g of K₂SO₄, 0.1 g of CuSO₄ and then 10 mL of dissolved residue was added to Kjeldahl flask. Then 7 mL of sulfuric acid 98% and 1 mL of H₂O₂ 30% was added. The flask was heated to about 80°C for 48 h using an electric heater. After 48 h, the digested solution was cooled and about 10 mL of distilled water was added to the flask. The contents of the flask were poured into the Kjeldahl machine. Subsequently, 25-30 mL of NaOH 10 N was added and distillation was started. The reagent (10 mL of boric acid 4% with four drops of methyl red and methylene blue mixture) was placed under the outlet of the Kjeldahl distiller. One hundred mL of the output solution was titrated with 0.01 N sulfuric acid. The following formula was used to calculate the protein content (mg/mL).

$$\text{Protein volume} = \frac{\text{Titration volume} \times 0.14 \times 25 \times 6.25}{50}$$

Venoms Electrophoresis

Electrophoresis was performed to check the protein profile of the venoms and its quality. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

was performed according to the method of Laemmli with modifications (22). 12% Separating gels and 4% stacking gels were used (the total volume was enough for two gels with 0.75 mm spacer). Glass plates were cleaned with ethanol and casting stand was assembled by following manufacturer's instructions (BioRad, USA). 12% separating gels was prepared by adding the solution (3 mL, 30% Acrylamide/Bis; 1.9 mL 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8); 75 µL 10% SDS; 2.5 mL ddH₂O; 37.5 µL 10% ammonium persulfate; 10 µL TEMED). The solution mixed well and quickly transferred by using pipette to the casting chamber between the glass plates and filled up to about 1.5 cm below the top of longer plate. A layer of distilled ddH₂O was added over the top of the resolving gel to prevent polymerization. After 20 min, once the separating gel has polymerized, the ddH₂O layer was removed by using filter paper. 4% separating gel was prepared by adding the solution (1 mL, 30% Acrylamide/Bis; 1.9 mL 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8); 75 µL 10% SDS; 4.5 mL ddH₂O; 37.5 µL 10% ammonium persulfate; 10 µL TEMED). The solution mixed well and quickly transferred by using a pipette until the space was full, and then the comb was inserted to the top of the spacers. After 20 min, once the separating gel has polymerized, the comb carefully removed. The gel cassette from the casting stand was removed and the clamping frame was put into the electrophoresis tank (the short plate was placed on the inside). Running buffer 1X (3 g Tris-Base; 14.4 g Glycine; 1 g SDS; 990 mL ddH₂O) was poured into the electrophoresis tank. 25 µL of the sample buffer (10 mL 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8); 5 mL glycerol; 1 g SDS, 2 mL 2-mercaptoethanol; 1 mL 1% bromophenol blue; 1 mL ddH₂O) was added to 75 µL protein samples (0.5-1.5 mg/mL). Protein samples heated for 10 min in a boiling water bath and then centrifuged at 13000 rpm for 60 S. 15 µL of each protein samples were then loaded onto each gel well as well as load 10 µL of protein MW marker and electrophoresis was carried out at a constant voltage (100 V, 2 h). The gel was fixed with 5% acetic acid overnight and stained for 2 h in 0.25% Coomassie blue R-250 in 25% acetic acid solution. Distaining was carried out in a solution containing 30% methanol and 10% acetic acid, until the background became clear.

Lethal Dose of Venoms

Lethal dose (LD₅₀) of venoms, which is equivalent to death in 50% of mice within 24 h after venom injection, was determined by Spearman-Kärber Finney methods (23). One mg/mL stock of each venom was prepared and centrifuged for 5 min at 10000 g and then filtered. Thirty NIH mice (25-30 g) were selected. The mice were maintained at an appropriate temperature (23±2°C) with free access to water and food. Five groups of mice were treated with different doses of venom (1, 1.5, 2, 2.5, 3 mg/kg) and normal saline was injected into a control group.

Antibacterial Effects of Venoms

Lyophilized crude venoms (25, 50, 75, 100 µg) and its fractions dissolved in 1 mL of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), were filtered using 0.22 µm syringe filter and stored at 4°C for the assay. Antibacterial susceptibility tests were performed by the disc diffusion assays (19). First, to prepare the disks, different concentrations of venoms were poured onto blank discs and it took 3 h for the discs to dry completely. Then plates containing Mueller Hinton Agar were cultured with a swab soaked in a bacterial suspension equivalent to half a McFarland and the prepared discs were placed on the surface of the plate. The plates were incubated for 24 h at 37°C. Then, the effects of different concentrations of venoms on bacteria were investigated. In this experiment, gentamicin antibiotic disc (10 µg/disk) was used as a positive control.

Statistical Analysis

Means and standard deviations of the zone inhibition data were collected and calculated using Microsoft Excel. Student's t-test was used to determine statistical significance. P -value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

The protein content was improved in the antibacterial active crude venoms of *E. carinatus* (1.7 mg/mL), *M. eupeus* (1.2 mg/mL), *A. mellifera* (0.4 mg/mL), respectively. Electrophoresis revealed that the range of *E. carinatus* proteins was distributed in

the light, medium and heavy molecular weight; However, most *M. eupeus* venom proteins were in the average molecular weight range and proteins of *A. mellifera* venom was in the light molecular range (Figure 1).

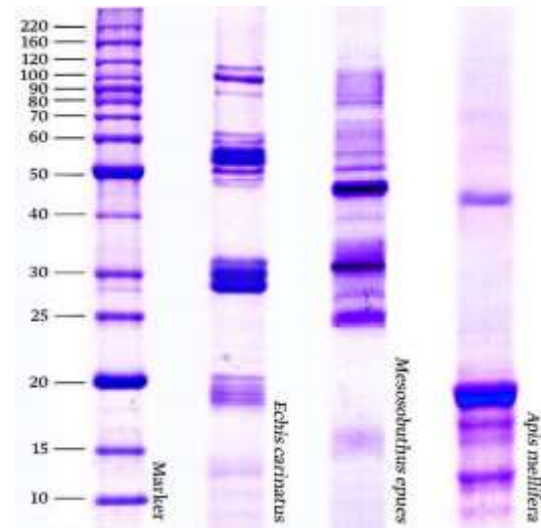


Figure 1. SDS-PAGE profile of *E. carinatus*, *M. eupeus* and *A. mellifera* crude venoms

Chromatography showed that *E. carinatus* and *A. mellifera* had three fractions (Figures 2 and 4) and *M. eupeus* had four fractions (Figure 3).

The numbers of dead mice within 24 h were recorded for each venom. After the registration of deaths, the LD₅₀ of each venom was determined, which are as follows:

$$E. carinatus > M. eupeus > A. mellifera \\ 11.1 > 46 > 177.8 \text{ } \mu\text{g}/\text{mouse}$$

