

## بررسی اثرات ضد باکتریایی زهر خام و فراکشن‌های پروتئینی زهر عقرب *Hottentotta saulcyi*

یوسف علیپور (M.Sc)، جمیل زرگان\* (Ph.D)، اشکان حاجی نورمحمدی (M.Sc)

مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه دانشگاه جامع امام حسین (علیه السلام)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۷/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۸/۲۵

jazrgan@ihu.ac.ir

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۴۹۳۴-۷۷۱۰

### چکیده

هدف: بیماری‌های عفونی ناشی از عوامل باکتریایی یکی از شایع‌ترین علل مرگ‌ومیر در سراسر جهان می‌باشند. تعداد قابل توجهی از این عوامل، به یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاوم و برخی دارای مقاومت دارویی چندگانه بوده و تعدادی دیگر تقریباً به تمام آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم مقاوم هستند. از زهر حاصل از گونه‌های متنوعی از عقرب‌ها، ترکیبات ضد میکروبی و ضد سرطانی مختلفی گزارش شده است. در بررسی حاضر، اثرات ضد باکتریایی زهر خام و فراکشن‌های پروتئینی زهر عقرب *Hottentotta saulcyi* مطالعه گردید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ابتدا الگوی الکتروفورزی و کروماتوگرافی زهر خام عقرب مطالعه و سپس خواص ضد باکتریایی زهر خام و فراکشن‌های پروتئینی آن در غلظت‌های مورد نظر بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر در شرایط آزمایشگاهی (*in-vitro*) با استفاده از سنجش حداقل غلظت مهاری با روش میکرودايلوشن (MIC) در باکتری گرم مثبت *باسیلوس سوبتیلیس* و باکتری گرم منفی *اشریشیاکلی* مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در الگوی Tricine SDS-PAGE زهر خام، ۷ باند پروتئینی با وزن مولکولی ۴/۱ تا ۱۰۴ کیلو دالتون مشاهده گردید. در مطالعات کروماتوگرافی ۱۴ پیک اصلی جداسازی و جمع‌آوری شد که ۹ فراکشن آن حاوی پروتئین بودند. نتایج این تحقیق نشان داد که زهر خام در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارای اثر مهاری معناداری بوده است. نتایج این مطالعه در مورد فراکشن‌های پروتئینی زهر خام نیز اثرات متنوعی را در باکتری‌های مورد سنجش نشان داد. نتیجه‌گیری: نتایج این بررسی برای اولین بار نشان داد که زهر خام *H. saulcyi* و برخی از فراکشن‌های پروتئینی آن دارای خواص ضد باکتریایی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: عقرب *Hottentotta saulcyi*، اثرات ضد باکتریایی، فراکشن‌های پروتئینی

### مقدمه

بیماری‌های عفونی ناشی از عوامل باکتریایی یکی از شایع‌ترین علل مرگ‌ومیر در سراسر جهان می‌باشند [۲،۱]. گزارش‌ها نشان می‌دهد که تعداد قابل توجهی از سویه‌های باکتریایی که باعث عفونت‌های بیمارستانی می‌شوند، به یک یا چند آنتی‌بیوتیک رایج مقاوم هستند. علاوه بر این، برخی از آن‌ها دارای مقاومت دارویی چندگانه بوده و برخی دیگر تقریباً به تمام آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم مقاوم از خود نشان می‌دهند [۳]. بر اساس این یافته‌ها و شواهد موجود، برای درمان افراد مبتلا به عفونت‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، معرفی انواع جدیدی از داروهای ضد میکروبی می‌بایست در دستور کار مراکز تحقیقاتی قرار گیرد [۴].

بررسی‌ها نشان می‌دهد که در حال حاضر، مولکول‌های ضد میکروبی جدید که از منابع طبیعی به دست می‌آیند، می‌توانند

جایگزین مفیدی برای درمان عوامل بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های رایج باشند. اکثر این مولکول‌ها پپتیدهای ضد میکروبی (AMP) Antimicrobial Peptide هستند، که در ترکیبات حیاتی موجودات مختلف از جمله حشرات، عنکبوتیان و زهر هزارپایان وجود دارند [۵]. یافته‌ها نشان می‌دهد که ترکیبات فراوانی به خصوص پپتید، در زهر بسیاری از جانوران سمی وجود دارد که به‌طور قابل توجهی دارای فعالیت ضد باکتریایی می‌باشند. تا به حال مطالعات مختلفی روی خواص ضد باکتریایی زهر زنبورعسل، مورچه، عنکبوت، مار و به‌ویژه عقرب انجام گرفته است [۵]. از زهر گونه‌های متنوعی از عقرب‌ها ترکیبات ضد میکروبی و باکتریایی مختلفی گزارش شده است [۶]. بسیاری از این ترکیبات علیه باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی اثرات متفاوت دارند [۷].

غلظت مهارى (MIC) در باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت استفاده شد [۲۰].

باکتری مورد استفاده، باکتری غیر بیماری‌زا گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis subsp. spizizenii*, ATCC 6633) و باکتری گرم منفی اشرشیاکلی (*Escherichia coli* ATCC 25922)، از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران (Persian type culture collection) تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

مطالعه الگوی الکتروفورزیس زهر خام با استفاده از روش SDS-PAGE. به منظور مطالعه الگوی الکتروفورزی زهر خام عقرب از ژل ۱۲٪ تریسین SDS-PAGE استفاده شد. به هر کدام از چاهک‌ها ۱۰-۵ میکرولیتر محلول زهر خام (دارای ۲۰ تا ۱۵ میکروگرم پروتئین) دناتوره شده با حجم مناسبی از بافر نمونه تزریق گردید. جهت تخمین وزن مولکولی باندهای پروتئینی از پروتئین استاندارد نشان‌دار استفاده شد. الکتروفورز در جریان ثابت ۱۵ میلی‌آمپر تا عبور پروتئین‌ها از بخش مترکم ژل و جریان ثابت ۳۰ میلی‌آمپر برای ادامه فرایند ران تا زمان رسیدن رنگ ردیابی به نزدیکی انتهای کاست ژل ادامه یافت. پس از رنگ‌آمیزی ژل با رنگ نیترا نقره و حذف رنگ اضافی از سطح ژل به وسیله محلول رنگ‌بر، وزن مولکولی تخمینی باندهای پروتئینی زهر خام تعیین گردید. مزیت استفاده از تریسین به جای گلیسین در الکتروفورز، بار منفی بیشتر آن نسبت به گلیسین و قدرت یونی بالاتر آن است که باعث حرکت سریع‌تر یون‌ها نسبت به پروتئین‌ها می‌شود. این امر باعث می‌شود پروتئین‌های با وزن مولکولی کم‌تر، در درصد کم‌تری از ژل اکریل آمید جدا شوند. بنابراین منجر به تفکیک بهتر پروتئین‌های کوچک (به خصوص در محدوده ۲۰-۵ کیلو دالتون) می‌شود [۲۲،۲۱].

