بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره بدن کرم گلوگاه انار *Ectomyelois ceratoniae*(Lep: Pyralidae) بر باکتری *Escherichia coli*

عیسی جبله[۱]، مجید کزازی[۱*] و احمد آسوده[۲]

[۱] ایران، همدان، دانشگاه بوعلی سینای همدان، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی

[۲] ایران، مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه شیمی

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۴

چکیده

امروزه از حشرات به عنوان منابع عظیم داروهای مدرن نام برده می‌شود. در سال‌های اخیر، بیوتکنولوژیست ها و حشره‌شناسان بر مهندسی زیستی پروتئین‌های حشرات و کاربرد تولیدات آنها در درمان بیماری‌ها و پزشکی مدرن تأکید فراوانی داشته‌اند. داروهای مطرح در این زمینه شامل آنتی‌میکروب‌های قدرتمند بر ضد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مقاوم و HIV می‌باشد. مطالعه حاضر با هدف بررسی فعالیت ضد باکتریایی و همولیتیک عصاره بدن لارو *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) انجام شد. برای تحریک سیستم ایمنی لاروهای کرم گلوگاه انار، سویه های استاندارد جدایه قارچ *B. bassiana* Fashand ، باکتری گرم مثبت *B. thuringiensis* var. *kurstaki* و باکتری گرم منفی *Escherichia coli* (ATCC 25922) به همولنف تزریق شد. فعالیت همولیتیک عصاره القایی و غیرالقایی استخراج شده بعد از ۲۴ ساعت از تزریق بر روی خون تازه انسان، گوسفند و مرغ به دو روش جذب نوری و نشر شعاعی و فعالیت ضد میکروبی به روش نشر شعاعی بر روی باکتری *E. coli* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره القایی نسبت به عصاره غیر القایی دارای فعالیت ضد میکروبی می باشد. بیشترین فعالیت ضد میکروبی در عصاره القاء شده زیر غشائ فیلتراسیون باکتری *E. coli* با غلظت ۲میلی گرم بر میلی‌لیتر با میانگین ۲۲/۷±۰/۳۴ میلی‌متر قطر هاله‌های عدم رشد مشاهده گردید. همچنین بیشترین فعالیت همولیتیک بترتیب در خون مرغ با میانگین کل (6/39±1/24 درصد در روش جذبی و ۵/۶۴±۱/۲۵ درصد در روش نشر شعاعی)، سلول‌های خونی انسان با میانگین کل (2/15±0/27 درصد در روش جذبی و ۱/۵۶±۰/۲۳ درصد در روش نشر شعاعی) و گوسفند با میانگین کل (0/91±0/04 درصد در روش جذبی و ۰/۲۸±۰/۰۳ درصد در روش نشر شعاعی) مشاهده گردید که در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار داشتند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره بدن لارو کرم گلوگاه انار خاصیت همولیتیکی بسیار کمی بر روی گلبول های قرمز داشت و بسته به نوع عامل پاتوژن القایی فعالیت ضد میکروبی عصاره بر روی باکتری *E. coli* متفاوت می باشد. با توجه به نتایج این تحقیق، این حشره می‌تواند کاندیدا خوبی جهت بررسی بیشتری در مطالعات تکمیلی فعالیت‌های ضد میکروبی باشد.

واژه های کلیدی: فعالیت ضد میکروبی، خون، فعالیت همولیزی، نشر شعاعی.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۴۵۵۹۹۵۴ ، پست الکترونیکی: mkazzazi@basu.ac.ir

مقدمه

بشر در طول تاریخ برای پیدا کردن راه درمان بیماری‌ها همواره به طبیعت چشم داشته است. شمار داروهایی که از گیاهان یا حتی ترکیبات درون موجودات زنده استخراج یا با الهام از آن‌ها تولید شده‌اند، به مراتب بیشتر از آن است که تصور می‌شود. بسیاری از داروهای امروزی که از طبیعت گرفته شده‌اند از گیاهان، باکتری‌ها یا قارچ‌ها استخراج شده‌اند. اما بد نیست بدانیم که طیف عظیمی از داروهای موجود در بازار از حیوانات استخراج شده و این

داروها هر سال جان میلیون‌ها انسان را نجات می‌دهند. هر چند که بشر با وجود تمام پیشرفت‌های صنعت داروسازی هنوز در ابتدای راه است و هنوز بخش بزرگی از طبیعت برای استفاده در داروها از دید دانشمندان پنهان مانده است. اگر چه تا کنون از سموم مهره‌داران گرفته تا آب دهان زالو و زهر و ترشحات موجودات دریایی، پایه تولید بسیاری از داروها بوده اند و حتی درمان‌های موفقی هم برای انواع سرطان‌ها، بیماری قلبی- عروقی، دیابت نوع ۲، بیماری دستگاه ایمنی و دردهای شدید و مزمن کشف شده است، اما هنوز چیزهای بسیاری وجود دارد که ناشناخته است(۱۰). بر خلاف باور عموم که شاید حشرات را اغلب به عنوان موجوداتی آسیب‌رسان و یا مزاحم برای انسان می‌دانند، بسیاری از آن‌ها نه‌تنها برای انسان سودمندند، بلکه حیات آنها برای ادامه زندگی انسان بسیار لازم نیز هست. حشرات بزرگترین رده جانورانی بر اساس تعداد گونه‌ها هستند. حدود یک میلیون گونه از حشرات تا کنون شناسایی شده‌اند. زمانی که میکروب وارد بدن بی‌مهرگان از جمله حشرات می‌شود، آنها دفاع‌های مختلفی از جمله سنتز و القای پپتیدهای ضد میکروبی دارند به گونه‌ای که زمانی که میکروب وارد بدن آنها می‌شود، داخل لارو حشرات یک سری شناساگرهایی وجود دارد که قادر به شناسایی باکتری‌ها و قارچ‌ها هستند. این شناساگرها قادر به شناسایی نوع عامل میکروبی و اینکه آیا باکتری گرم منفی و یا گرم مثبت است، خواهد بود و لاروها برای تولید پپتیدهای ضد میکروب با توجه به نوع میکروب، مسیر سنتز متفاوتی را در پیش می‌گیرند (۲۸). یکی از اولین و مهمترین راسته‌های حشرات که پپتیدهای ضد میکروبی آن بررسی گردیده است راسته بالپولکدارن Lepidoptera می باشد (۲، ۶، ۲۵). کرم گلوگاه انار یا شب پره خرنوب با نام علمی *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) ، از خانواده پیرالیده Pyralidae راسته بالپولکدارن Lepidoptera ، آفتی با گسترش جهانی است که در قاره‌های آسیا، اروپا، آفریقا، آمریکا و اقیانوسیه انتشار دارد. این آفت از فرانسه، قبرس، هند، عراق، لبنان، الجزیره، یونان و لیبی گزارش شده است (۲۶). در دهه های اخیر با استفاده ی گسترده از آنتی بیوتیک ها در کشاورزی و مراکز بهداشتی و درمانی گسترش مقاومت دارویی سرعت گرفته است (۲۰). مقاومت میکروبی به آنتی‌بیوتیک‌ها یک نگرانی در حال افزایش در میان متخصصین مراقبت از سلامت می‌باشد که آن‌ها را به سمت جستجو برای داروهای جایگزین پیش می‌برد (۹). بنابراین، صنایع داروسازی تلاش‌های خود را برای یافتن ترکیب‌های جدید غیرسمی، قوی و مؤثر برای درمان عفونت‌های میکروبی متمرکز کرده‌اند (۲۴).