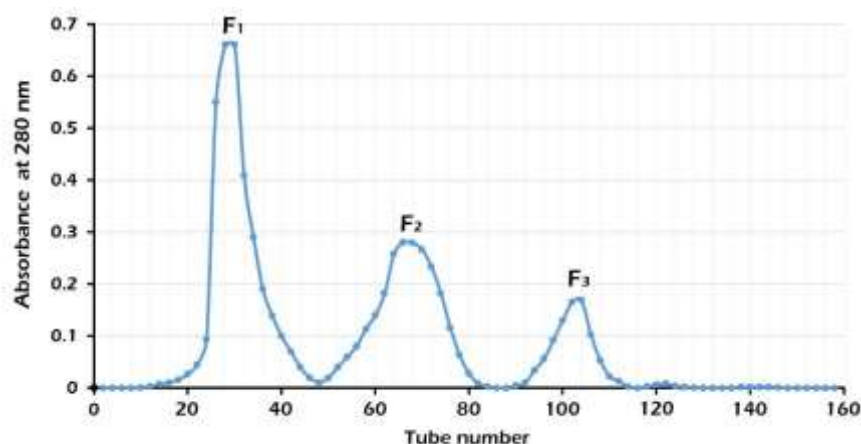
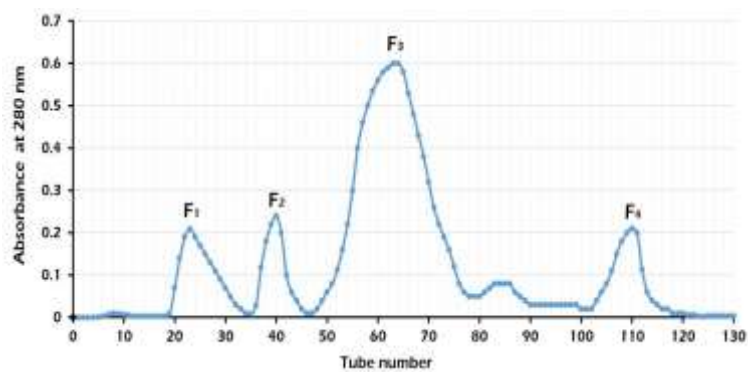
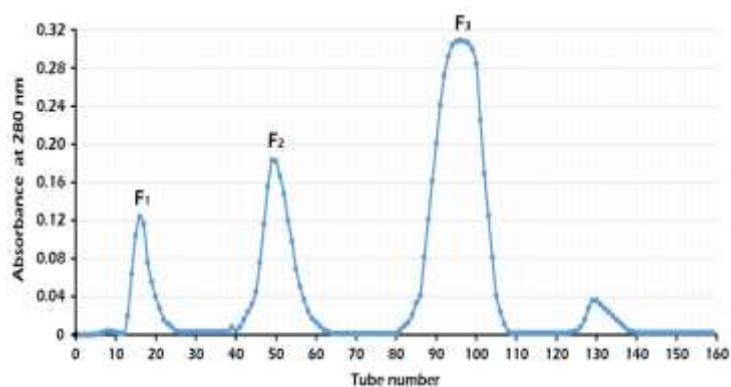
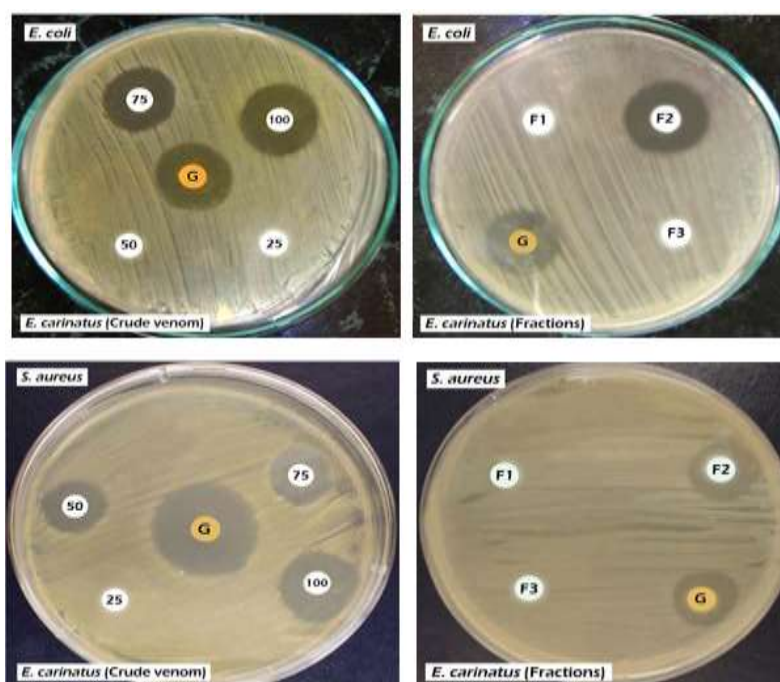


Figure 2. *E. carinatus* venom chromatogram

Figure 3. *M. eupeus* venom chromatogramFigure 4. *A. mellifera* venom chromatogram

E. carinatus crude venom and its fractions has shown no antibacterial effects against *P. aeruginosa* and *B. subtilis*. In contrast, the crude venom was effective against *S. aureus* (50, 75 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and *E. coli* (75 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). In addition, F₂ was effective against *S.*

aureus and *E. coli*. However, standard antibiotics were shown to be effective against all bacteria (Figure 5 and Table 1). The examination showed that the antibacterial activity of F₂ against *E. coli* was more significant than it was for the gentamicin at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 5).

Figure 5. Antibacterial effect of *E. carinatus* crude venoms and fractions against *E. coli* and *S. aureus*

M. eupeus crude venom and its fractions has shown no antibacterial effects against *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *E. coli*. In contrast, *M. eupeus* crude venom was effective against *B. subtilis* (50, 75 and 100 µg/mL). In addition, F₁ and F₄ was effective against *B. subtilis*. However, the standard antibiotic gentamicin was

effective against those bacteria (Figure 6 and Table 1). The examination showed that the antibacterial activity of *M. eupeus* crude venom (at the 75 and 100 µg/mL concentrations) and F₁ and F₄ against *B. subtilis* were more significant than it was for the standard antibiotic gentamicin at 10 µg/mL (Figure 6).

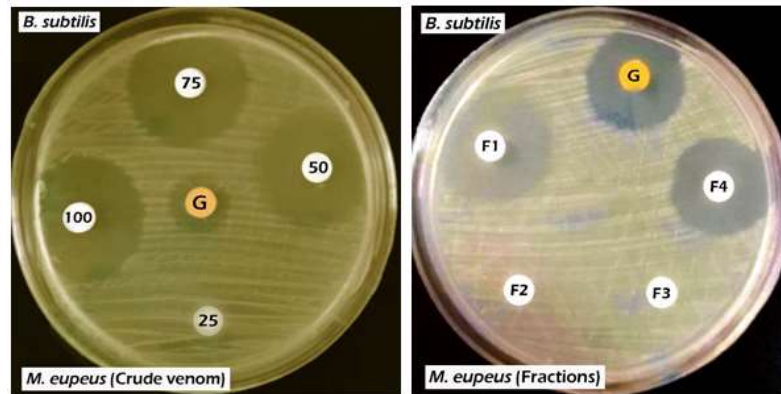


Figure 6. Antibacterial effect of *M. eupeus* crude venoms and fractions against *B. subtilis*

A. mellifera venom demonstrated antibacterial activity against *Escherichia coli*, *S. aureus* at all four concentrations. Moreover, with increasing *A. mellifera* venom concentration, the inhibition zone increased. Fraction 3 (F₃) of *A. mellifera* crude venom have inhibition effect for *E. coli* and *S. aureus* (Figure 7).

The venom concentration of 100 µg/mL showed the highest inhibition zone against *E. coli* (29.06±1.31 mm) and *S. aureus* (17.51±1.07 mm) (Table 1). *A. mellifera* crude venom and F₃ had a more significant antibacterial activity against *E. coli* in the medium than it did against either of the three other strains of bacteria.

The present examination also showed that the antibacterial activity of *A. mellifera* crude venom at the 100 µg/mL concentrations against *E. coli* and *S. aureus* was more significant than it was for the standard antibiotic gentamicin at 10 µg/mL (Figure 7). However, the antibacterial activities of *A. mellifera* crude venom against *S. aureus* (25 and 75 µg/mL) and *E. coli* (25 and 50 µg/mL) were less than the effect of the standard antibiotic gentamicin at 10 µg/mL (Figure 7). Furthermore, *A. mellifera* crude venom and its fractions was found to have no observable effect on the *P. aeruginosa* and *B. subtilis* whereas the standard antibiotic gentamicin was effective against those bacteria (Table 1).

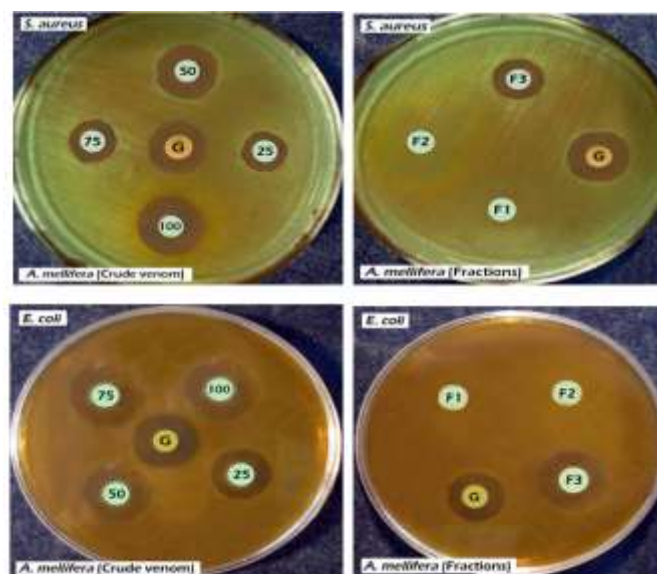


Figure 7. Antibacterial effect of *A. mellifera* crude venoms and fractions against *E. coli* and *S. aureus*

Table 1. Values of growth inhibition zones due to crude venom and their fractions of *E. carinatus*, *M. eupeus* and *A. mellifera* for bacterial strains

Venoms		Bacterial strains	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>Echis carinatus</i>	Crude venom µg/mL	25	----	----	----	----
		50	12.92 ± 1.03	----	----	----
		75	15.21 ± 1.56	----	21.08 ± 0.13	----
		100	22.65 ± 2.1	----	23.91 ± 0.13	----
	Gentamicin		25.65 ± 1.64	21.08 ± 1.08	22.11 ± 0.22	19.21 ± 0.97
	Fractions	F ₁	----	----	----	----
		F ₂	17.2 ± 1.42	----	24.11 ± 0.98	----
		F ₃	----	----	----	----
	Gentamicin		16.1 ± 0.98	19.11 ± 1.06	22.54 ± 1.04	18.83 ± 1.17
	<i>Mesobuthus eupeus</i>	Crude venom µg/mL	25	----	----	----
50			----	----	----	29.20 ± 0.88
75			----	----	----	29.41 ± 0.81
100			----	----	----	30.83 ± 1.04
Gentamicin		17.03 ± 0.81	11 ± 0.44	20 ± 0.22	4.22 ± 0.83	
Fractions		F ₁	----	----	----	29.3 ± 0.96
		F ₂	----	----	----	----
		F ₃	----	----	----	----
		F ₄	----	----	----	26.4 ± 0.49
Gentamicin		20.4 ± 0.19	31.1 ± 1.07	16.5 ± 0.39	25.8 ± 1.02	
<i>Apis mellifera</i>	Crude venom µg/mL	25	8.1 ± 0.76	----	20.06 ± 1.50	----
		50	13.2 ± 0.87	----	25.30 ± 1.02	----
		75	9.2 ± 0.98	----	28.31 ± 0.67	----
		100	17.51 ± 1.07	----	29.06 ± 1.31	----
	Gentamicin		11.3 ± 0.47	19.17 ± 0.21	26.11 ± 0.74	9.19 ± 0.08
	Fractions	F ₁	----	----	----	----
		F ₂	----	----	----	----
		F ₃	8.91 ± 1.12	----	29.51 ± 1.41	----
	Gentamicin		13.7 ± 0.89	16.5 ± 0.47	24.36 ± 1.09	9.8 ± 0.29

Discussion

The venom of animals such as scorpions, snakes and bees can prevent the growth of microorganisms. For example, scorpions spray their venom on own bodies to prevent the growth of bacteria and fungi (24). In general, the venom of these animals is a good source for pharmaceutical compounds (25). Although some of venoms and compounds derived from them have antibacterial properties, most of them have not been studied for such activities.