جداسازی فراکشن‌های زهر خام با استفاده از کروماتوگرافی مایع فاز معکوس (RP-HPLC). فراکشن‌های زهر خام عقرب با استفاده از RP-HPLC تهیه‌ای با آشکارساز UV (جذب ۲۲۰ نانومتر)، ستون C18 SUPELCOSIC TM [250mm×21.2mm, 12µm] Pcc-18(18(59185) و برنامه خطی گرادیان [بافر A (استونیتریل ۲۰٪ حاوی ۰/۱٪ TFA) و بافر B (استونیتریل ۸۰٪ حاوی ۰/۱٪ TFA)] و زمان ۷۰ دقیقه‌ای جداسازی گردید. در روش فاز معکوس از یک فاز متحرک قطبی و فاز ساکن غیر قطبی استفاده و جداسازی مواد با استفاده از ویژگی هیدروفوبیسیته انجام می‌گیرد. برای جداسازی فراکشن‌های زهر خام، ۴۰ میلی‌گرم پودر خشک شده آن در ۲۰ میلی‌لیتر از بافر (آب حاوی ۰/۱٪ TFA) دارای ۵٪ استونیتریل، حل و به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه

به دلیل تنوع ساختاری و خاصیت شیمیایی پپتیدهای ضد میکروبی مستخرج از زهر عقرب‌ها، احتمال مقاومت میکروب‌ها به آن‌ها بسیار کم‌تر از آنتی‌بیوتیک‌های معمول است. این مطالعات نشان داده است که برخی از پپتیدهای موجود در زهر عقرب‌ها برای معرفی داروهای جدید با خاصیت ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد ویروسی [۹،۸] و نیز فعالیت ضد انگلی [۱۰] و عفونت‌های ویروس HIV (human immunodeficiency viruses) [۱۱] مورد توجه بسیاری از محققین حوزه علوم پزشکی قرار گرفته‌اند. امروزه با در نظر گرفتن شناسایی مولکول‌های فعال بیولوژیکی از زهر خام عقرب، ممکن است برخی از پپتیدهای موجود در آن به‌عنوان جایگزین‌هایی برای آنتی‌بیوتیک‌ها رایج در نظر گرفته شوند [۱۲].

زهر عقرب‌ها دارای ویژگی‌های منحصر به فرد در رابطه با فیزیولوژی، ترکیب و اثرات فارماکولوژیک خود می‌باشند. این خصوصیات عمدتاً در خانواده *Buthidae* مشاهده شده است [۱۳]. تاکنون، ۵۹ گونه عقرب در ایران گزارش شده است که بیش از ۸۴٪ از این گونه‌های شناسایی شده متعلق به خانواده *Buthidae* می‌باشد [۱۴]. بیش از ۹۰٪ عقرب‌های خطرناک جهان و نیز ایران از عقرب‌های خانواده *Buthidae* هستند. جنس *Hottentotta* یکی از گسترده‌ترین جنس‌ها از خانواده *Buthidae* می‌باشد که در آفریقا، خاورمیانه و آسیا یافت می‌شود که در ایران حداقل ۵ گونه از عقرب‌های این خانواده از جمله *Hottentotta saulcyi* یافت می‌شود [۱۵]. عقرب *H. saulcyi* یا عقرب دم‌سیاه به لحاظ پزشکی یکی از مهم‌ترین گونه‌های عقرب‌ها در ایران، ترکیه، سوریه و عراق است [۱۷،۱۶]. زهر این عقرب مانند دیگر عقرب‌های خانواده *Butidae* از مخلوط ناهمگونی از آنزیم‌ها و پلی‌پپتیدهای مضر سمی تشکیل شده است که وزن مولکولی پایینی (۴-۷ دالتون) دارند [۱۹،۱۸]. در این مطالعه خواص ضد باکتریایی زهر خام و فراکشن‌های پروتئینی عقرب *H. saulcyi* مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

تهیه زهر و پروتئین‌سنجی. در این بررسی، زهر مورد استفاده از موسسه سرم‌سازی رازی تهیه شد. در ادامه، ابتدا پودر لیوفیلیزه شده زهر خام عقرب و فراکشن‌های جداسازی شده از آن، در محلول بافر فسفات استریل به‌صورت سوسپانسیون درآمده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری و پس از پروتئین‌سنجی به روش برادفورد (Bradford 1976)، جهت انجام تست‌های ضد باکتریایی و سنجش حداقل

میکروگرم در میلی‌لیتر) به‌عنوان کنترل مثبت، محیط کشت حاوی باکتری به‌عنوان کنترل منفی و از محیط کشت فاقد باکتری به‌عنوان بلانک استفاده شد. درصد مهار ناشی از تأثیر زهر و آنتی‌بیوتیک استاندارد بر باکتری‌های تحت سنجش با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید [۲۶].

$$100 \times [1 - (a/b)] = \text{درصد مهار باکتری}$$

جذب نوری نمونه منهای جذب نوری بلانک = a

جذب نوری کنترل منفی منهای جذب نوری بلانک = b

آنالیز آماری. نتایج تست به‌صورت  $\text{Mean} \pm \text{SD}$  گزارش و داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار (GraphPad InStat) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. غلظت‌های مختلف زهر نسبت به گروه کنترل و همچنین نسبت به یک‌دیگر، با آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way Anova) و آزمون توکی بررسی گردید.  $P < 0.05$  به‌عنوان معنی‌دار بودن نتایج در نظر گرفته شد. ترسیم نمودارها در فضای نرم‌افزار Microsoft Excel نسخه ۲۰۱۳ انجام گرفت.

## نتایج

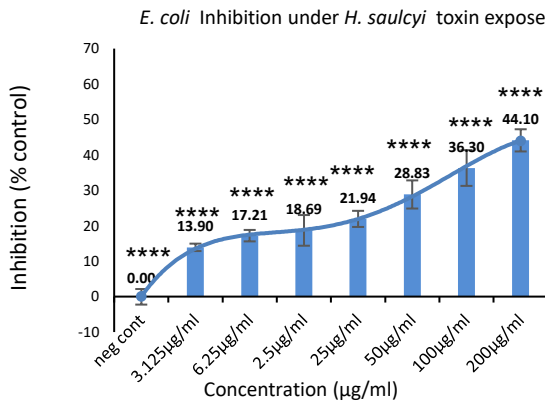
نتایج بررسی الگوی الکتروفورزی و کروماتوگرافی زهر خام. وزن مولکولی باندهای پروتئینی با ترسیم منحنی استاندارد لگاریتم وزن مولکولی باندها در مقابل تحرک نسبی (Rf) که مسافت طی شده توسط پروتئین تخمین زده شد. نتایج حاصل از ژل ۱۲٪ Tricine SDS-PAGE نشان داد که هفت باند پروتئینی با وزن مولکولی از ۴/۱ تا ۱۰۴ در زهر خام عقرب قابل مشاهده است (شکل ۱). همچنین از زهر خام، تعداد ۱۴ فراکشن جداسازی و جمع‌آوری گردید. نتایج حاصل از کروماتوگرافی HPLC زهر خام عقرب و پیک‌های جدا شده و زمان خروج هر پیک (Retention time) در جدول زیر و شکل ۲ آمده است. نتایج پروتئین‌سنجی نشان داد که از مجموع ۱۴ فراکشن فوق، فراکشن‌های ناظر به پیک‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۵ و ۱۴ فاقد پروتئین بوده‌اند.