در سال‌های اخیر پپتیدهای ضد میکروبی به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. پپتیدهای ضد میکروبی به صورت طبیعی در همهٔ ارگانیسم‌ها وجود دارند و در سیستم ایمنی ذاتی آن‌ها نقشی حیاتی ایفا می‌کنند (۲۳). در دهه‌های اخیر تعداد زیادی از آن‌ها از حشرات، دوزیستان و پستانداران جدا شده است که از میان آن‌ها می‌توان به جداسازی ملیتین از نیش زنبورعسل، سکروپین از حشرات، دیفنسین از نوتروفیل‌های پستانداران و مگنیناز پوست قورباغه اشاره نمود (۲۵). بخش بزرگی از پپتیدهای ضد میکروبی شناخته شده، متعلق به حشرات می‌باشد. تعداد و تنوع این مولکول‌ها در گونه‌های مختلف حشرات به طور قابل توجهی متفاوت است. در حشرات پپتیدهای ضد میکروبی از سلول‌ها و بافت‌هایی مرتبط با ایمنی ذاتی مانند سلول-های خونی یا اجسام چربی ترشح می‌شوند و می‌توانند جایگزین مناسب برای آنتی بیوتیک‌های معمولی که پاتوژن‌ها نسبت به آنها مقاوم شده‌اند، باشند. اگر چه AMPs با استفاده از تعاملات الکترواستاتیک خاص باکتری‌ها به غشاء آن‌ها متصل می شوند، اما برخی از AMPs می توانند به طور مستقیم به سلول‌های میزبان از جمله سلول‌های خونی متصل و باعث لیز شدن آن‌ها گردند (۷). نسبت فعالیت‌های ضدمیکروبی به فعالیت همولیتیک به عنوان شاخص درمانی تعریف شده است و

برای جلوگیری از همولیز سلول‌های میزبان، شاخص درمان بالا لازم است (۱۳). پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونی ترجیحا با غشاهای باکتریایی با بار منفی ارتباط برقرار می-کنند؛ با این حال، در غلظت های بالا، آنها به سلول های پستاندار آسیب می رسانند (۱۴). تجزیه و تحلیل ساختار و عملکرد AMPs ها نشان داده است که هیدروفوبیت بالا (High hydrophobic) و لحظه ای هیدروفوبیک (Amphipathicity) با افزایش فعالیت همولیتیک ارتباط دارد (۳). مدل‌های مختلفی برای بررسی سمیت غشائی مواد وجود دارند، از جمله مدل‌های حیوانی که می توان آسیب‌های وارده بر غشا مخاطی را به کمک میکروسکوپ الکترونی مشاهده نمود. یکی از مدل‌های بسیار ساده برای مطالعه اثرات سمی مواد بر غشا سلولی، مدل گلبول قرمز می باشد (۱۹) که در مطالعات چندی مورد استفاده واقع شده است (۸، ۱۰، ۱۷). این مدل به طور مستقیم اثرات سمی باقوه مواد را در استفاده تزریقی نشان می‌دهد ضمن اینکه می‌تواند نشانه‌ای از سمیت کلی غشائی نیز باشد. مزیت دیگر استفاده از مدل گلبول قرمز در دسترس بودن آسان خون و نیز روش ساده جدا سازی گلبول‌های قرمز از خون می‌باشد (۱۹). اثرات ضد میکروبی یک ترکیب توسط روش‌های مختلف مورد مطالعه قرار می‌گیرد یکی از آن‌ها بررسی اثرات یک ترکیب بر همولیز گلبول قرمز می‌باشد. واژه همولیز اشاره به تخریب گلبول های قرمز (RBC= Red blood cells) دارد و برای طیف گسترده‌ای از شرایط آزمایشگاهی و بالینی، هر دو فیزیولوژیکی و پاتولوژیک است. همولیز، که به چندین نام دیگر نیز شناخته می شود، باعث تجزیه گلبول های قرمز (اریتروسیت ها) و انتشار محتویات آنها (سیتوپلاسم) به مایع اطراف (به عنوان مثال پلاسمای خون) می‌شود. همولیز ممکن است در *in vivo* یا *in vitro* (داخل یا خارج از بدن) رخ دهد (۲۱). همولیسین‌ها باعث آسیب رساندن به غشای سیتوپلاسمی میزبان می شود و باعث مرگ و میر سلولی می شود. فعالیت این سموم به راحتی با آزمایش-هایی که حاوی لیز کردن گلبول‌های قرمز است، مشاهده می شود. برخی از همولیسین‌ها به فسفولیپید غشای سیتوپلاسمی میزبان حمله می کنند و برخی از همولیسین‌ها بر استرول‌های غشای سیتوپلاسمی میزبان تاثیر می‌گذارند (۱۲). بسیاری از ترکیبات مستعد دارویی به دلیل داشتن فعالیت همولیتیک نمی توانند به عنوان دارو مورد استفاده قرار گیرند، این ترکیبات موجب لیز شدن گلبول های قرمز خون شده و خون ریزی شدید و آنمی را سبب می گردند. علیرغم توان پپتیدهای ضد میکروبی، داشتن یک سری نواقص از جمله فعالیت همولیتیکی باعث محدودیت در کاربردهای بالینی آنها می‌گردد (۷). بنابراین پپتید های ضد میکروبی که به عنوان جایگزین آنتی بیوتیک‌ها مورد تحقیق قرار می گیرند، باید از لحاظ داشتن فعالیت همولیتیک مورد ارزیابی قرار گیرند (۴، ۱۴، ۲۷). تاکنون سیستم ایمنی کرم گلوگاه انار در دنیا بررسی نگردیده است این حشره به فروانی در اکثر جاها یافت می‌گردد به عنوان یکی از آفات مهم انار، انجیر، پسته می‌باشد و قابلیت پرورش انبوه بر روی غذای مصنوعی را نیز دارد و داری چندین نسل در سال می باشد و قادر است در محیط‌های به شدت آلوده به عوامل میکروبی مانند قارچ و باکتری زندگی کند(۲۵). در این تحقیق نیز برای القائ مسیرهای متفاوت سنتز پپتیدها از سه عامل قارچ *B. bassiana*، باکتری گرم مثبت *B. thuringiensis* و باکتری گرم منفی *E. coli* به همولنف لاروهای کرم گلوگاه انار تزریق گردید و فعالیت ضد میکروبی آن بر روی باکتری *E. coli* که شایعترین عامل عفونت دستگاه ادراری است و فعالیت همولیزی آن بر روی خون تازه انسان، گوسفن و مرغ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