The present study provides evidence that venoms of different animals have antibacterial effects against bacteria. Among the venoms examined, those from snake (*E. carinatus*), scorpion (*M. eupeus*) and bee (*A. mellifera*) showed strong antimicrobial effects. These venoms exhibited greater zones of inhibition, equivalent to that shown by the gentamicin.

With respect to venoms in current study, *A. mellifera* was the most effective against the two microorganisms, among the venoms examined. All

concentrations of *A. mellifera* venom showed strong antimicrobial effects against *S. aureus* and *E. coli*. Venoms of *E. carinatus* and *M. eupeus* have got medium effects, presenting only three significant venom concentrations.

Compared with the *M. eupeus* venom, which was more specific against *B. subtilis*, the *A. mellifera* and *E. carinatus* venoms, on the other hand, exhibited a broader spectrum of antibacterial activity.

A strong activity was shown against *B. subtilis* by the *M. eupeus* venom, while venoms of *A. mellifera* (25 and 75 µg/mL) and *E. carinatus* (50 and 75 µg/mL) exhibited only a weaker activity against *S. aureus*. With respect to microorganism susceptibility, The Gram-positive cocci *S. aureus* bacterium appeared to be the most sensitive to venoms. In contrast, the venoms had no effect on *P. aeruginosa*. The results were consistent with Perumal Samy *et al.* (26). Previously, snake venoms were reported to exhibit a strong inhibitory effect against *P. aeruginosa* (27, 28).

The antibacterial effect of the venom derived from scorpions has been demonstrated in various studies. In a study by Zhao *et al.* in 2009 on antibacterial effect of the Chinese scorpion *Isometrus maculates*, it was found that the venom of this scorpion had an inhibitory effect on the growth of Gram-positive bacteria but no effect on Gram-negative bacteria *P. aeruginosa* and *E. coli*. A comparison of the results of this study with those of the present one suggests that the mechanism of the antibacterial effect of the Chinese scorpion venom is similar to that of the Iranian scorpion venom (29).

In this study, *M. eupeus* crude venom was effective against *B. subtilis* showed zone of inhibition 30 mm. These results are similar to spider venom activity reported by Benli and Yigit (30) and Ahmad *et al.* (31).

In 2009, in a study on different sources of animal venoms, various species of snakes including *Bothrops jararaca*, *Bothrops moojeni* and *Bothrops jararacussu*

were studied for their antibacterial effects. *B. jararaca* had the strongest antibacterial effect on *S. aureus* (32).

Jami al ahmadi reported that, *E. carinatus* venom has not a wide spectrum antibacterial effect against the mentioned bacteria, although a significant activity against *S. aureus* in comparison with the standard antibiotics has been observed (33).

A study of antibacterial effect of honey bee venom on several bacteria species in 2016 reported that it had a considerable inhibitory effect on *P. aeruginosa* and *E. coli* (19). In the present study, bee venom was exhibited a strong inhibitory effect against *E. coli*. While in the present study, no antimicrobial activity of bee venom against *P. aeruginosa* was observed.

Conclusion

Finally, it should be noted that comparison of the antibacterial effects of the venoms with gentamicin suggested that these venoms had stronger inhibitory effects. However, this comparison was a laboratory estimation carried out without a formulation. Therefore, the results obtained in the preliminary stage seem to be valuable. The results of this study indicate that the use of these venoms, especially associated proteins and peptides has promising results. Further research in the future on other bacterial species and on animal models may allow industrial introduction of these venoms into the pharmaceutical market and help solve the drug resistance problem when treating bacterial infections.

Acknowledgment

The authors thank all those who helped them for this research.

Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.



خالص‌سازی نسبی و تعیین خصوصیات اثرات ضد میکروبی زهر مار (*Echis carinatus*)، عقرب (*Mesosobuthus epues*) و زنبور عسل (*Apis mellifera*)

مهدی بابائی^{۱*}، آرام قائم پناه^۱، زهرا مهرابی^۲، علی ملایی^۴، سیما خلیلی فرد بروجنی^۴

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، تهران، ایران
۲. آزمایشگاه فرانس سل گاوی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، تهران، ایران
۳. بخش زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
۴. واکسن‌های باکتریایی هوازی دامپزشکی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: نشان داده شده است که برخی از زهرها و ترکیبات جدا شده از آنها دارای خاصیت ضد باکتریایی هستند. زهر مار، عقرب و زنبور عسل ترکیبی از پروتئین‌ها مانند فسفولیپاز و ملیتین هستند که در مهار رشد باکتری‌ها تأثیر دارند. این مطالعه با هدف بررسی اثر ضد باکتریایی سه زهر مختلف در برابر سویه‌های باکتریایی منتخب انجام شد.

مواد و روش کار: زهر خام حاصل از مار (*Echis carinatus*)، عقرب (*Mesosobuthus epues*) و زنبور عسل (*Apis mellifera*) انتخاب شدند. خالص‌سازی زهر خام این گونه‌ها با استفاده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون انجام گرفت و وزن مولکولی ترکیبات موجود در این زهرها با استفاده از SDS-PAGE برآورد شد. مقدار تقریبی دز کشندگی زهرها مشخص شد. فعالیت ضد باکتریایی زهرها در برابر استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس، سودوموناس آئروژینوزا و اشریشیا کلی مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از روش انتشار دیسک، زهرها و فراکسیون‌های جدا شده آن و آنتی‌بیوتیک استاندارد مورد آزمایش قرار گرفتند.

یافته‌ها: زهر خام *E. carinatus* و فراکسیون دوم آن در برابر استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی مؤثر بودند. زهر خام *M. eupeus* و فراکسیون اول و چهارم آن در برابر باسیلوس سوبتیلیس مؤثر بودند. زهر خام *A. mellifera* در برابر اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس فعالیت ضد باکتریایی را نشان داد و فراکسیون سوم از این زهر اثر مهاری برای اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس دارد.

نتیجه‌گیری: زهر مار، عقرب و زنبور عسل مانع رشد و بقاء سویه‌های باکتریایی می‌شوند و این زهرها می‌توانند به‌عنوان یک ماده ضد میکروبی مکمل در برابر باکتری‌های بیماری‌زا مورد استفاده قرار گیرند.

کلید واژه‌ها: *Apis mellifera*، *Mesosobuthus epues*، *Echis carinatus*، فعالیت ضد باکتریایی، کروماتوگرافی، LD₅₀

کپی‌رایت © مجله میکروبی‌شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۳۰

پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۲۸

انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۰۷/۰۶

موضوع: مواد ضد میکروبی

نویسنده مسئول:

مهدی بابائی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، تهران، ایران
ایمیل: m.babaie@rvsri.ac.ir

مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل مصرف بیش از حد آنها کاهش یافته است. این پدیده به مقاومت آنتی‌بیوتیکی معروف است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی که در دنیای امروز رو به افزایش است به‌عنوان مشکل جدی بهداشت عمومی مطرح است و در سال ۲۰۱۴، سازمان بهداشت جهانی مقاومت دارویی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها را یک "تهدید بزرگ جهانی" توصیف کرد (۲).

بیماری‌های عفونی که در اثر عوامل بیماری‌زایی مانند باکتری‌ها، ویروس‌ها و غیره ایجاد می‌شوند، در سال‌های اخیر افزایش یافته است. به دلیل کمبود داروهای مفید و مؤثر برای درمان بیماری‌های عفونی، این بیماری‌ها در سراسر جهان در حال گسترش است (۱).