بررسی خواص ضد باکتریایی زهر خام در باکتری‌های مورد مطالعه. پس از بررسی نتایج مشخص گردید که درصد مهار رشد باکتری اشریشیاکلی در حضور غلظت‌های ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از زهر خام به ترتیب ۱۳/۹۰، ۱۷/۲۱، ۱۸/۶۹، ۲۱/۹۴، ۲۸/۸۳،

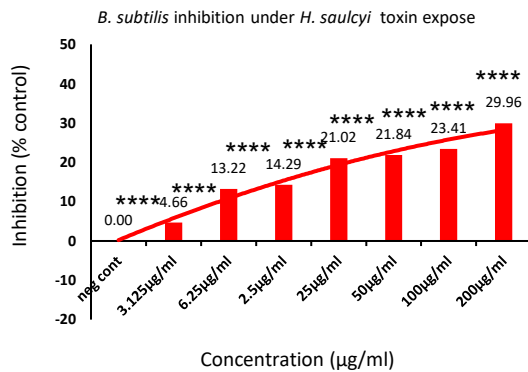
سانتی‌گراد قرار داده شد. مواد نامحلول پس از سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰/۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد از سوسپانسیون جدا گردید. محلول رویی جهت تهیه الگوی کروماتوگرافی و جداسازی فراکشن‌ها توسط HPLC استفاده شد. فراکشن‌های متناظر با هر پیک در شیشه‌های کاملاً تمیز و عاری از هرگونه آلودگی جمع‌آوری و پس از لیوفیلیز کردن، در دمای ۸۰- نگهداری شد. زمان خروج هر پیک (Retention time) برای هر کدام از پیک‌ها ثبت گردید (شکل ۲ و جدول ۱) [۲۳].

محیط کشت و آنتی‌بیوتیک. جهت کشت باکتری از محیط کشت مایع مولر هینتون برات (MHB) شرکت Quelab کانادا و جهت مقایسه اثر زهر با آنتی‌بیوتیک استاندارد از تتراسایکلین (Sigma, USA) در غلظت ۵۰  $\mu\text{g/ml}$  استفاده شد.

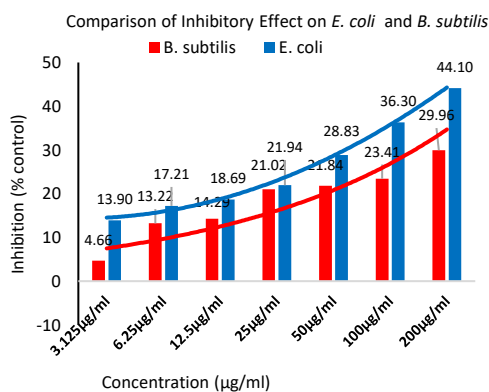
سنجش حداقل غلظت مهار زهر خام و فراکشن‌های پروتئینی آن به روش میکرودیالوژن (MIC assay). MIC کم‌ترین غلظت عامل ضد میکروبی (حداقل غلظت مهار) است که به‌طور کامل مانع از رشد ارگانیزم در لوله یا چاهک‌های میکرودیالوژن که توسط چشم غیرمسلح تشخیص داده می‌شود می‌گردد [۲۴]. پس از کشت شبانه باکتری در محیط مولر هینتون برات و تهیه ساب کالچر از کشت شبانه، میزان ۵ میکرولیتر از محیط کشت جدید باکتری با غلظت نیم مک فارلند [۲۵] در هر چاهک از پلیت استریل ۹۶ خانه کشت شد. ضمن رساندن حجم نهایی هر چاهک با استفاده از محیط کشت مایع (مولر هینتون برات) به ۱۰۰ میکرولیتر با استفاده از سریال رقت، باکتری در تماس با غلظت‌های ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از زهر خام قرار گرفت. در ادامه فعالیت ضد باکتریایی فراکشن‌های پروتئینی جدا شده از زهر خام به‌وسیله HPLC تعیین گردید. در ابتدا سنجش میکرودیالوژن برای فراکشن‌های دارای پروتئین برای غلظت‌های ۵ تا ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر انجام و در ادامه بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، این سنجش برای برخی از فراکشن‌ها در غلظت‌های بالاتر از ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای بقیه فراکشن‌ها در غلظت‌های پایین‌تر از ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر انجام شد. میزان رشد باکتری‌های اشریشیاکلی و باسیلوس سوبتیلیس در شرایط in-vitro و پس ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. طی فرایند بررسی از هیچ ماده‌ای به‌عنوان ماده نشانگر اضافی استفاده نشد و جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۶۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه پلیت ریدر (Biotek, USA) اندازه‌گیری شد. این آزمایش ۳ بار تکرار و در هر بار برای هر غلظت ۳ چاهک در نظر گرفته شد. طی این فرایند، از تتراسایکلین (۵۰



شکل ۳. درصد مهار رشد باکتری گرم منفی اشریشیاکلی ( $1/5 \times 10^8$  باکتری در هر چاهک) در حضور غلظت‌های ۳/۱۲۵ تا ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر زهر خام عقرب *H. saulcyi* در سنجش MIC

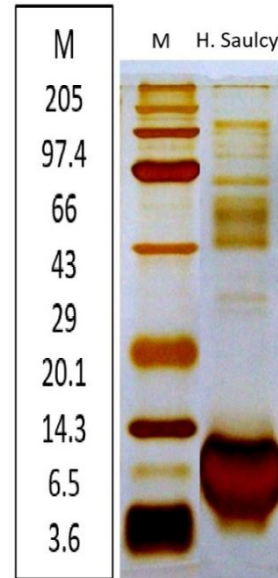


شکل ۴. درصد مهار رشد باکتری گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس ( $1/5 \times 10^8$  باکتری در هر چاهک) در حضور غلظت‌های ۳/۱۲۵ تا ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر زهر خام عقرب *H. saulcyi* در سنجش MIC. \*میزان معنادار بودن در مقایسه با کنترل مثبت (\*\*\*)  $p < 0.001$

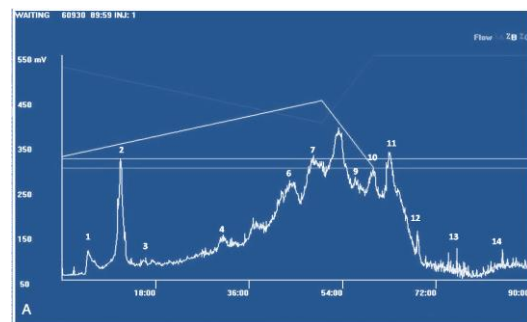


شکل ۵. مقایسه درصد مهار رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس و اشریشیاکلی ( $1/5 \times 10^8$  باکتری در هر چاهک) در حضور غلظت‌های ۳/۱۲۵ تا ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر زهر خام عقرب *H. saulcyi* در سنجش MIC

۳۶/۳۰ و ۴۴/۱۰ بوده است (شکل ۳). این مقادیر در مورد باکتری باسیلوس سوبتیلیس به ترتیب ۴/۶۶، ۱۳/۲۲، ۱۴/۲۹، ۲۱/۰۲، ۲۱/۸۴، ۲۳/۴۱، ۲۹/۹۶ بوده است (شکل ۴). زهر خام در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (در مقایسه با کنترل منفی) دارای بیش‌ترین اثر مهاری بر روی رشد باکتری‌های مورد مطالعه بوده که در مقایسه با کنترل مثبت (تتراسایکلین ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) قابل توجه و از نظر آماری تفاوت تأثیر آن‌ها معنادار است. مقایسه اثر مهاری در دو سویه مورد بررسی، در شکل ۵ آمده است.