در این مطالعه مواد طبیعی سبوس گندم، مخمر، عسل، آرد گندم و شکر از محصولاتی ایرانی موجود در بازار استفاده گردید ومواد شیمیایی مورد استفاده اعم از متانول، اتانول،

تری فلورو استیک اسید، استونیتریل استیک اسید، سدیم کلرید، فرمالدهید، سدیم هیدرکسید، تری کلرو استیک اسید، استون، کلریدریک اسید،(80) Tween ، گلیسرول، تریتیونX-100 و محیط کشت‌ها همگی از شرکت مرک (آلمان) تهیه شد.

پرورش حشرات: میوه های آلوده به کرم گلوگاه انار از باغات انار شهرستان کاشمر استان خراسان رضوی در سال ۱۳۹۲جمع آوری شده و به آزمایشگاه منتقل می شوند. لاروها بر اساس یک رژیم غذایی مصنوعی شامل سبوس گندم ۳۰۰ گرم، شکر ۸۰ گرم، مخمر ۹ گرم، گلیسیرین ۱۳۰ میلی لیتر و آب مقطر ۱۲۰ میلی لیتر پرورش داده شد. شرایط رشد دما ۲ ± ۲۸ درجه سانتیگراد، رطوبت نسبی ۵ ± ۶۵ درجه سلسیوس و دوره نورانی ۱۶ روشنایی: ۸ تاریکی بود (۲۶).

کشت قارچ و باکتری‌ها: سیستم ایمنی حشرات به گونه است که ورود عوامل میکروبی باعث القا و تولید عوامل دفاعی از جمله پپتید های ضد میکروبی می‌گردند. جهت تحریک و القایی پپتیدهای ضد میکروبی دستگاه ایمنی حشره، سویه‌های استاندارد از جدایه قارچ *Beauveria bassiana* Fashand، یک باکتری گرم مثبت *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* و یک باکتری گرم منفی *Escherichia coli* استفاده گردید. قارچ *B. bassiana* روی محیط دکستروز آگار(Dextrose Agar) ، باکتری *B. thuringiensis* روی محیط نوترینت آگار (Nutrient Agar) و *E. coli* روی محیط آگار مولر هینتون (Muller-Hinton Agar) کشت داده شد. برای به دست آوردن اسپور قارچ ها و باکتری ها، ورق ها به مدت ۱۵ روز در دمای ۱± ۲۵ درجه سانتی گراد و به مدت ۴ روز در دمای ۱± ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. جهت تهیه سوسپانسیون برای تزریق با اسپورها توسط سوزن سر نیزه‌ای استریل از سطح محیط کشت هر کدام از عوامل میکروبی خراشیده و سوسپانسیونی غلظت 10^5 اسپور در میلی‌لیتر در محلول آب مقطر استریل و (80) Tween تهیه شد(۲۸).

تزریق عوامل میکروبی به همولنف حشره: از سویه های استاندارد جدایه قارچ *B. bassiana* Fashand ، یک باکتری گرم مثبت *B. thuringiensis* var. *kurstaki* و یک باکتری گرم منفی *E. coli* جهت تزریق به همولنف لاروها، استفاده گردید. لارو کرم گلوگاه انار دقایقی روی یخ گذاشته و بی‌حس شدند. سطح شکمی بدن حشرات با الکل۷۰٪ ضد عفونی شدند و سپس با استفاده از سرنگ هامیلتون، یک میکرولیتر سوسپانسیون عوامل میکروبی به سطح شکمی تزریق شد. به لاروهای شاهد آب مقطر استریل در (80) Tween تزریق شد (۲۸).

استخراج عصاره بدن حشره: جهت به دست آرودن عصاره خام بدن لاروها ی کرم گلوگاه انار ۲۴ ساعت پس از تزریق، ابتدا با الکل ۷۰٪ استریل شدند، سپس با استفاده از سرنگ هامیلتون همولنف جمع‌آوری و با نیتروژن مایع منجمد و با هاون پودر شدند، پودر حاصل با آب مقطر حاوی TFA ۱٪ اسیدی شد. ۳۰ دقیقه در یک حمام آبی سرد یخ زده با دستگاه شیکر تکان ملایم دادشد. بعد از سانتریفوژ در دور۱۵۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه محلول رونشین از غشای ۱۰ کیلو دالتون مربوط به اولترافیلتراسیون عبور داده شد. سپس عصاره فیلتر شده توسط غشای ۳ کیلودالتون تغلیظ گردید و در نهایت توسط فریز درایر و نیتروژن مایع هم عصاره روی فیلتر و هم عصاره زیر فیلتر به صورت پودر درآمد. پودر حاصله جهت فعالیت‌های ضد باکتریای و همولیتیکی مورد استفاده قرار گرفت (۲۸).

تهیه غلظت: عصاره‌های رو و زیر فیلتر لاروهای تزریق شده با قارچ، باکتری‌ها و لاروهای تزریق نشده وزن شد و غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی لیتر در بافر PBS= Phosphate buffered saline تهیه شد (جدول ۱) (۱، ۱۵).