در حال حاضر درمان آنتی‌بیوتیکی برای عفونت‌های باکتریایی استفاده می‌شود، اما امروزه مشخص شده است که اثر بسیاری از

امروزه مطالعات بسیاری با استفاده از روش‌های مولکولی بر روی انواع پپتیدهای ضد میکروبی و نحوه عملکرد آنها انجام شده است (۱۶-۱۸). یافته‌ها نشان می‌دهد که برخی از پپتیدهای موجود در زهر این حیوانات دارای خواص ضد میکروبی است و از رشد عوامل بیماری‌زا جلوگیری می‌کنند، در حالی که بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها چنین اثربخشی نشان نمی‌دهند (۱۹). این زهرها و پپتیدهای موجود در آن، می‌توانند به‌عنوان ابزارهای دارویی در تحقیقات دارویی، به‌عنوان الگوهایی جهت ساخت داروهای بالقوه برای درمان، مفید و با ارزش باشند (۲۰).

در این مطالعه اثر ضد میکروبی زهر مار (*Echis carinatus*)، عقرب (*Mesosobothus epos*) و زنبور (*Apis mellifera*) بررسی شد.

روش پژوهش

سویه‌های باکتری، حیوانات آزمایشگاهی و سایر مواد

چهار سویه استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923)، سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 27853)، اشریشیا کلی O157: H7 (ATCC 25923) و باسیلوس سوبتیلیس (ATCC: 6633) برای بررسی میکروبی انتخاب شدند. جهت مطالعات درون‌تنی، از موش‌های نر با وزن ۲۵ تا ۳۰ g استفاده شد. سایر مواد و وسایل مورد استفاده در این تحقیق از برندهای معروف و مناسب آزمایشگاهی و شیمیایی انتخاب شدند (که در متن انگلیسی نام آنها آورده شده است).

آماده‌سازی زهرها

زهر خام لیوفیلیزه شده (*Echis carinatus* Lot No. V8250) و *Apis mellifera* (Lot No. V3375) (سیگما، آلمان) خریداری شد. زهر خام عقرب *Mesobuthus eupeus* با تحریک الکتریکی در انتهای دم (۱۲۸ Hz، ۲۰ V) به‌دست آمد. زهر پس از لیوفیلیزاسیون، در دمای ۲۰°C نگهداری شد. در هنگام استفاده، زهرهای لیوفیلیزه شده در آب مقطر یا بافر مناسب حل شدند و سانتریفیوژ محلول زهرها (۱۲۰۰۰ g، ۴ min) انجام گرفت و مایع رویی جمع‌آوری شد.

خالص‌سازی زهرها

زهرهای خام لیوفیلیزه (۲۰۰ mg) در ۴ mL بافر استات آمونیوم ۰/۱ M (pH ۸/۶) حل شدند. مواد غیر محلول با استفاده از سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ g، ۴ min) حذف گردیدند و سپس زهرهای محلول، فیلتر شدند. مایع رویی فیلتر شده به ستون سفادکس G-50 (۲/۵×۱۵۰ cm) که با بافر استات آمونیوم ۰/۱ M (pH ۸/۶)

با گسترش مقاومت ضد میکروبی در سراسر جهان، کشف مواد جدید برای مبارزه با آن الزامی است. این امر باعث می‌شود تا محققان مطالعات بیشتری در زمینه منابع طبیعی مختلف انجام دهند تا آنتی‌بیوتیک‌های جدید و مؤثرتری را کشف کنند (۳). در حقیقت، تنوع گسترده‌ای از مولکول‌های فعال زیستی در طبیعت، دانشمندان را از مدت‌ها قبل برای جستجوی عوامل درمانی بالقوه ترغیب کرده است (۴).

اخیراً، استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی، به دلیل کاهش کارایی روش‌های درمانی رایج دوباره مورد توجه قرار گرفته است. پپتیدهای ضد میکروبی با ایجاد مقاومت کم، قادر به مبارزه با طیف گسترده‌ای از میکروب‌ها هستند و می‌توانند همراه با آنتی‌بیوتیک‌ها اثر هم‌افزایی در مقابل عوامل میکروبی داشته باشند. سم حیوانات یک منبع مناسب در زمینه جستجوی ترکیبات ضد میکروبی جدید می‌باشد. بسیاری از پپتیدهای ضد میکروبی ناشی از زهر اثربخشی بالایی در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی نشان داده‌اند، اما سمیت آنها برای میزبان (۵،۶)، فعالیت همولیتیک (۷-۱۱) و همچنین فراهم‌آوری زیستی و پایداری این پپتیدها هنوز هم چالش برانگیز است.

زهر حیواناتی مانند مار، عقرب، عنکبوت، زنبور و غیره می‌تواند جایگزین جالب و قدرتمندی برای آنتی‌بیوتیک‌ها باشد (۱۳). در زهر این حیوانات پروتئین‌های فعال زیستی و پپتیدهایی یافت می‌شوند که دارای خواص دارویی مفیدی هستند و در مقادیر زیادی نیز ذخیره می‌شوند (۱۴).

از دلایل مهم برای اثربخشی یا ناکارآمدی زهر حیوانات بر روی گونه‌های مختلف باکتری، مکانیسم عملکرد این زهرها روی دیواره سلول‌های باکتریایی است. غشاء سیتوپلاسمی باکتری‌ها هدف اصلی پپتیدهای ضد باکتریایی زهرها هستند. این پپتیدها، کانال‌هایی را در غشاء سلول باکتری ایجاد می‌کنند و باعث از بین رفتن دو لایه فسفولیپیدی غشاء باکتریایی می‌شوند و از این طریق عملکردهایی که برای بقای باکتری‌ها ضروری هستند را تحت تأثیر قرار می‌دهند و در نتیجه موجب مرگ سلول‌های باکتریایی می‌شوند. همان‌طور که در برخی از مطالعات اشاره شده است، مقدار تأثیرگذاری این پپتیدها ناشی از اختلاف دیواره (غشاء) سلول‌های باکتریایی است. از آنجا که دیواره سلولی در باکتری‌های گرم مثبت دارای لایه‌های کمتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی است، برای موثر بودن این پپتیدها بر باکتری‌های گرم منفی باید پپتیدهای ضد باکتریایی قدرتمندتری استفاده شود (۱۵).

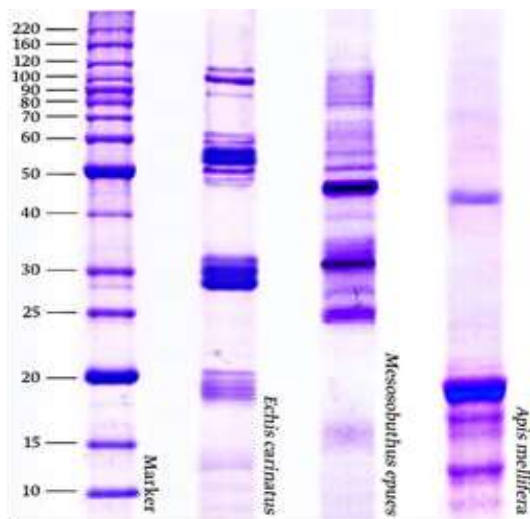
از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین ($10 \mu\text{g}/\text{disk}$) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

میانگین و انحراف معیار داده‌ها بدست آمده از ناحیه مهار با استفاده از نرم افزار اکسل جمع آوری و محاسبه گردید. برای تعیین اهمیت آماری، آزمون t-test مورد استفاده قرار گرفت و مقادیر $P\text{-value} < 0/05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میزان پروتئین در زهرهای خام به ترتیب برای *E. carinatus* ($1/7 \text{ mg/mL}$)، *M. eupeus* ($1/2 \text{ mg/mL}$)، *A. mellifera* ($0/4$) بدست آمد. الکتروفورز نشان داد که محدوده پروتئین‌های *E. carinatus* در وزن مولکولی سبک، متوسط و سنگین توزیع شده است. با این حال، بیشتر پروتئین‌های زهر *M. eupeus* در محدوده وزن مولکولی متوسط و پروتئین‌های زهر *A. mellifera* در محدوده وزن مولکولی سبک قرار داشتند (شکل ۱).



شکل ۱. پروفایل SDS-PAGE برای زهرهای خام *E. carinatus*، *M. eupeus* و *A. mellifera*

کروماتوگرافی نشان داد که *E. carinatus* و *A. mellifera* دارای سه فراکسیون است (شکل ۲ و ۴) و *M. eupeus* چهار فراکسیون دارد (شکل ۳). تعداد موش‌های مرده طی ۲۴ ساعت برای هر زهر ثبت شد. پس از ثبت مرگ و میر، LD_{50} هر زهر تعیین شد و به شرح زیر به‌دست آمد:

$$E. carinatus > M. eupeus > A. mellifera$$

$$11.1 > 46 > 177.8 \mu\text{g}/\text{mouse}$$

به تعادل رسیده بود، تزریق گردید. شستشو با همان بافر با سرعت جریان 60 mL/h انجام گرفت. هر فراکسیون با حجمی در حدود 10 mL جمع‌آوری شد و توسط اسپکتروفتومتر (280 nm) طیف سنجی گردید. فراکسیون‌های نزدیک به هم مخلوط و لیوفیلیزه شدند (۵).

غلظت پروتئین زهرها

میزان پروتئین موجود در زهرهای خام با استفاده از روش پروتئین سنجی Lowry (۶) و Kjeldahl (۲۱) اندازه‌گیری شد.