شکل ۱. باندهای پروتئینی رنگ‌آمیزی شده با نیترات نقره مربوط به زهر خام عقرب *H. saulcyi*. ستون M: نشانگر پروتئینی.



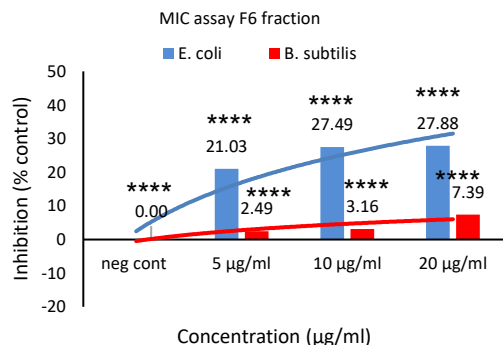
شکل ۲. اجزای کروماتوگرافی RP-HPLC زهر خام عقرب *H. saulcyi*

جدول ۱: فراکشن‌های F1 تا F14 جدا شده از زهر خام عقرب *H. saulcyi*

| Peak No. | Retention time (min) | Peak No. | Retention time (min) |
|----------|----------------------|----------|----------------------|
| ۱        | ۴/۱۳                 | ۸        | ۵۰/۳۱                |
| ۲        | ۱۰/۱۵                | ۹        | ۵۵/۵۵                |
| ۳        | ۱۴/۵۰                | ۱۰       | ۵۸/۳۲                |
| ۴        | ۲۶/۰۴                | ۱۱       | ۶۱/۱۹                |
| ۵        | ۳۴/۳۷                | ۱۲       | ۶۷/۵۳                |
| ۶        | ۳۴/۵۶                | ۱۳       | ۶۹/۴۶                |
| ۷        | ۴۵/۴۰                | ۱۴       | ۸۳/۴۸                |

غلظت‌های ذکر شده، در به ترتیب ۲/۴۹، ۳/۱۶ و ۷/۳۹ بوده است (شکل ۷). قابل ذکر است در سایر غلظت‌ها این فراکشن اثر مهاری نداشته است.

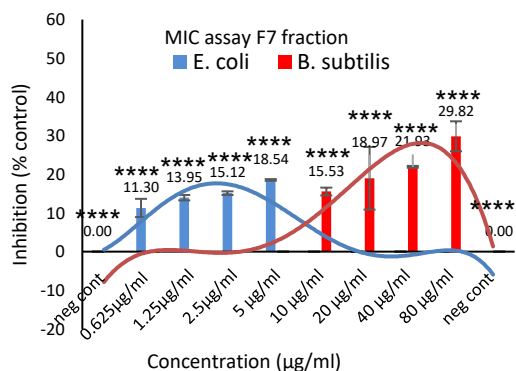
شکل ۷. درصد مهار رشد باکتری‌های اشریشیاکلی و باسیلوس سوبتیلیس ( $1/5 \times 10^8$  باکتری در هر چاهک) در غلظت‌های ۵ تا ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فراکشن ششم زهر عقرب *H. saulcyi* در



سنجش MIC. #: میزان معنادار بودن در مقایسه با کنترل مثبت

#### اثرات ضد باکتریایی فراکشن شماره ۷

در غلظت‌های بالاتر از ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، این فراکشن بر رشد باکتری گرم منفی اشریشیاکلی، اثر بازدارنده نداشته است. نتایج این اثر در غلظت‌های پایین‌تر از ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵) نشان داد که این فراکشن در این غلظت‌ها به ترتیب سبب ۱۱/۳۰، ۱۳/۹۵، ۱۵/۱۲ و ۱۸/۵۴٪ مهاری شده است. این فراکشن در غلظت‌های بالاتر از ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر (۱۰ تا ۸۰)، بر رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس اثر بازدارنده داشته و بیش‌ترین درصد مهار آن در غلظت ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به میزان ۲۹/۸۲٪ بوده است (شکل ۸).

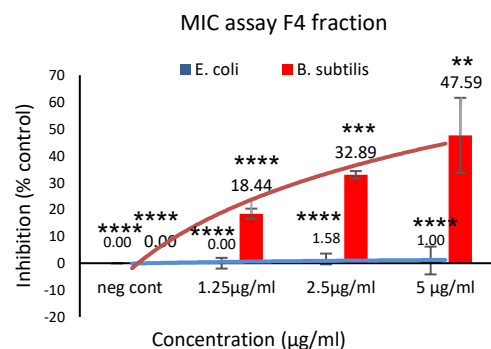


شکل ۸. درصد مهار رشد باکتری‌های اشریشیاکلی و باسیلوس سوبتیلیس ( $1/5 \times 10^8$  باکتری در هر چاهک) در غلظت‌های ۰/۶۲۵ تا ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فراکشن هفتم زهر عقرب *H. saulcyi* در

سنجش MIC

نتایج حداقل غلظت مهاری فراکشن‌های پروتئینی زهر عقرب در باکتری‌های مورد مطالعه. نتایج پروتئین‌سنجی فراکشن‌های جدا شده از زهر خام نشان داد که فراکشن‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۵ و ۱۴ فاقد پروتئین هستند. بر این اساس اثرات ضد باکتریایی فراکشن‌های پروتئینی جدا شده شامل ۴، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳ در غلظت‌های مشخص شده در روش کار بر روی رشد باکتری‌های اشریشیاکلی و باسیلوس سوبتیلیس مورد بررسی قرار گرفت. قابل ذکر است برای رعایت اختصار در محدوده غلظت‌هایی که فراکشن‌ها اثر بازدارنده نداشتند، نتایج مربوط به آن‌ها در نمودارها نیامده است. نتایج این مطالعه به تفکیک هر فراکشن به شرح زیر است.

اثرات ضد باکتریایی فراکشن شماره ۴. نتایج سنجش MIC در غلظت‌های ۰/۱۵۶ تا ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای هر دوسویه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت نشان داد که این فراکشن بر رشد باکتری اشریشیاکلی اثر مهاری نداشته است. این در حالی است که در غلظت‌های مورد مطالعه، این فراکشن از رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس جلوگیری نموده و در غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بیش‌ترین اثر (۴۷/۵۹٪) را بر مهار رشد آن از خود نشان داده است. درصد مهار رشد باکتری‌های فوق توسط این فراکشن در غلظت‌های مطالعه شده در شکل ۶ آمده است.