جدول ۱- سریال غلظت های متفاوت در تیمارهای مختلف

تیمار	علامت اختصاری	غلظت ۰/۵ mg/ml	غلظت ۱ mg/ml	غلظت ۲ mg/ml
عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با قارچ *B. bassiana*	Buu	✓	✓	✓
عصاره زیر لاروهای تزریق شده با قارچ *B. bassiana*	Bud	✓	✓	✓
عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *E. coli*	Ecu	✓	✓	✓
عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *E. coli*	Ecd	✓	✓	✓
عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *B. thuringiensis*	Btu	✓	✓	✓
عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *B. thuringiensis*	Btd	✓	✓	✓
عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق نشده	CLu	✓	✓	✓
عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق نشده	Cld	✓	✓	✓
بافر فسفات سالین	PBS	×	×	×
ترتیون x100	T	×	×	×

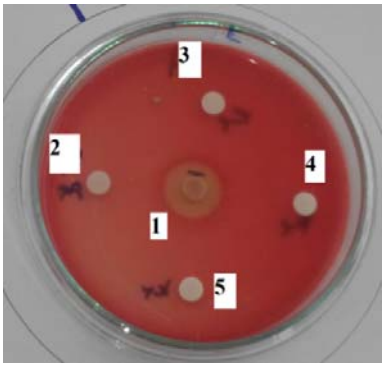
بررسی فعالیت ضد باکتریایی: در آزمایشگاه از کشت ۲۴ ساعته باکتری *E. coli* (ATCC 25922) ، غلظتی معادل استاندارد نیم مک‌فارلند تهیه و توسط سواپ استریل با روش کشت خطی بر روی پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار، کشت یکنواخت داده شد. سپس در شرایط کاملاً استریل، ۲۰میکرولیتر از غلظت های تیمار های مختلف (جدول ۱) به هر دیسک بلانک تلقیح و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد تا خشک شود. در ادامه، بر روی هر پلیت حاوی باکتری، 4دیسک آغشته به عصاره بدن لارو در فواصل مناسب از هم قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در ۳۷ درجه سانتیگراد، قطر هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری شد.

بررسی فعالیت همولیزی

بر اساس روش نشر شعاعی (RDA): در این روش از محیط کشت بلاد آگار (Blood agar) استفاده گردید، برای هرکدام از خون های انسان، گوسفند و مرغ بصورت جداگانه، سوسپانسیون ۷٪ از خون هریک به محیط آگار خونی ۴۵ درجه سانتی‌گراد اضافه و در پلیت کشت میکروبی ریخته شد. آگار خونی با حل کردن ۴۰ گرم از پودر آگار خونی در ۱ لیتر آب و ۱۵ دقیقه اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد بدست آمد. بعد از آن‌که محیط کشت آگار خونی به حالت جامد درآمد، با پانچر سوراخ هایی به تعداد غلظت های استفاده شده عصاره و همچنین کنترل مثبت و منفی همولیز (تریتون X-100 (۱٪) و بافر (PBS) در آن ایجاد شد. بعد از آن در داخل چاهک های ایجاد شده، ۵ میکرولیتر از غلظت های مختلف عصاره و همچنین در دو چاهک، کنترل های مثبت و منفی تزریق شد. پلیت‌ها در داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه بمدت ۱۸ ساعت قرار داد شد. بعد از گذشت زمان مورد نظر، شعاع هاله ی ایجاد شده (بر حسب میلی‌متر) بر روی محیط کشت بیانگر میزان همولیز سلول های خونی است. از یک کنترل مثبت (تریتون) و یک کنترل منفی (PBS) استفاده شد و مابقی نمونه ها با توجه به کنترل های مثبت و منفی سنجیده شدند (شکل ۱) (۱، ۱۵).

بر اساس جذب: برای سنجش فعالیت همولیتیک، ۵ میلی لیتراز خون تازه انسان، گوسفند و مرغ به درون یک لوله هپارینه ریخته شد. سپس این نمونه‌ها خونی به مدت ۵ دقیقه در دور ۴۵۰۰ سانتریفیوژ گردید تا سلول‌های خون جدا شوند. سپس رسوب حاصل، پنج بار با استفاده از ۴

میلی‌لیتر بافر فسفات سالین(PBS) شسته شد و بار دیگر در دور ۴۵۰۰ سانتریفیوژ گردید تا محلول رویی کاملا شفاف شود. در آخرین مرحله از خالص سازی، سلول‌های قرمز خون توسط ۲۰ میلی‌لیتر بافر (PBS) رقیق گردید.



شکل ۱- بررسی تست همولیز به روش نشر شعاعی بر روی محیط کشت بلاد آگار: ۱) ترتیون x۱۰۰؛ ۲) با غلظت ۰/۵ mg/ml. عصاره زیر لاروهای تزریق شده با قارچ *B. bassiana* با غلظت ۰/۵ mg/ml؛ ۳) عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *E. coli* با غلظت ۰/۵ mg/ml؛ ۴) عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *B. thuringiensis* با غلظت ۰/۵ mg/ml؛ ۵) عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق نشده با غلظت ۰/۵ mg/ml.

برای سنجش همولیز، ۱۰ میکرولیتر از سریال غلظتی پپتیدها که در بخش قبل آماده شد به لوله های میکرو فیوژ که شامل ۱۹۰ میکرولیتر سلول‌های خونی رقیق شده بود، اضافه گردید. میکروفیوژها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفوژ برداشته شد و با بافر (PBS) رقیق گردید تا حجم نهایی به ۱ میلی‌لیتر برسد. جذب لوله‌ها در طول موج ۵۶۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. از تریتیون X-100 (۱٪) که باعث لیز شدن کامل سلول‌های قرمز خون می‌شود و بافر (PBS)، به عنوان کنترل استفاده شد. در نهایت نتایج با نمونه کنترل مقایسه گردید (۱، ۱۵).

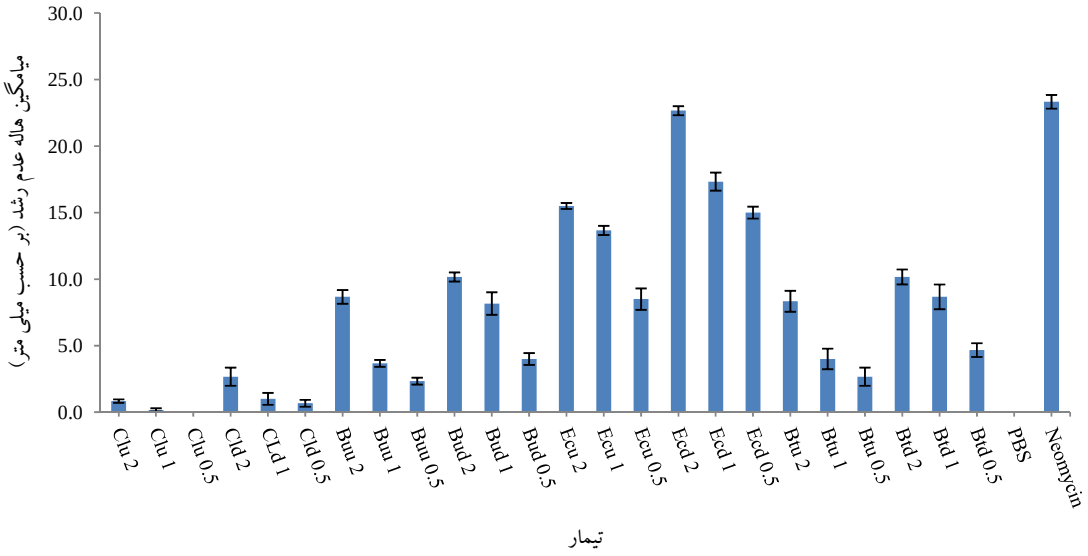
تجزیه تحلیل آماری: این آزمایش ۱۰ تیمار، سه غلظت و در سه تکرار با دو روش جذبی و نشر شعاعی انجام شد. نتایج با استفاده نرم افزار SAS 9.1.3 و مقایسه میانگین با آزمون توکی با احتمال یک درصد تجزیه و تحلیل گردید ($P<0.001$).