الکتروفورز زهرها

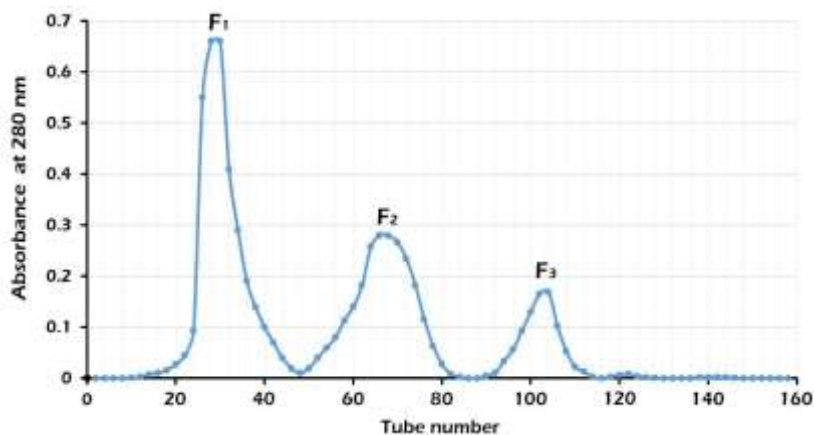
برای بررسی پروفایل پروتئینی زهرها و کیفیت آن، از الکتروفورز استفاده شد. الکتروفورز ژل پلی‌آکریل آمید (SDS-PAGE) طبق روش Laemmli با اعمال برخی اصلاحات انجام گرفت (۲۲).

دُز کشندگی زهرها

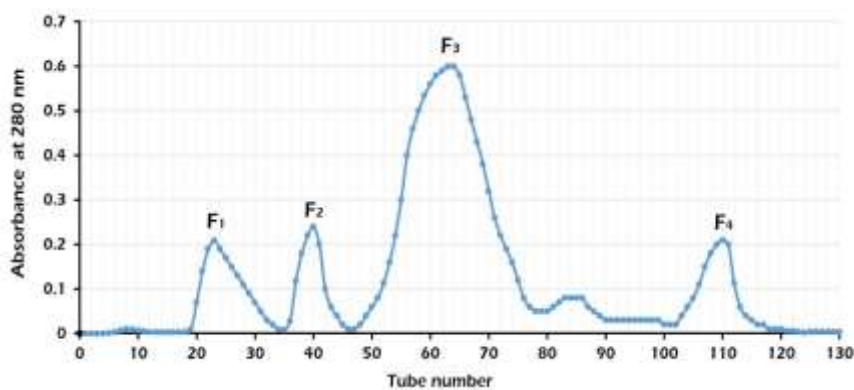
دُز کشندگی (LD_{50}) زهرها، که معادل مرگ 50% موش‌ها طی ۲۴ ساعت پس از تزریق زهر است، با استفاده از روش Spearman-Kärber Finney تعیین شد (۲۳). مقدار 1 mg/mL از استوک هر یک از زهرها تهیه شد و به مدت 5 min در 10000 g سانتریفیوژ گردید و سپس فیلتر شد. تعداد ۳۰ موش نژاد NIH ($25-30 \text{ g}$) انتخاب شدند. موش‌ها در دمای مناسب ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. پنج گروه از موش‌ها با دُزهای مختلف زهر (3 mg/kg ، $2/5$ ، $1/5$ ، 1) تحت آزمایش قرار گرفتند و به گروه کنترل نرمال سالیین تزریق شد.

اثرات ضد باکتریایی زهرها

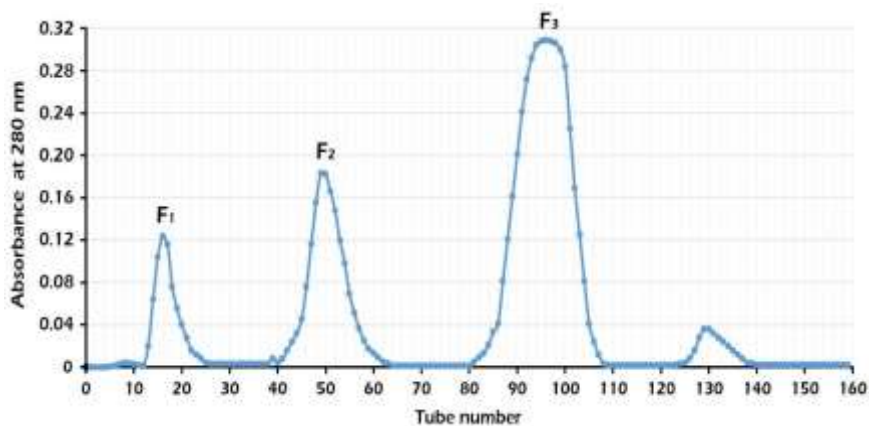
زهرهای خام لیوفیلیزه (100 ، 75 ، 50 ، 25) و فراکسیون‌های آن، در 1 mL بافر تریس-HCl (50 mM ، $7/4 \text{ pH}$) حل شدند و با استفاده از فیلتر سرنگی $0/22 \mu$ فیلتر گردیدند و در دمای 4°C نگهداری شدند. تست حساسیت ضد باکتریایی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن انجام گرفت (۱۹). در ابتدا، برای تهیه دیسک، غلظت‌های (100 ، 75 ، 50 ، 25) زهرها روی دیسک‌های خالی ریخته شد و به مدت سه ساعت زمان داده شد تا دیسک‌ها کاملاً خشک شوند. سپس پلیت‌های حاوی مولر هینتون آگار با سواب آغشته در سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند کشت داده شدند و دیسک‌های آماده شده روی سطح پلیت قرار گرفتند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند. سپس تأثیر غلظت‌های مختلف زهر بر روی باکتری‌ها، مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش



شکل ۲. کروماتوگرام زهر *E. carinatus*



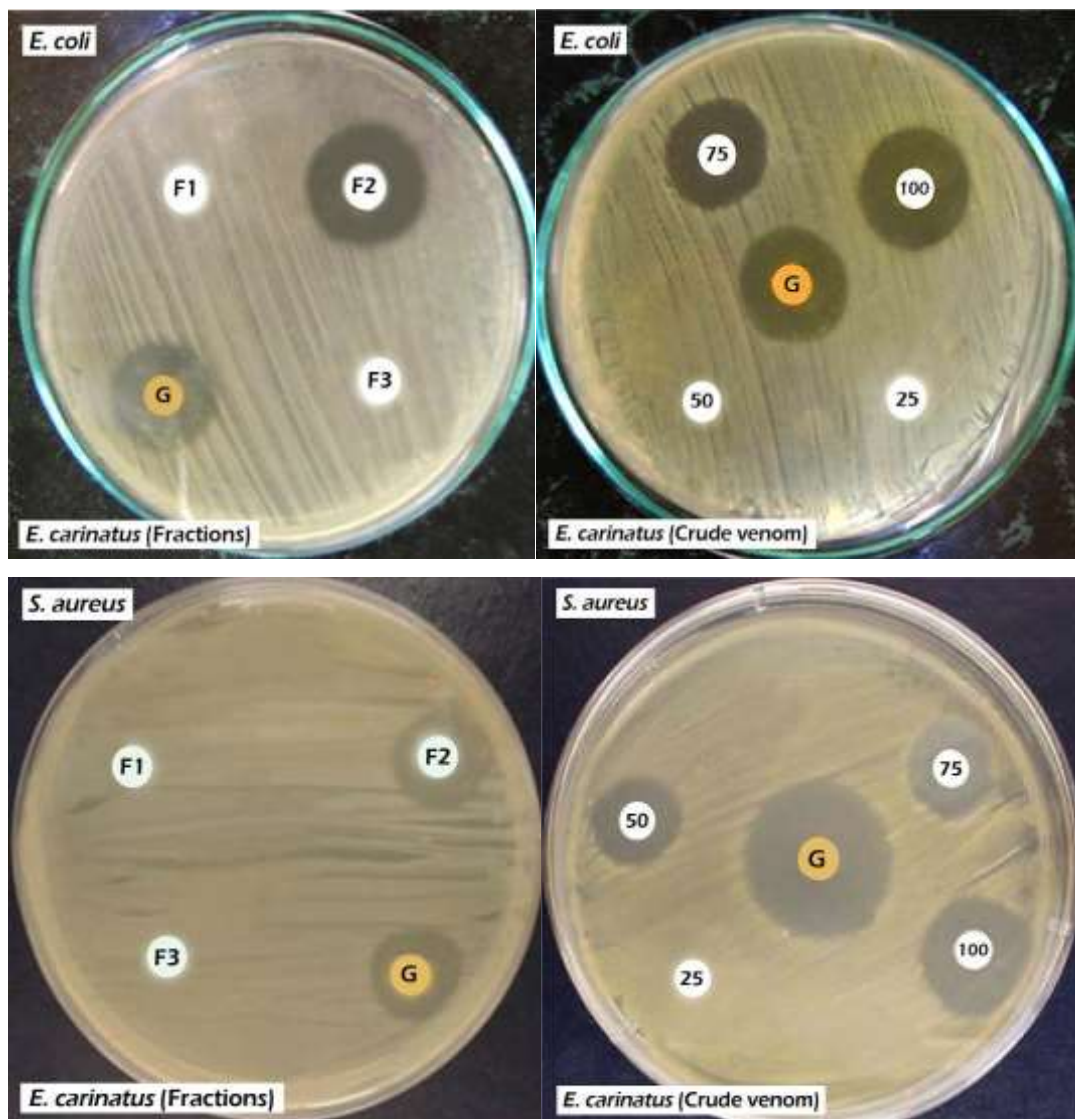
شکل ۳. کروماتوگرام زهر *M. eupeus*



شکل ۴. کروماتوگرام زهر *A. mellifera*

در برابر استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا گلی مؤثر بود. با این حال، آنتی بیوتیک استاندارد در برابر همه باکتری‌ها اثر مهاری داشت (شکل ۵ و جدول ۱). آزمایشات نشان داد که فعالیت ضد باکتریایی فراکسیون F₂ در برابر اشیریشیا گلی از جنتامایسین با غلظت ۱۰ µg/mL بیشتر (معنی دارتر) است (شکل ۵).