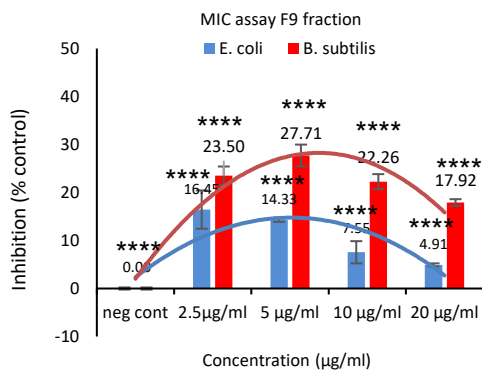


شکل ۶. درصد مهار رشد باکتری‌های اشریشیاکلی و باسیلوس سوبتیلیس ( $1/5 \times 10^8$  باکتری در هر چاهک) در حضور غلظت‌های ۱/۲۵ تا ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر فراکشن چهارم زهر عقرب *H. saulcyi* در سنجش

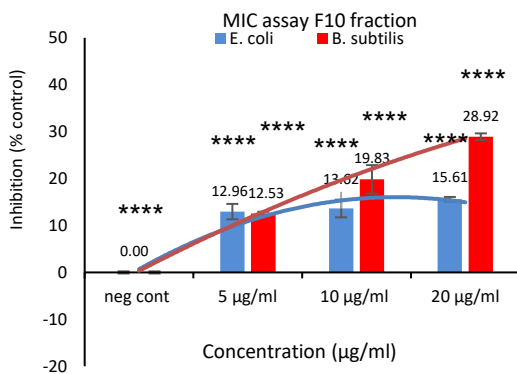
#### اثرات ضد باکتریایی فراکشن شماره ۶

سنجش MIC در غلظت‌های ۵ تا ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از این فراکشن برای هر دوسویه باکتری گرم مثبت و گرم منفی انجام شد. با توجه به نتایج به دست آمده، بیش‌ترین اثر این فراکشن بر رشد باکتری اشریشیاکلی و باسیلوس سوبتیلیس در غلظت‌های بین ۵ تا ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است. درصد مهاری رشد باکتری اشریشیاکلی در حضور غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ به ترتیب ۲۱/۰۳، ۲۷/۴۹ و ۲۷/۸۸ محاسبه شد. در مورد باکتری باسیلوس سوبتیلیس این اثر مهاری در

۱۲/۹۶، ۱۳/۶۲ و ۱۵/۶۱٪ برای اشریشیակلی و برای باسیلوس سوتیلیس به ترتیب ۱۲/۵۳، ۱۹/۸۳ و ۲۸/۹۲ بوده است و در سایر غلظت‌ها اثر مهار بسیار ناچیز بوده است (شکل ۱۱). همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود با افزایش غلظت از ۵ به ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اثر مهاري فراکشن سیر صعودی داشته است.



شکل ۱۰. درصد مهار رشد باکتری‌های اشریشیակلی و باسیلوس سوتیلیس ( $10^8 \times 1/5$  باکتری در هر چاهک) در غلظت‌های ۲/۵ تا ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فراکشن نهم زهر عقرب *H. saulcyi* در سنجش MIC. \*: میزان معنادار بودن در مقایسه با کنترل مثبت (\*\*\*) $p < 0.001$



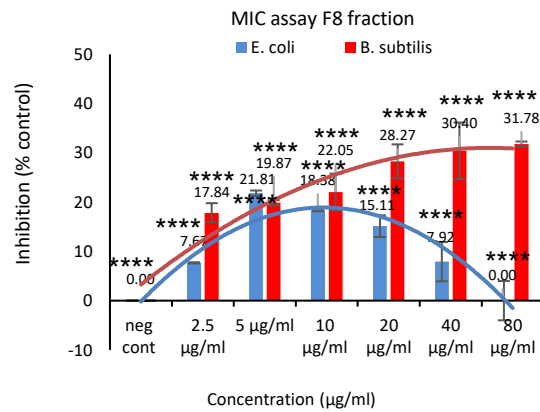
شکل ۱۱. درصد مهار رشد باکتری‌های اشریشیակلی و باسیلوس سوتیلیس ( $10^8 \times 1/5$  باکتری در هر چاهک) در غلظت‌های ۵ تا ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فراکشن دهم زهر عقرب *H. saulcyi* در سنجش MIC. \*: میزان معنادار بودن در مقایسه با کنترل مثبت (\*\*\*) $p < 0.001$

#### اثرات ضد باکتریایی فراکشن شماره ۱۱

فراکشن یازدهم در غلظت‌های ۰/۶۲۵ تا ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در باکتری اشریشیակلی، هیچ‌گونه اثر مهاري نداشته است. میزان مهار رشد این فراکشن بر علیه باکتری باسیلوس سوتیلیس در غلظت‌های ۰/۶۲۵، ۱/۲۵ و ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر سیر نزولی داشته و به ترتیب ۲۵/۶۰، ۱۴/۶۸ و ۸/۳۶

#### اثرات ضد باکتریایی فراکشن شماره ۸

برای سنجش حداقل غلظت مهاري این فراکشن در دوسویه مورد مطالعه غلظت‌های ۲/۵ تا ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به کار رفت. بیش‌ترین درصد مهار رشد باکتری اشریشیակلی در غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، برابر با ۲۱/۸۱ بوده، در صورتی‌که در باکتری باسیلوس سوتیلیس بیش‌ترین اثر بازدارندگی در غلظت ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، شکل شماره ۹٪ مهار رشد هر دوسویه ۳۱/۷۸ بود. شکل شماره ۹٪ مهار رشد هر دوسویه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را در غلظت‌های مورد سنجش نشان داده است (شکل ۹).



شکل ۹. درصد مهار رشد باکتری‌های اشریشیակلی و باسیلوس سوتیلیس ( $10^8 \times 1/5$  باکتری در هر چاهک) در غلظت‌های ۲/۵ تا ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فراکشن هشتم زهر عقرب *H. saulcyi* در سنجش MIC. \*: میزان معنادار بودن در مقایسه با کنترل مثبت (\*\*\*) $p < 0.001$

#### اثرات ضد باکتریایی فراکشن شماره ۹. سنجش MIC برای

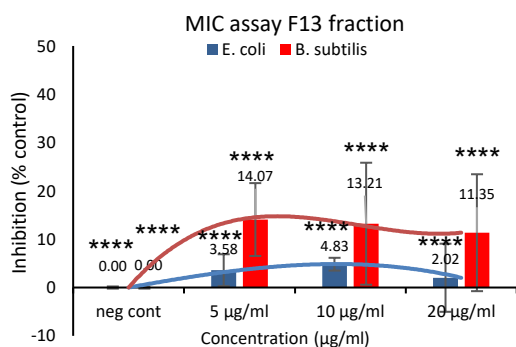
فراکشن نهم در غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای باکتری اشریشیակلی و باکتری باسیلوس سوتیلیس انجام گرفت. درصد مهار رشد باکتری اشریشیակلی در این غلظت‌ها به ترتیب ۱۶/۴۵، ۱۴/۳۳، ۷/۵۵ و ۴/۹۱ بوده است. این بازدارندگی در مورد باکتری باسیلوس سوتیلیس در غلظت‌های ذکر شده به ترتیب ۲۳/۵۰، ۲۷/۵۱، ۲۲/۲۶ و ۱۷/۹۲ محاسبه شد. همان‌طور که در نمودار مشاهده می‌شود با افزایش غلظت این فراکشن میزان مهار رشد باکتری‌ها سیر نزولی دارد (شکل ۱۰).