نتایج

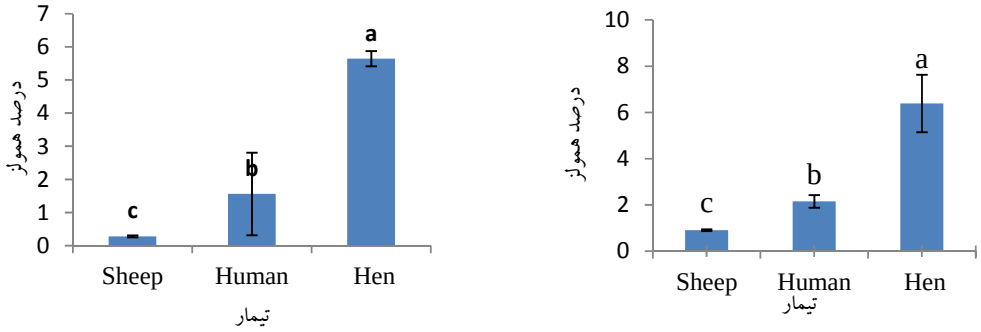
نتایج بررسی فعالیت ضد باکتریایی: برای ارزیابی قدرت ضد میکروبی، عصاره خام لاروها تزریق نشده و تزریق شده با سویه‌های استاندارد جدایه قارچ *B. bassiana*، باکتری گرم مثبت *B. thuringiensis* و باکتری گرم منفی *E. coli* با سه غلظت از هر از عصاره (روی فیلتر و زیر فیلتر) بر روی باکتری *E. coli* (جدول ۱) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل این آزمون به روش انتشار دیسک در نمودار ۲ آمده است. نتایج نشان می‌دهد بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد در تیمار های نئومایسین با میانگین (۰/۵۲±۲۳/۳میلی‌متر) و عصاره زیر فیلتر بدن لاروهای تزریق شده با باکتری *E. coli* با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی لیتر (با نام اختصاری Ecd2) با میانگین (۰/۳۴±۲۲/۷میلی‌متر) مشاهده گردید که نسبت به سایر تیمارها در سطح یک درصد اختلاف معنی داری داشتند($P<0/0001$). در اکثر تیمار ها نسبت به تیمار بافر PBS قطر هاله عدم رشد مشاهده گردید. همچنین در بیشتر تیمارها با افزایش غلظت میانگین قطر هاله عدم رشد بیشتر مشاهده گردید.

نتایج بررسی فعالیت همولیزی: نتایج حاصل از انجام آزمایشات بررسی میزان همولیز به صورت میانگین درصد همولیز در برابر غلظت نشان داده شده است. همان‌گونه که در نمودار ۲ نشان داده شده است، با مقایسه فعالیت لیزکنندگی بین سه گروه خونی انسان، گوسفند و مرغ به طور کلی نتایج مشاهده شده چنین بود؛ فعالیت همولیتیکی در هر سه گروه خونی در هر دو روش جذب و نشر شعاعی (شکل ۱) نسبت به تریتون X-100 به عنوان کنترل مثبت خیلی کمتر بود و اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد ثبت گردید. بیشترین فعالیت همولیتیک بترتیب در خون مرغ با میانگین کل (6/39±1/24 درصد در روش

جذبی و ۵/۶۴±۱/۲۵ درصد در روش نشر شعاعی)، سلول‌های خونی انسان با میانگین کل (2/15±0/27 درصد در روش جذبی و ۱/۵۶±۰/۲۳ درصد در روش نشر شعاعی) و گوسفند با میانگین کل (0/91±0/04 درصد در روش جذبی و ۰/۲۸±۰/۰۳ درصد در روش نشر شعاعی) مشاهده گردید.