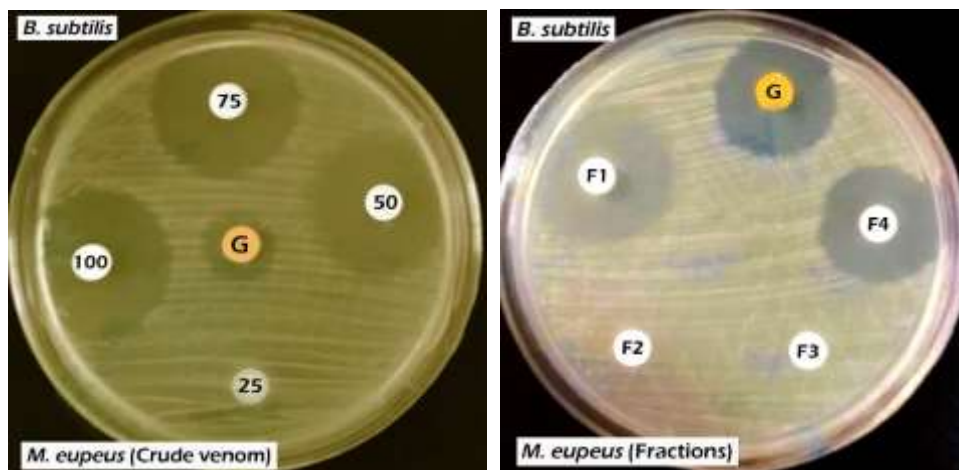
زهر خام *E. carinatus* و فراکسیون‌های آن اثر ضد باکتریایی در برابر سودوموناس آئروژینوزا و باسیلوس سوبتیلیس، نشان ندادند. در مقابل، زهر خام *E. carinatus* در برابر استافیلوکوکوس اورئوس (۱۰۰ µg/mL) و اشیریشیا گلی (۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ µg/mL) و (۷۵ و ۱۰۰ µg/mL) مؤثر بود. علاوه بر این، فراکسیون F₂ زهر خام *E. carinatus*



شکل ۵. اثر ضد باکتریایی زهر خام *E. carinatus* و فراکسیون‌های آن در برابر استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا گلی

زهر *A. mellifera* دارای فعالیت ضد باکتریایی در برابر اشیریشیا گلی و استافیلوکوکوس اورئوس در هر چهار غلظت بود. علاوه بر این، با افزایش غلظت زهر *A. mellifera*، اندازه ناحیه مهارتی نیز افزایش یافت. فراکسیون سوم (F₃) زهر خام *A. mellifera* اثر مهارتی برای اشیریشیا گلی و استافیلوکوکوس اورئوس دارد (شکل ۷). سم با غلظت ۱۰۰ μg/mL دارای بیشترین سطح مهارت در مقابل اشیریشیا گلی (۲۹/۰۶ ± ۱/۳۱ mm) و استافیلوکوکوس اورئوس (۱۷/۵۱ ± ۱/۰۷ mm) بود (جدول ۱). زهر خام *A. mellifera* و فراکسیون F₃ آن، فعالیت ضد باکتریایی قابل توجهی در مقابل اشیریشیا گلی در محیط نسبت به هر یک از سه سویه دیگر باکتری داشتند.

زهر خام *M. eupeus* و فراکسیون‌های آن هیچ اثر ضدباکتریایی در برابر سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا گلی نشان ندادند. در مقابل، زهر خام *M. eupeus* در برابر باسیلوس سوبتیلیس (۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ μg/mL) مؤثر بود. علاوه بر این، فراکسیون‌های F₁ و F₄ در برابر باسیلوس سوبتیلیس اثر مهارتی داشت. آنتی‌بیوتیک استاندارد جنتامایسین در برابر تمامی باکتری‌ها مؤثر بود (شکل ۶ و جدول ۱). آزمایشات نشان داد که فعالیت ضد باکتریایی زهر خام *M. eupeus* (با غلظت ۱۰۰ و ۷۵ μg/mL) و فراکسیون‌های F₁ و F₄ در مقابل باسیلوس سوبتیلیس نسبت به آنتی‌بیوتیک استاندارد جنتامایسین با غلظت ۱۰ μg/mL بیشتر بود (شکل ۶).



شکل ۶. اثر ضد باکتریایی زهر خام *M. eupeus* و فراکسیون‌های آن در برابر باسیلوس سوبتیلیس

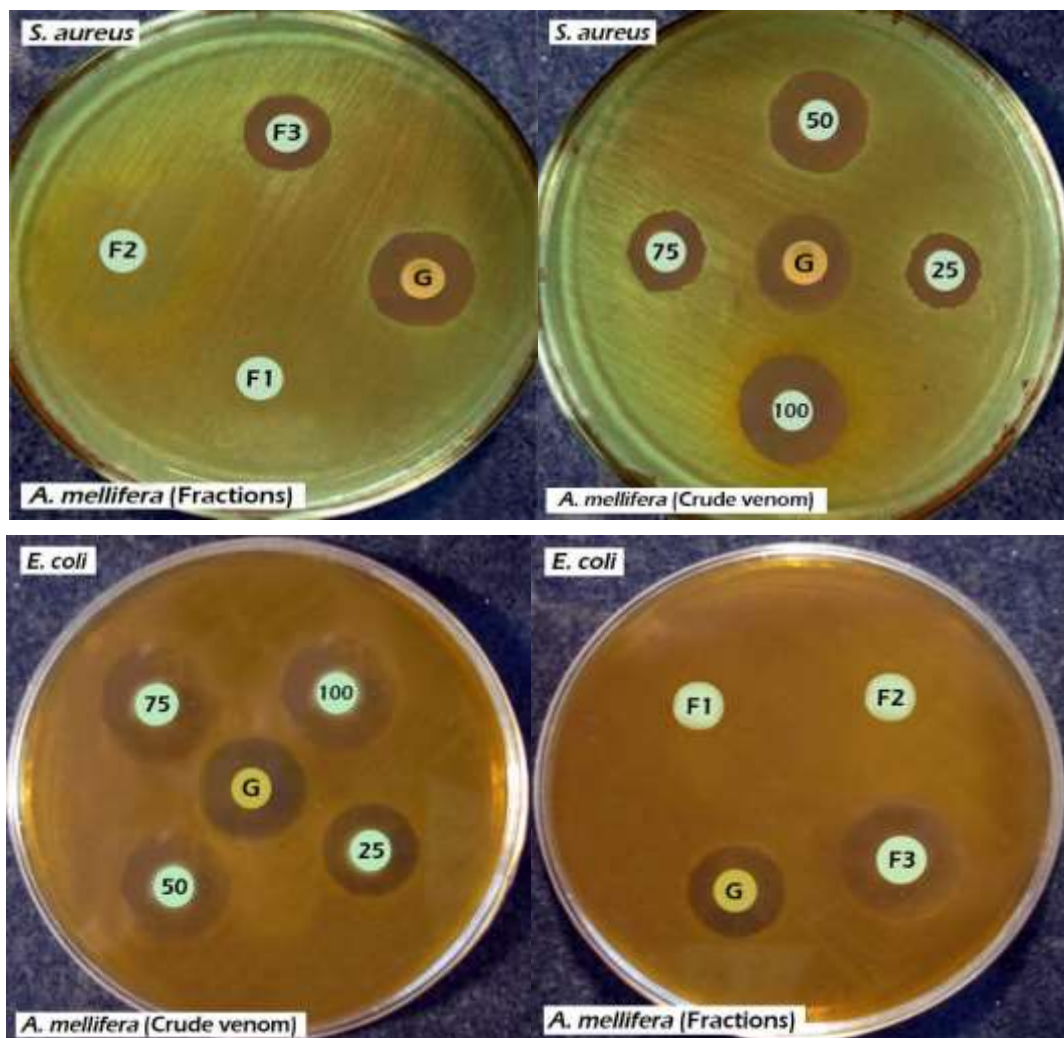
اثر آنتی‌بیوتیک استاندارد جنتامایسین با غلظت $10 \mu\text{g/mL}$ بود. (شکل ۷). علاوه بر این، سم خام *A. mellifera* و فراکسیون‌های آن هیچ اثر قابل ملاحظه‌ای بر روی سودوموناس آئروژینوزا و باسیلوس سوبتیلیس نداشتند، در حالی که آنتی‌بیوتیک استاندارد جنتامایسین در برابر آن باکتری‌ها مؤثر بود (جدول ۱).