#### اثرات ضد باکتریایی فراکشن شماره ۱۰

در این مطالعه اثرات ضد باکتریایی این فراکشن در غلظت‌های ۲/۵ تا ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با استفاده از سنجش MIC بررسی گردید. بازدارندگی رشد باکتری اشریشیակلی و باسیلوس سوتیلیس در حضور غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از این فراکشن به ترتیب

## اثرات ضد باکتریایی فراکشن شماره ۱۳

برای فراکشن سیزدهم، حداقل غلظت بازدارندگی رشد در غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، برای باکتری /شیریشیکالی بسیار ناچیز بود. در غلظت‌های فوق میزان اثر مهاري فراکشن بر رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس تقریباً یکسان و به ترتیب ۱۴/۰۷، ۱۳/۲۱ و ۱۱/۳۵ بوده است. اختلاف این مقادیر از لحاظ آماری معنی‌دار است. در مورد سایر غلظت‌ها مندرج در نمودار این فراکشن اثر مهاري نداشته است (شکل ۱۴).



شکل ۱۴. درصد مهار رشد باکتری‌های /شیریشیکالی و باسیلوس سوبتیلیس ( $1/5 \times 10^8$  باکتری در هر چاهک) در غلظت‌های ۵ تا ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فراکشن سیزدهم زهر عقرب *H. saulcyi* در سنجش MIC

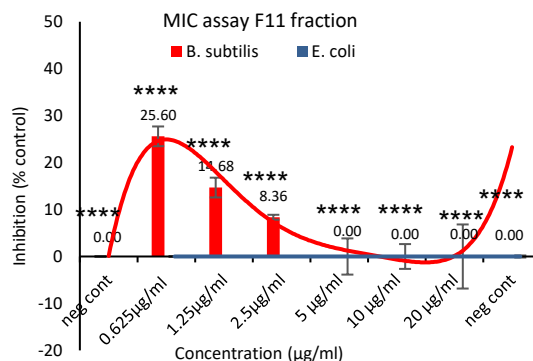
## بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم برای نابودی بیش‌تر باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، با موفقیت همراه نبوده است و موجب افزایش نگرانی جامعه جهانی در دهه گذشته برای یافتن سریع جایگزینی برای آن‌ها شده است [۶]. زهر تولیدشده توسط گونه‌های مختلف عقرب، مایعی متشکل از تعداد زیادی از پپتیدهای متنوع با طیف گسترده‌ای از خواص و عملکردهای بیولوژیکی مختلف است که به نظر می‌رسد جز جدایی‌ناپذیر از یک سیستم ایمنی ذاتی باشد که شرایط محافظت از عقرب و غده آن را در برابر پاتوژن‌های گوناگون فراهم می‌کند [۲۷].

هم‌چنین با وجود شواهدی مبنی بر جداسازی چند پپتید ضد میکروبی از زهر عقرب‌های مختلف [۳۵-۳۸]، این احتمال وجود دارد که بتوان فراکشن‌هایی از زهر عقرب‌ها شناسایی کرد که دارای خواص ضد باکتری مؤثر باشند. در این بررسی اثرات ضد باکتریایی زهر خام و فراکشن‌های پروتئینی زهر عقرب *H. saulcyi* مطالعه گردید.

نتایج به‌دست‌آمده از ژل Tricine SDS-PAGE در این بررسی وجود هفت باند پروتئینی با وزن مولکولی از ۴/۱ تا ۱۰۴ کیلودالتون در زهر خام عقرب را نشان داد. هم‌چنین از

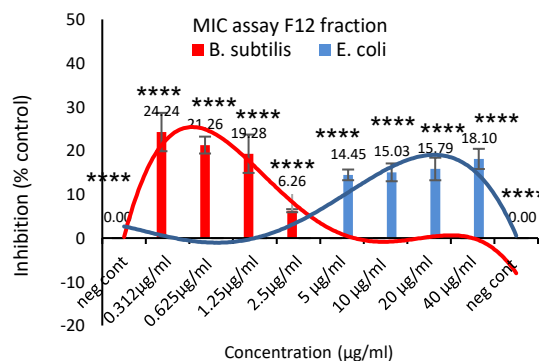
بوده است. در سایر غلظت‌ها این فراکشن بر علیه باکتری اخیر نیز اثر مهاري نداشته است (شکل ۱۲).



شکل ۱۲. درصد مهار رشد باکتری‌های /شیریشیکالی و باسیلوس سوبتیلیس ( $1/5 \times 10^8$  باکتری در هر چاهک) در غلظت‌های ۰/۶۲۵ تا ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فراکشن یازدهم زهر عقرب *H. saulcyi* در سنجش MIC

## اثرات ضد باکتریایی فراکشن شماره ۱۲

اثرات مهاري این فراکشن در غلظت‌های ۰/۳۱۲ تا ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مطالعه شد. این فراکشن در باکتری /شیریشیکالی، در غلظت‌های پایین‌تر از ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و در مورد باسیلوس سوبتیلیس در غلظت‌های بالاتر از آن فاقد اثر مهاري بوده است. در مورد باکتری /شیریشیکالی در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر این فراکشن با افزایش دوز میزان اثر مهاري آن افزایش یافته و به ترتیب ۱۴/۴۵، ۱۵/۰۳، ۱۵/۷۹ و ۱۸/۱۰٪ بوده است. در مورد باکتری باسیلوس سوبتیلیس اثر مهاري در غلظت‌های ۰/۳۱۲، ۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۶/۲۶، ۱۹/۲۸، ۲۱/۲۶، ۲۴/۲۴ و ۶/۲۶ بوده است (شکل ۱۳).



شکل ۱۳. درصد مهار رشد باکتری‌های /شیریشیکالی و باسیلوس سوبتیلیس ( $1/5 \times 10^8$  باکتری در هر چاهک) در غلظت‌های ۰/۳۱۲ تا ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فراکشن دوازدهم زهر عقرب *H. saulcyi* در سنجش MIC

بر روی باکتری‌های گرم منفی (*E.aerogenes*, *E.coli*) و باکتری گرم مثبت (*P.aeruginosa*) و باکتری گرم مثبت (*L.monocytogenes*) مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که اثر ضد میکروبی در باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت قوی‌تر است [۴۶].