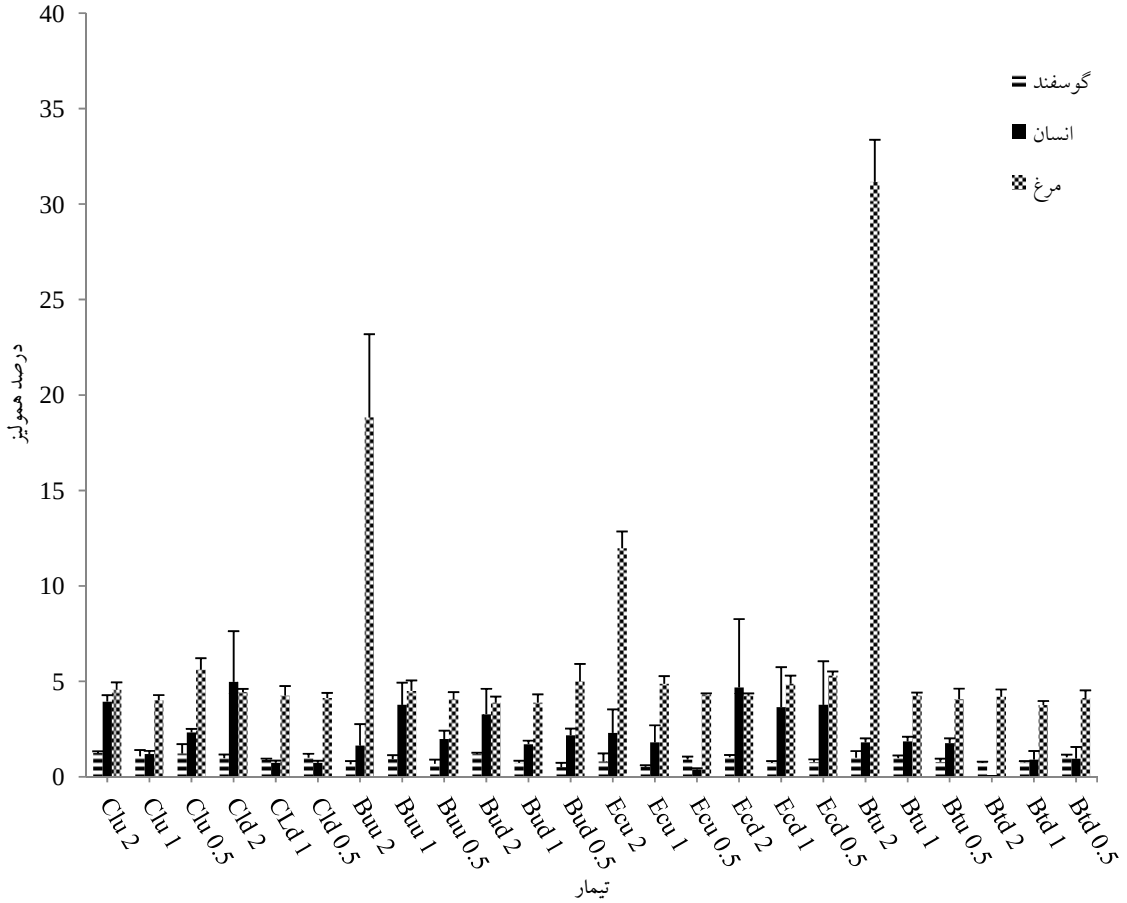


نمودار ۱ – بررسی فعالیت ضدمیکروبی غلظت‌های مختلف تیمار های متفاوت به روش اندازه گیری قطر هاله‌های عدم رشد بر روی باکتری *E. coli*. (Buu) عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با قارچ *B. bassiana*؛ (Bud) عصاره زیر لاروهای تزریق شده با قارچ *B. bassiana*؛ (Ecu) عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *E. coli*؛ (Ecd) عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *E. coli*؛ (Btu) عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *B. thuringiensis*؛ (Btd) عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *B. thuringiensis*؛ (Cld) عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق نشده ؛ (Clu) عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق نشده.



نمودار ۲– بررسی درصد اثرات همولیتیک کل به روش جذب(الف) و به روش نشر شعاعی (ب) بر روی گلبول‌های قرمز گوسفند (Sheep)، انسان (Human) و مرغ (Hen). حروف غیر مشابه در سطح یک درصد اختلاف معنی داری دارند.

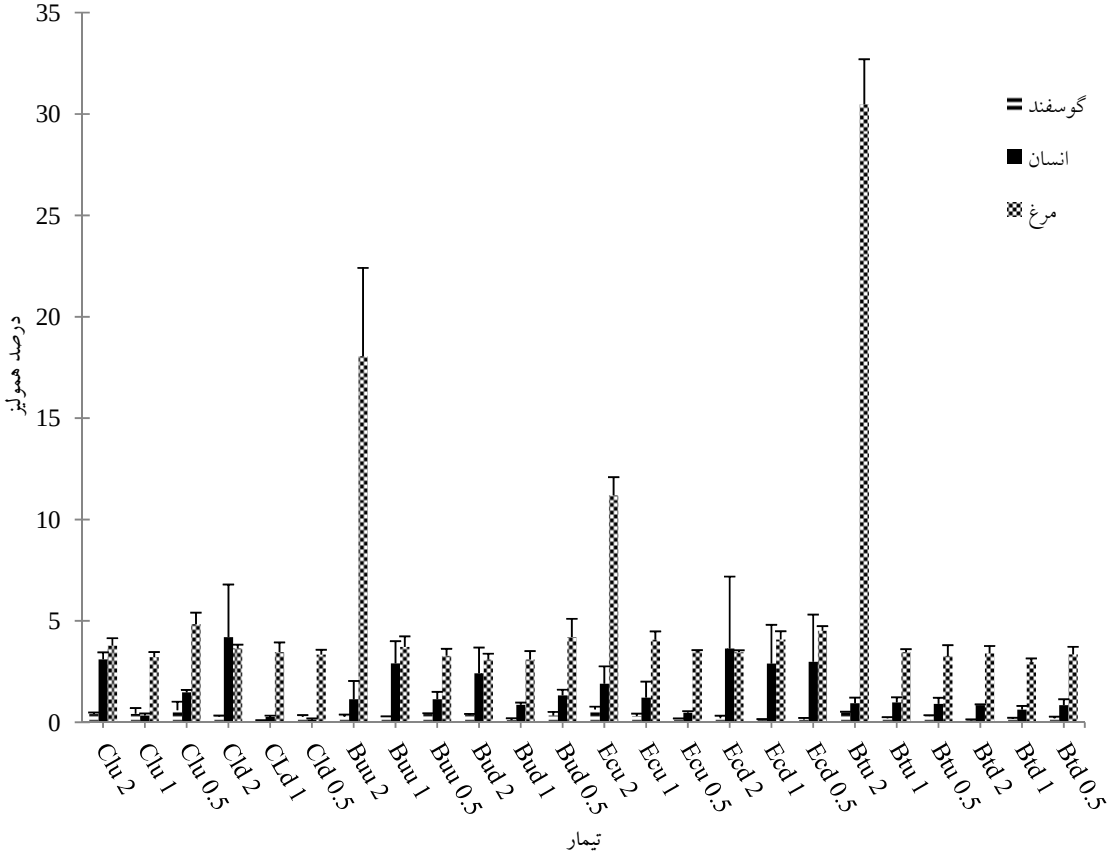
در بین تیمارهای مختلف در گروه خونی مرغ بیشترین فعالیت همولیتیک بترتیب در بالاترین غلظت (۲ میلی گرم بر میلی لیتر) عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری*B. thuringiensis* (Btu) با میانگین (31/17±2/20 درصد در روش جذبی و30/47±0/28 درصد در روش نشر شعاعی) ، عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با قارچ *B. bassiana* (Buu) با میانگین (18/83±4/36 درصد در روش جذبی و 18/05±0/91 درصد در روش نشر شعاعی) و عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با *E. coli* (Ecu) با میانگین (11/98±0/88 درصد در روش جذبی و 11/19±0/85درصد در روش نشر شعاعی) فعالیت همولیزی از خود نشان دادند این سه تیمار نسبت به هم و همچنین نسبت به سایر تیمارهای هر سه گروه خونی مرغ، انسان و گوسفند در هر دو روش جذب و نشر شعاعی در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری داشتند. به جز این سه تیمار مابقی تیمارها همه در یک گروه آماری قرار گرفتند. ولی در کل نسبت به تیمار تریتون X-100، در سطح یک درصد (P < 0/001) اختلاف معنی داری داشتند(نمودارهای ۳ و ۴). به گونه‌ای که در بالاترین غلظت (۲ میلی گرم بر میلی لیتر) در مقایسه با تریتون X-100، فعالیت همولیزی بسیار ناچیز بر روی سلول‌های خونی نشان می‌دهد (P<0/001).