بررسی حاضر همچنین نشان داد که فعالیت ضد باکتریایی سم خام *A. mellifera* با غلظت $100 \mu\text{g/mL}$ در برابر اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس از آنتی‌بیوتیک استاندارد جنتامایسین با غلظت $10 \mu\text{g/mL}$ بیشتر بود (شکل ۷). با این حال، فعالیت ضد باکتریایی سم خام *A. mellifera* علیه استافیلوکوکوس اورئوس ($25 \mu\text{g/mL}$ و $75 \mu\text{g/mL}$) و اشریشیاکلی ($50 \mu\text{g/mL}$ و کمتر از

جدول ۱. مقادیر نواحی مهار رشد ناشی از زهر خام و فراکسیون‌های *E. carinatus*، *M. eupeus* و *A. mellifera* برای سوبتیلیس

سویه‌های باکتری زهرها	استافیلوکوکوس اورئوس	سودوموناس آئروژینوزا	اشریشیاکلی	باسیلوس سوبتیلیس	
<i>Echis carinatus</i>	۲۵	----	----	----	
	۵۰	$12/92 \pm 1/03$	----	----	
	۷۵	$15/21 \pm 1/56$	----	$21/08 \pm 0/13$	
	۱۰۰	$22/65 \pm 2/1$	----	$23/91 \pm 0/13$	
	جنتامایسین	$25/65 \pm 1/64$	$21/08 \pm 1/08$	$22/11 \pm 0/22$	$19/21 \pm 0/97$
	فراکسیون‌ها	F ₁	----	----	----
		F ₂	$17/2 \pm 1/42$	----	$24/11 \pm 0/98$
		F ₃	----	----	----
		جنتامایسین	$16/1 \pm 0/98$	$19/11 \pm 1/06$	$22/54 \pm 1/04$
	<i>Mesobuthus eupeus</i>	۲۵	----	----	----
۵۰		----	----	$29/20 \pm 0/88$	
۷۵		----	----	$29/41 \pm 0/81$	
۱۰۰		----	----	$30/83 \pm 1/04$	
جنتامایسین		$17/03 \pm 0/81$	$11 \pm 0/44$	$20 \pm 0/22$	$4/22 \pm 0/83$
فراکسیون‌ها		F ₁	----	----	$29/3 \pm 0/96$
		F ₂	----	----	----
		F ₃	----	----	----
		F ₄	----	----	----

سویه‌های باکتری زهرها	استافیلوکوکوس اورئوس	سودوموناس آئروژینوزا	اشریشیا گلی	باسیلوس سوبتیلیس	
جنتامایسین	$20/4 \pm 0/19$	$31/1 \pm 1/07$	$16/5 \pm 0/39$	$25/8 \pm 1/02$	
زهر خام (µg/mL)	25	---	$20/06 \pm 1/50$	---	
	50	---	$25/30 \pm 1/02$	---	
	75	---	$28/31 \pm 0/67$	---	
	100	---	$29/06 \pm 1/31$	---	
جنتامایسین	$11/3 \pm 0/47$	$19/17 \pm 0/21$	$26/11 \pm 0/74$	$9/19 \pm 0/08$	
فراکسیون‌ها	F ₁	---	---	---	
	F ₂	---	---	---	
	F ₃	$8/91 \pm 1/12$	---	$29/51 \pm 1/41$	---
	جنتامایسین	$13/7 \pm 0/89$	$16/5 \pm 0/47$	$24/36 \pm 1/09$	$9/8 \pm 0/29$



شکل ۵. اثر ضد باکتریایی زهر خام *A. mellifera* و فراکسیون‌های آن در برابر اشریشیا گلی و استافیلوکوکوس اورئوس

بحث

در این مطالعه، زهر خام *M. eupeus* در برابر باسیلوس سوبتیلیس مؤثر بود و منطقه مهار ۳۰ mm را نشان داد. این نتایج با فعالیت سم عنکبوت گزارش شده توسط Benli and Yigit (۳۰) و Ahmed و همکارانش (۳۱) مشابه است.

در سال ۲۰۰۹، با مطالعه در مورد منابع مختلف زهر حیوانات، اثرات ضد باکتریایی زهر گونه‌های مختلف مار از جمله *Bothrops jararacussu* و *Bothrops moojeni jararaca* بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که زهر *B. jararaca* قوی‌ترین اثر ضد باکتریایی را در برابر استافیلوکوکوس اورئوس دارد (۳۲).

Jami al ahmadi گزارش داد، زهر *E. carinatus* اثر ضد باکتریایی گسترده‌ای در برابر باکتری‌های ذکر شده ندارد، اگرچه فعالیت مهارتی قابل توجهی در برابر استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد مشاهده شده است (۳۳). مطالعه‌ای اثر ضد باکتریایی زهر زنبور عسل در برابر چندین گونه باکتری در سال ۲۰۱۶ نشان داد که این ماده دارای اثر مهارتی قابل توجهی در برابر سودوموناس آئروژینوزا و اشیریشیا گلی است (۱۹). در مطالعه حاضر، زهر زنبور عسل اثر مهارتی قوی در برابر اشیریشیا گلی نشان داد. در حالی که هیچ فعالیت ضد میکروبی از زهر زنبور عسل در برابر سودوموناس آئروژینوزا مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری

در نهایت، لازم به ذکر است که مقایسه اثرات ضد باکتریایی زهرها با جنتامایسین نشان می‌دهد که این زهرها دارای اثر مهارتی قوی‌تری هستند. با این حال، این مقایسه یک ارزیابی آزمایشگاهی است که بدون فرمولاسیون انجام شده است. بنابراین نتایج به دست آمده در مرحله مقدماتی ارزشمند به نظر می‌رسد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از این زهرها، به‌ویژه پروتئین‌ها و پپتیدهای موجود در آنها، نتایج امیدوار کننده‌ای را به همراه دارد. تحقیقات بیشتر در آینده در مورد گونه‌های باکتریایی دیگر و مدل‌های حیوانی ممکن است باعث ورود صنعتی این زهرها به بازار داروسازی شود و به حل مشکل مقاومت دارو در هنگام درمان عفونت‌های میکروبی و به‌خصوص عفونت باکتریایی کمک کند.

زهر حیواناتی مانند عقرب، مارها و زنبورها می‌توانند از رشد میکروارگانیسم‌ها جلوگیری کنند. به‌عنوان مثال، عقرب‌ها برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها، زهرشان را بر روی بدن خود اسپری می‌کنند (۲۴). به طور کلی، زهر این حیوانات منبع مناسبی برای ترکیبات دارویی است (۲۵). اگرچه برخی از زهرها و ترکیبات به‌دست آمده از آنها خاصیت ضد باکتریایی دارند، اما اکثر این زهرها برای چنین فعالیت‌هایی مورد مطالعه قرار نگرفته‌اند. مطالعه حاضر شواهدی را ارائه می‌دهد که زهرهای مختلف حیوانات دارای اثر ضد باکتریایی در برابر باکتری‌ها هستند. در بین زهرهای مورد بررسی، زهر مار (*E. carinatus*)، عقرب (*M. epues*) و زنبور عسل (*A. mellifera*) اثرات ضد میکروبی قوی داشتند و در مواردی، نواحی بیشتری از مهار رشد در مقایسه با جنتامایسین را نشان دادند.

در مطالعه حاضر از بین زهرهای مورد بررسی، زهر *A. mellifera* بالاترین اثر را در برابر دو میکروارگانیسم داشت و تمام غلظت‌های زهر *A. mellifera* اثر ضد میکروبی قوی در برابر استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا گلی داشتند. زهر *E. carinatus* و *M. eupeus* اثرات متوسط مهارتی را نشان دادند و تنها سه غلظت از زهر آنها اثر قابل توجه داشت.

زهر *M. eupeus* به‌طور خاص در برابر باسیلوس سوبتیلیس اثر مهارتی داشت و از طرف دیگر، زهر *E. carinatus* و *A. mellifera* طیف گسترده‌تری از فعالیت ضدباکتریایی را نشان دادند. با توجه به حساسیت میکروارگانیسمی، به نظر می‌رسد که باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس از جمله حساس‌ترین باکتری‌ها نسبت به زهر است. در مقابل، این نوع زهرها هیچ تأثیری در مهار سودوموناس آئروژینوزا نداشتند. این نتایج مطابق با مطالعه Perumal Samy و همکارانش بود. (۲۶). در برخی مطالعات پیش از این، در مواردی گزارش شده است که زهر مار اثر مهارتی قوی در برابر سودوموناس آئروژینوزا از خود نشان می‌دهد (۲۷، ۲۸).