در سال ۲۰۱۴، Salama و Geasa فعالیت ضد میکروبی زهر خام سه گونه عقرب مصری را نیز مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها فعالیت ضد میکروبی زهر خام این عقرب‌ها را علیه ۴ باکتری گرم مثبت و گرم منفی (*Bacillus*, *Bacillus cereus*)، *Klilsella pneumonia* و *Citrobacter freundii*، *subtillis* مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان می‌داد که زهر خام *L.quinquestratus* اثر ضد باکتریایی معنی‌داری علیه باکتری‌های *B.subtillis* و *C.frendii* دارد. از طرف دیگر، زهر خام عقرب‌های *A.amoreuxi* و *A.australis* تأثیر قابل توجهی در باکتری‌های آزمایش‌شده نشان ندادند [۴۷].

مطالعات انجام‌شده توسط کشاورز و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان داد که زهر عقرب ایرانی *Odontobuthus bidentatus* بر روی رشد دو باکتری گرم مثبت (*S.aureus*) و *B.subtilis* و یک باکتری گرم منفی (*E.coli*) دارای اثر بازدارنده بوده و به صورت معنی‌دار موجب کاهش زنده‌مانی این سه باکتری شده است [۴۸].

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که برخی از فراکشن‌های پروتئینی جداسازی شده از زهر خام (فراکشن ۱۲) تنها در باکتری‌های گرم منفی و تعدادی دیگر از فراکشن‌ها (۷ و ۸) در باکتری‌های گرم مثبت و برخی (۴، ۶ و ۱۰) بر هر دو گروه باکتری‌های گرم منفی و مثبت بیش‌ترین اثر مهار را از خود نشان داده‌اند. این در حالی است که بعضی از فراکشن‌ها (فراکشن ۱۱) هیچ‌گونه اثر بازدارنده بر رشد باکتری‌های گرم منفی مورد مطالعه نداشته‌اند.

نتایج حداقل غلظت مهار فرکشن‌ها در باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت دو نوع رفتار باکتری‌ها در مواجهه با فراکشن‌های پروتئینی را نشان داد. پاسخ باکتری‌ها به برخی فراکشن‌ها وابسته به دوز و غلظت (dose-dependent manner) بود در حالی‌که در برخی فراکشن‌ها این پاسخ‌ها به صورت غیر وابسته به دوز (non-dose-dependent manner) مشاهده شد. از طرف دیگر در بررسی‌های انجام‌شده در برخی از فراکشن‌ها اثر مهار غیر وابسته به دوز قابل مشاهده بود. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده فراکشن‌های ۷ و ۸ فقط در باکتری‌های گرم منفی و فراکشن‌های ۱۱ و ۱۲ فقط در باکتری‌های گرم مثبت اثر غیر وابسته به دوز را نشان دادند. همچنین طبق نتایج حاصل‌شده، فراکشن‌های ۹ و ۱۳ در هر

کروماتوگرافی HPLC زهر خام عقرب، تعداد ۱۴ فراکشن حاصل شد. نتایج پروتئین‌سنجی این فراکشن‌ها نشان داد که از میان ۱۴ فراکشن به‌دست‌آمده، فراکشن‌های مربوط به پیک‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۵ و ۱۴ فاقد پروتئین بوده‌اند. آنالیز و تجزیه و تحلیل الکتروفورزی زهر خام عقرب *H.saulcyi* توسط Yağmur و همکاران در سال ۲۰۱۵ [۳۹] نشان داد که بر اساس الگوهای الکتروفورزی زهر خام عقرب محدوده‌ای بین ۳ تا ۱۸۸ کیلودالتون را برای پروتئین‌های موجود در زهر را نشان داده است. بر اساس این نتایج هشت باند پروتئینی مختلف با وزن مولکولی ۴، ۶، ۹، ۳۱، ۳۵، ۴۰، ۴۶ و ۶۹ کیلودالتون در نمونه سم عقرب شناسایی شده بود [۳۹]. برخی پپتیدها بر باکتری‌های گرم مثبت و برخی بر باکتری‌های گرم منفی مؤثر هستند. فعالیت اختصاصی برخی پپتیدهای ضد میکروبی ممکن است به دلیل عوامل مختلفی از جمله تفاوت گونه‌های باکتریایی از جمله تراکم و ساختار لیپیدی ساکارید در دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی و یا ترکیب لیپیدی غشای سیتوپلاسمی و پتانسیل الکترواستاتیک و بار کلی غشاء در باکتری‌های گرم مثبت باشد [۴۰].

با توجه به یافته‌های حاصل از این مطالعه، زهر خام عقرب *H.saulcyi* فعالیت ضد باکتریایی وابسته به غلظت بر علیه سویه‌های باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی نشان داد. در مقایسه بین باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت شاهد بودیم که اثر زهر خام در باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت بیش‌تر است که این موضوع می‌تواند به دلیل ساختار خاص غشا و دیواره سلولی منحصربه‌فرد باکتری‌های گرم منفی باشد [۴۱].

این یافته با گزارش فعالیت ضد باکتریایی زهر خام برخی عقرب‌ها که قبلاً توسط احمد و همکاران [۴۴]، Samy و همکاران [۴۵]، Erdes و همکاران [۴۶]، Salama و Geasa [۴۷] و کشاورز و همکاران [۴۸] مورد بررسی قرار گرفته‌اند منطبق می‌باشد. احمد و همکاران فعالیت ضد باکتریایی زهر خام عقرب *H.xanthopus* را بر روی *S.typhimurium*، *B.subtilis*، *E.faecalis* و *P.aeruginosa* مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که زهر خام، رشد همه باکتری‌ها را به‌طور مؤثری مهار می‌کند [۴۴]. Samy و همکاران در سال ۲۰۰۷ فعالیت ضد باکتری زهر دو گونه عقرب را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها نشان دادند که زهر خام عقرب به‌طور چشم‌گیری مانع از رشد باکتری *Proteus vulgaris*، *Proteus mirabilis*، *S.aureus*، *Enterobacter aerogenes* و *Pseudomonas aeruginosa* می‌شود [۴۵]. در سال ۲۰۱۴، Erdes و همکاران فعالیت ضد میکروبی سم خام عقرب *Leirus abduallahbayrami* را



BUAP اثر آنتی‌باکتریال خفیف و حداقلی را در باکتری‌های *E.coli* و *S.aureus* و *K.pneumoniae* و *B.cepacia* نشان دادند و نکته مهم این‌که باکتری *Burkholderia cepacia* تنها سویه‌ای بود که در بالاترین غلظت مورد سنجش به پیتید Uy234 مقاومت داشت [۶۲].