نمودار ۳- بررسی درصد اثرات همولیتیک غلظت‌های مختلف تیمار های متفاوت به روش جذب بر روی گلبول‌های قرمز گوسفند (Sheep)، انسان (Human) و مرغ (Hen).

(Buu) عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با قارچ *B. bassiana*؛ (Bud) عصاره زیر لاروهای تزریق شده با قارچ *B. bassiana*؛ (Ecu) عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *E. coli*؛ (Ecd) عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *E. coli*؛ (Btu) عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق

شده با باکتری *B. thuringiensis*؛ (Btd) عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *B. thuringiensis*؛ (Cld) عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق نشده ؛ (Clu) عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق نشده. تمام تیمارها در مقایسه با تیمار تریتیون X-100 (۱٪) در سطح پنج درصد اختلاف معنی داری دارند.



نمودار ۴- بررسی درصد اثرات همولیتیک غلظت‌های مختلف تیمار های متفاوت به روش نشر شعاعی بر روی گلبول‌های قرمز گوسفند (Sheep)، انسان (Human) و مرغ (Hen).

(Buu) عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با قارچ *B. bassiana*؛ (Bud) عصاره زیر لاروهای تزریق شده با قارچ *B. bassiana*؛ (Ecu) عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *E. coli*؛ (Ecd) عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *E. coli*؛ (Btu) عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *B. thuringiensis*؛ (Btd) عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *B. thuringiensis*؛ (Cld) عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق نشده ؛ (Clu) عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق نشده. حروف غیر مشابه در سطح یک درصد اختلاف معنی داری دارند.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که بطور کلی عصاره بدن لاروهای کرم گلوگاه انار دارای فعالیت ضد میکروبی بر روی باکتری *E. coli* و عدم فعالیت همولیزی بر روی خون انسان، گوسفند (پستاندارن) و مرغ (پرندگان) داشت. در تیمارهای عصاره های بدن القاء شده توسط *B. bassiana*، *B. thuringiensis* و *E. coli* نسبت به عصاره القاء نشده و عصاره های زیر فیلتر نسبت به عصاره های روی فیلتر فعالیت ضد میکروبی بیشتری مشاهده گردید. همچنین با افزایش غلظت عصاره ها فعالیت ضد میکروبی افزایش یافت. در بررسی سایر محقیقن که بر روی عصاره بدن و همولنف استخراج شده از حشرات و سایر جانوران داشتند فعالیت ضد میکروبی آنها را گزارش کرده‌اند. در

بررسی‌های اثرات ضد میکروبی همولنف القاء شده و القاء نشده سوسری آمریکایی بر روی پاتوژن های بیمارستانی انجام دادند بیشترین فعالیت ضد باکتریایی در همولنف القاء شده و با افزایش غلظت فعالیت ضد باکتریایی نیز بیشتر گزارش گردیده است(۱۰). نتایج بررسی همولیزی نشان داد که عصاره بدن لاروها در بیشتر تیمارها فاقد فعالیت همولیتیکی بودند. عدم فعالیت ضد همولیزی ترکیبات استخراج شده از حشرات بر روی سلول‌های خونی پستانداران در بیتر تحقیقات به اثبات رسیده است(۱۲–۱۵). در این تحقیق بر روی خون مرغ (پرندگان) فقط در بالاترین غلظت در هرسه عامل میکروبی دارای مقدار کمی فعالیت همولیزی بود. فعالیت همولیزی روی سلول‌های خونی مرغ ممکن است به خاطر ساختار متفات گلبول‌های قرمز پرندگان با پستانداران باشد. چون که گلبول‌های قرمز پرندگان دارای هسته، بیضی شکل و ولی گلبول قرمز پستانداران فاقد هسته و به شکل دیسکی که در وسط از دو طرف فرو رفتگی دارد. همچنین گلبول-های قرمز پرندگان عمر کوتاه تر از پستانداران نباشد که به دلیل بیشتر بودن درجه حرارت و بالا بودن سوخت و ساز بدن آن‌ها است (۱۶، ۱۷). همچنین نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت همولیزی در تیمارهای عصاره‌های روی غشاء مشاهده گردید و تیمارهای عصاره زیر غشاء دارای کمترین فعالیت همولیزی بودند(۱۵). که در اکثر تحقیقات صورت گرفته در زمینه بررسی فعالیت ضد میکروبی از عصاره زیر فیلتر استفاده گردیده است (۱، ۱۲، ۱۵). در بررسی فعالیت ضد باکتریایی و فعالیت همولیزی عصاره استخراج شده بدن لاروهای کرم گلوگاه انار برای اولین بار در دنیا بررسی گردید. نتایج نشان داد که این عصاره دارای خواص ضد میکروبی نسبتا خوب و فعالیت همولیتیکی خیلی پایین می باشد و می توان پیشنهاد داد که عوامل ضد میکروبی آن خالص سازی، توالی یابی و اثر سمیت این آنها بر روی مدل حیوانی مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

1- Asoodeh, A., Zardini, H.Z. and Chamani, J., (2012). Identification and characterization of two novel antimicrobial peptides, temporin-Ra and temporin-Rb, from skin secretions of the marsh frog (Rana ridibunda). *Journal of Peptide Science*, 18(1), pp.10-16.

2- Bulet, P., Stöcklin, R., & Menin, L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological reviews*, 198 (1), 169-184.

3- Chou, H. T., Kuo, T. Y., Chiang, J. C., Pei, M. J., Yang, W. T., Yu, H. C., & Chen, W. J. (2008). Design and synthesis of cationic antimicrobial peptides with improved activity and selectivity against Vibrio spp. *International journal of antimicrobial agents*, 32 (2), 130-138.

4- Dathe, M., & Wieprecht, T. (1999). Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1462 (1), 71-87.

5- Einhorn, T. A. (1998). The cell and molecular biology of fracture healing.*Clinical orthopaedics and related research*, 355, S7-S21.

6- Hancock, R. E., & Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology*, 24 (12), 1551.