اثر ضد باکتریایی زهر عقرب در مطالعات مختلف نشان داده شده است. در یک مطالعه توسط Zhao و همکارانش در سال ۲۰۰۹، با مطالعه اثر ضد باکتریایی عقرب چینی *Isometrus maculates* مشخص شد که زهر این عقرب اثر مهارتی بر رشد باکتری‌های گرم مثبت دارد، اما هیچ تأثیری بر باکتری‌های گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا و اشیریشیا گلی ندارد. مقایسه نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج موجود نشان می‌دهد که مکانیسم اثر ضد باکتریایی زهر عقرب چینی شبیه به زهر عقرب ایرانی است (۲۹).

سپاسگزاری

نویسندگان از تمامی کسانی که در انجام این تحقیق آنها را یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌کنند.

تعارض در منافع

این مقاله پژوهشی مستقل است که بدون حمایت مالی سازمانی انجام شده است. در انجام مطالعه حاضر، نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافی نداشته‌اند.

Referance

- Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist*. 2018;11:1645-58. [[DOI:10.2147/IDR.S173867](https://doi.org/10.2147/IDR.S173867)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
- Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health*. 2015;109(7):309-18. [[DOI:10.1179/2047773215Y.0000000030](https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
- Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect Medicin Chem*. 2014;6:25-64. [[DOI:10.4137/PMC.S14459](https://doi.org/10.4137/PMC.S14459)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
- Perumal Samy R, Stiles BG, Franco OL, Sethi G, Lim LHK. Animal venoms as antimicrobial agents. *Biochem Pharmacol*. 2017;134:127-38. [[DOI:10.1016/j.bcp.2017.03.005](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.03.005)] [[PMID](#)]
- Babaie M, Zolfagharian H, Salmanizadeh H, Mirakabadi AZ, Alizadeh H. Isolation and partial purification of anticoagulant fractions from the venom of the Iranian snake *Echis carinatus*. *Acta Biochim Pol*. 2013;60(1):17-20. [[DOI:10.18388/abp.2013_1945](https://doi.org/10.18388/abp.2013_1945)] [[PMID](#)]
- Babaie M, Zolfagharian H, Zolfaghari M, Jamili S. Biochemical, hematological effects and complications of *Pseudosynanceia Melanostigma* Envenoming. *J Pharmacopuncture*. 2019;22(3):140-6.
- Babaie M, Salmanizadeh H, Zolfagharian H, Alizadeh H. Properties of biological and biochemical effects of the Iranian saw-scaled viper (*Echis carinatus*) venom. *Bratisl Lek Listy*. 2014;115(7):434-8. [[DOI:10.4149/BLL.2014_085](https://doi.org/10.4149/BLL.2014.085)] [[PMID](#)]
- Babaie M, Salmanizadeh H, Zolfagharian H. Blood coagulation induced by Iranian saw-scaled viper (*Echis Carinatus*) venom: Identification, purification and characterization of a prothrombin activator. *Iran J Basic Med Sci*. 2013;16(11):1145-50.
- Salmanizadeh H, Babaie M, Zolfagharian H. In vivo evaluation of homeostatic effects of *Echis carinatus* snake venom in Iran. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2013;19(3):21-9. [[DOI:10.1186/1678-9199-19-3](https://doi.org/10.1186/1678-9199-19-3)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
- Babaie M, Ghaempanah A. Evaluation of hemolytic activity and biochemical properties of *Apis mellifera* bee venom on NIH laboratory mice. *J Neyshabur Univ Med Sci*. 2020; 8(3):25-34.
- Babaie M. Snakes venom proteins and coagulopathy caused by snakebite. *J Birjand Univ Med Sci*. 2020;27(4):1-11.
- Yacoub T, Rima M, Karam M, Sabatier JM, Fajloun Z. Antimicrobials from venomous animals: An overview. *Molecules*. 2020;25(2402):1-19. [[DOI:10.3390/molecules25102402](https://doi.org/10.3390/molecules25102402)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
- Almeida JR, Palacios ALV, Patiño RSP, Mendes B, Teixeira CAS, Gomes P3, et al. Harnessing snake venom phospholipases A2 to novel approaches for overcoming antibiotic resistance. *Drug Dev Res*. 2019;80(1):68-85. [[DOI:10.1002/ddr.21456](https://doi.org/10.1002/ddr.21456)] [[PMID](#)]
- Liu G, Yang F, Li F, Li Z, Lang Y, Shen B, et al. Therapeutic potential of a scorpion venom-derived antimicrobial peptide and its homologs against antibiotic-resistant gram-positive bacteria. *Front Microbiol*. 2018;9:1-14. [[DOI:10.3389/fmicb.2018.01159](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01159)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
- Malanovic N, Lohner K. Antimicrobial peptides targeting gram-positive bacteria. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2016;9(3):1-33. [[DOI:10.3390/ph9030059](https://doi.org/10.3390/ph9030059)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
- Chen CH, Lu TK. Development and challenges of antimicrobial peptides for therapeutic applications. *Antibiotics*. 2020;9(24):1-20. [[DOI:10.3390/antibiotics9010024](https://doi.org/10.3390/antibiotics9010024)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
- Bahar AA, Ren D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013;6(12):1543-75. [[DOI:10.3390/ph6121543](https://doi.org/10.3390/ph6121543)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
- Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(3):491-511. [[DOI:10.1128/CMR.00056-05](https://doi.org/10.1128/CMR.00056-05)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
- Zolfagharian H, Mohajeri M, Babaie M. Bee venom (*Apis Mellifera*) an effective potential alternative to gentamicin for specific bacteria strains. *J*

- Pharmacopuncture. 2016;19(3): 225-30. [DOI:10.3831/KPL.2016.19.023] [PMID] [PMCID]
20. Chen Na, Xu S, Zhang Y, Wang F. Animal protein toxins: origins and therapeutic applications. *Biophys Rep.* 2018;4(5):233-42. [DOI:10.1007/s41048-018-0067-x] [PMID] [PMCID]
21. Maehre HK, Dalheim L, Edvinsen GK, Elvevoll EO, Jensen IJ. Protein determination-method matters. *Foods.* 2018;7(1):1-11. [DOI:10.3390/foods7010005] [PMID] [PMCID]
22. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-5. [DOI:10.1038/227680a0] [PMID]
23. Zolfagharian H, Mohajeri M, Babaie M. Honey bee venom (*Apis mellifera*) contains anticoagulation factors and increases the blood-clotting time. *J Pharmacopuncture.* 2015; 18(4):7-11. [DOI:10.3831/KPL.2015.18.031] [PMID] [PMCID]
24. Ahmed U, Mujaddad-ur-Rehman M, Khalid N, Fawad SA, Fatima A. Antibacterial activity of the venom of *Heterometrus xanthopus*. *Indian J Pharmacol.* 2012;44(4):509-11. [DOI:10.4103/0253-7613.99332] [PMID] [PMCID]
25. Munawar A, Ali SA, Akrem A, Betzel C. Snake venom peptides: Tools of biodiscovery. *Toxins (Basel).* 2018;10(11):1-29. [DOI:10.3390/toxins10110474] [PMID] [PMCID]
26. Perumal Samy R, Gopalakrishnakone P, Thwin MM, Chow TK, Bow H, Yap EH, Thong TW. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A2 enzymes. *J Appl Microbiol.* 2007;102(3):650-9. [DOI:10.1111/j.1365-2672.2006.03161.x] [PMID]
27. Talebimehrdar M, Madani R, Hajihosseini R, Moradi bidhendi M. Antibacterial activity of isolated immunodominant proteins of *Naja Naja* (Oxiana) Venom. *Iran J Pharm Res.* 2017;16(1):297-305.
28. Al-Asmari AK, Abbasmanthiri R, Abdo Osman NM, Siddiqui Y, Al-Bannah FA, Al-Rawi AM, et al. Assessment of the antimicrobial activity of few Saudi Arabian snake venoms. *Open Microbiol J.* 2015;9:18-25. [DOI:10.2174/1874285801509010018] [PMID] [PMCID]
29. Zhao Z, Ma Y, Dai C, Zhao R, Li S, Wu Y, Cao Z, et al. Incroporin, a new cationic antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Isometrus maculatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(8):3472-7. [DOI:10.1128/AAC.01436-08] [PMID] [PMCID]
30. Benli M, Yigit N. Antibacterial activity of venom from funnel web spider *Agelena labyrinthica* (Araneae agelenidae). *J Venom Anim Toxin Incl Trop Dis.* 2008;14:641-50. [DOI:10.1590/S1678-91992008000400007]
31. Ahmed U, Mujaddad-ur-Rehman M, Khalid N, Fawad SA, Fatima A. Antibacterial activity of the venom of *Heterometrus xanthopus*. *Indian J Pharmacol.* 2012;44(4):509-11. [DOI:10.4103/0253-7613.99332] [PMID] [PMCID]
32. Ciscotto P, Machado de Avila RA, Coelho EA, Oliveria J, Diniz C, Farias L, Carvalho M, et al. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon.* 2009;53:330-41. [DOI:10.1016/j.toxicon.2008.12.004] [PMID]
33. Jami al ahmadi A, Fathi B, Jamshidi A, Zolfagharian H, Zare Mirakabadi A. Investigation of the antibacterial effect of venom of the Iranian snake *Echis carinatus*. *Iranian J Vet Sci Technol.* 2010;2(2):93-100.