7- Helmerhorst, E. J., Reijnders, I. M., van't Hof, W., Veerman, E. C., & Nieuw Amerongen, A. V. (1999). A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS letters*, 449 (2-3), 105-110.

8- Horie, T., Sugiyama, Y., Awazu, S., & Hanano, M. (1981). The correlation between drug binding to the human erythrocyte and its hemolytic activity. *Journal of pharmacobio-dynamics*, 4 (2), 116-122.

9- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 19(3), 491-511.

10- Latifi, M., Alikhani, M.Y., Salehzadeh, A., Nazari, M., Bandani, A.R. and Zahirnia, A.H., 2015. The antibacterial effect of American cockroach hemolymph on the nosocomial

pathogenic bacteria. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 2(1).

11- Litman, G. W., Litman, R. T., & Henry, C. J. (1976). Analysis of lipophilic carcinogen-membrane interactions using a model human erythrocyte membrane system. *Cancer research*, 36 (2 Part 1), 438-444.

12- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (1997). *Brock biology of microorganisms* (Vol. 11). Upper Saddle River, NJ: Prentice hall.

13- Malmsten, M., Kasetty, G., Pasupuleti, M., Alenfall, J., & Schmidtchen, A. (2011). Highly selective end-tagged antimicrobial peptides derived from PRELP. *PloS one*, 6 (1), e16400.

14- Matsuzaki, K., Sugishita, K., Fujii, N., & Miyajima, K. (1995). Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemistry*, 34 (10), 3423-3429.

15- Memarpoor-Yazdi, M., Zare-Zardini, H. and Asoodeh, A., (2013). A novel antimicrobial peptide derived from the insect Paederus dermatitis. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 19 (2), pp.99-108.

16- Mohammed, Kh.A., Toson, M.A. & Hassanien, H.H.M. (2010). Effects of phytase supplementation on performance and egg quality of laying hens fed diets containing rice bran. Egyptian Journal of Poultry Science, 30, 649-659. 15.

17- Mohsinzadeh, M., Nobakht, A. & Safamehr, A. R. (2013). Effects of different levels of crude protein and probiotic (Protexin) on performance and blood metabolites of laying hens. Animal Science Journal (Pajouhesh& Sazandegi), 103, 133-144.

18- Oyedapo, O. O., & Famurewa, A. J. (1995). Antiprotease and membrane stabilizing activities of extracts of Fagara zanthoxyloides, Olax subscorpioides and Tetrapleura tetraptera. *International Journal of Pharmacognosy*, 33 (1), 65-69.

19- Robertis FA, Robertis EMH (1995). Cell and molecular biology in: cell membrance Saunders London, pp. 239-245.

20- Rosenthal, A. Z., & Elowitz, M. B. (2012). Following evolution of bacterial antibiotic resistance in real time. *Nature genetics*, 44 (1), 11-13.

21- Schaufuss, P. and Steller, U., (2003). Haemolytic activities of Trichophyton species. *Medical mycology*, 41 (6), pp.511-516.

22- Sessa, G., & Weissmann, G. (1968). Effects of four components of the polyene antibiotic, filipin, on phospholipid spherules (liposomes) and erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 243 (16), 4364-4371.

23- Thomas, A., Kohler, M., Mester, J., Geyer, H., Schänzer, W., Petrou, M., & Thevis, M. (2010). Identification of the growth-hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in a nutritional supplement. *Drug testing and analysis*, 2 (3), 144-148.

24- Torrent, M., Andreu, D., Nogués, V. M., & Boix, E. (2011). Connecting peptide physicochemical and antimicrobial properties by a rational prediction model. *PloS one*, 6 (2), e16968.

25- Vale, P. F., Fenton, A., & Brown, S. P. (2014). Limiting damage during infection: lessons from infection tolerance for novel therapeutics. *PLoS biology*, 12 (1), e1001769.

26- Warner, R. L. 1988. Contributions to the biology and the management of the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) in ÔDeglet NoorÕ date gardens in the Coachella Valley of California. PhD dissertation, University of California, Riverside. CA.

27- Wieprecht, T., Dathe, M., Beyermann, M., Krause, E., Maloy, W. L., MacDonald, D. L., & Bienert, M. (1997). Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes.*Biochemistry*, 36 (20), 6124-6132.

28- Zibaee, A., Bandani, A. Talaei, R. & Malagoli, D. 2011. Cellular immune reactions of the sunn pest, Eurygaster integriceps, to the entomopathogenic fungus, Beauveria bassiana and its secondary metabolites. Journal of Insect Science, 11: 138: 1-16.

The antibacterial effect of body extracts *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae) on the *Escherichia coli*

Jabaleh I.[1], Kazazi M.[1] and Asoodeh A.[2]

[1] Dept. of Plant Protection, College of Agriculture, Bu–Ali Sina University, Hamedan, Iran.

[2] Dept. of Chemistry, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Abstract

Today insects are referred to as the vast resources of modern medicines. In recent years, biotechnologists and entomologists have emphasized the bioengineering of insect proteins and the applied of their products in the treatment of diseases and modern medicine. Considered drugs in this field include powerful antimicrobials against Gram-positive and Gram-negative bacteria and HIV. The aim of this study was to evaluate the anti-bacterial and hemolytic activity of *E. ceratoniae* larvae. To stimulate carob moth larvae immune system, standard strains isolate *B. bassiana*, Gram-positive *B. thuringiensis* and Gram-negative bacteria *E. coli* were injected. The hemolytic activity of the extracted induced and non-induced hemolymph after 24 hours of injection, to two methods of optical absorption (A) and radial diffusion (RD) on fresh blood of human, sheep and hen; and the antimicrobial effect to radial diffusion method on *E. coli* was assayed. The results showed that the induction extract had antimicrobial activity in comparison with non-induced extracts. The highest antimicrobial activity was observed in *E. coli*-induced extract (sub filter extract at a concentration of 2 mg / ml) with an average of 22.7 ± 0.34 mm diameter of non-growth holes. The highest hemolytic activity was in hen blood with total mean (6/39 ± 1/24 in A method and 5/64 ±1/25 in RD method), human blood cells with total mean (2/15 ± 0/27 in A method and 1.56±0.23 RD method) and sheep with a mean total (0/91 ± 0/04% in the A method and 0/28 ± 0/03 in RD method), at the one percent level were significant differences. The results of this study showed that the extract of the carob moth larvae had a very low hemolytic effect on red blood cells, and the antimicrobial activity of the extract on E. coli was different according to the type of induction pathogen. According to the results of this study, this insect can be a good candidate for further study in complementary studies of antimicrobial activity.

Key words: Antimicrobial activity; blood; hemolysis activity; radial diffusion.