با توجه به شواهد فوق به نظر می‌رسد که رفتار متناقض فراکشن‌ها و رفتارهای فنوتیپی وابسته به دوز و غیر وابسته به دوز که در برخی فراکشن‌ها مشاهده شد، ناشی از این است که اثر ضد باکتریایی که در زهر خام مشاهده می‌شود برآیندی از اثر فراکشن‌های مختلف موجود در آن است. این اثر می‌تواند در برخی موارد سبب هم‌افزایی یا سینرژیک گردد. این ویژگی ممکن است به این دلیل باشد که هر ترکیب ضد باکتریایی که دارای بار مثبت بیش‌تری است می‌تواند برهم‌کنش بیش‌تری با لیپیدهای غشایی ایجاد که نتیجه آن بی‌ثبات شدن غشا میکروارگانسیم و در نهایت پارگی آن شود [۶۲]. نتایج این مطالعه با بررسی‌های صورت گرفته توسط Zerouti و همکاران (۲۰۱۹)، که در آن اثرات ضد باکتریایی فراکشن‌های زهر خام عقرب *Androctonus australis hector* بر روی باکتری باسیلوس سرئوس مورد ارزیابی قرار گرفته است، هم‌خوانی دارد. بر اساس نتایج گزارش شده از بین ۴ فراکشن جدا شده از زهر عقرب فوق، فراکشن‌های شماره ۳ و ۴ دارای اثرات ضد باکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بودند [۶۳]. در یک جمع‌بندی می‌توان گفت زهر خام عقرب *H.saulcyi*، به‌تنهایی در باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت دارای اثر بازدارنده رشد می‌باشد که این میزان در باکتری‌های گرم منفی به مراتب بیش‌تر است. از طرفی در بررسی فراکشن‌های پروتئینی هم اثرات متناقضی در اثرات آن‌ها قابل مشاهده بود که این تفاوت در رفتار فراکشن‌های پروتئینی با اثر ایگل قابل توجیه می‌باشد. یافته‌های این مطالعه می‌تواند زمینه تحقیقات آینده برای کشف مولکول‌های ضد باکتریایی جدید از زهر این عقرب را فراهم نماید.

### تشکر و قدردانی

از همکاری صمیمانه اعضای محترم مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی دانشکده شهید فخری‌زاده دانشگاه جامع امام حسین (علیه‌السلام) که در انجام مراحل تحقیق ما را یاری دادند تشکر و قدردانی می‌نمایم.

### مشارکت و نقش نویسندگان

جمیل زرگان: ایده و طراحی مطالعه، آنالیز و تفسیر نتایج، یوسف علیپور: جمع‌آوری داده‌ها، نگارش نسخه اول مقاله

دوسویه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد سنجش، به‌صورت غیر وابسته به غلظت نمود داشتند.

بررسی اطلاعات منتشر شده نشان می‌دهد که گاهی اوقات پاسخ باکتری‌ها به عوامل ضد میکروبی به‌صورت غیر وابسته به دوز پیش می‌رود که این اثر منحصر به فرد با اثر ایگل (The Eagle Effect) قابل توجیه است. اثر Eagle پدیده‌ای را توصیف می‌کند که در آن باکتری‌ها یا قارچ‌ها در معرض غلظت آنتی‌بیوتیک بالاتر از غلظت باکتری‌کشی بهینه (OBC) optimal bactericidal concentration، به نسبت غلظت کشنده بهینه، میزان بقا و زنده‌مانی را به‌طور متناقضی بهبود می‌دهند و منجر به کاهش میزان خالص مرگ می‌شوند. با وجود مشاهدات گسترده‌ای که از این اثر در میکروارگانسیم‌های مختلف گزارش شده است، نحوه عملکرد آن به‌خوبی درک نشده است. اگرچه جنبه‌هایی از اثر Eagle شباهت زیادی به مقاومت دارد، اما شواهد محکمی وجود دارد مبنی بر این‌که این پدیده‌ها، به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای واکنش فنوتیپی به درمان آنتی‌بیوتیکی هستند [۵۱].

بر طبق پدیده Eagle، در برخی سویه‌های باکتریایی، هنگامی که غلظت آنتی‌بیوتیک به بالاتر از میزان OBC افزایش می‌یابد، به‌طور متناقضی بیش‌تر باکتری‌ها زنده می‌مانند. وی با شمارش تعداد باکتری‌های باقی‌مانده در طول زمان، تعیین کرد که میزان مرگ و میر باکتری‌ها در پاسخ به سطوح بالاتر از MBC برای پنی‌سیلین، و با گسترش فعالیت باکتری‌کشی آن، در مقایسه با غلظت‌های پایین‌تر نزدیک به MBC کاهش می‌یابد [۵۲، ۵۳]. Kirby و Garrod نیز مشاهدات مشابهی را که در آن غلظت ۱۰۰۰ برابر بالاتر پنی‌سیلین منجر به افزایش زنده‌مانی استافیلوکوک شد گزارش کردند [۵۴، ۵۵]. هرچند که شکاف در درک و شناخت از پدیده Eagle در بین محققین بسیار برجسته است لیکن عموماً آن را با پدیده‌هایی که بیش‌تر با رخداد پایداری و تحمل باکتریایی مرتبط است مقایسه می‌کنند [۵۶-۵۹].

هم‌چنین طبق مطالعات ضد باکتریایی انجام شده توسط Catherine Cesa-Luna با استفاده از چهار پیتید بازطراحی شده مشتق از زهر خام عقرب *U.yaschenkoi* بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نتایج متفاوتی به‌دست آمده است. برخی از باکتری‌ها از جمله *Staphylococcus aureus*، *Streptococcus* و *Paraburkholderia silvatlantica* زیرگونه SP10 و ST9 حساسیت شدیدتری به پیتیدهای Uy234 و Uy17 نشان دادند. و پیتیدهای Uy192 و Uy234 بیش‌ترین اثر بازدارندگی رشد را در باکتری *Streptococcus sp* زیرگونه SP10 و ST9 نشان دادند. پیتید طراحی شده QnCs-

- [15] Dehghani R, Fathi B. Scorpion sting in Iran: a review. *Toxicon* 2012; 60: 919-933.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.06.002>  
PMid:22750221
- [16] Nejati J, Mozafari E, Saghafipour A, Kiyani M. Scorpion fauna and epidemiological aspects of scorpionism in southeastern Iran. *Asian Pac J Trop Biomed* 2014; 4: S217-S221.  
<https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1323>  
PMid:25183084 PMCid:PMC4025348
- [17] Kovarik F, Yağmur EA, Fet V, Navidpour S. On two subspecies of *Mesobuthus eupeus* (CL Koch, 1839) in Turkey (Scorpiones: Buthidae). *Euscorpius* 2011; 2011: 1-15.  
<https://doi.org/10.18590/euscorpius.2011.vol2011.iss109.1>  
<https://doi.org/10.18590/euscorpius.2011.vol2011.iss108.1>  
<https://doi.org/10.18590/euscorpius.2011.vol2011.iss136.1>  
<https://doi.org/10.18590/euscorpius.2011.vol2011.iss129.1>  
<https://doi.org/10.18590/euscorpius.2011.vol2011.iss126.1>  
<https://doi.org/10.18590/euscorpius.2011.vol2011.iss128.1>
- [18] de la Vega RC, Possani LD. Overview of scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup> channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon* 2005; 46: 831-844.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.09.006>  
PMid:16274721
- [19] Jalali A, Bosmans F, Amininasab M, Clynen E, Cuypers E, Zaremirakabadi A, et al. OD1, the first toxin isolated from the venom of the scorpion *Odonthobuthus doriae* active on voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. *FEBS Lett* 2005; 579: 4181-4186.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.06.052>  
PMid:16038905
- [20] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- [21] Gels T, Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 1987; 166: 368-379.  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
- [22] Haider SR, Reid HJ, Sharp BL. Modification of tricine-SDS-PAGE for online and offline analysis of phosphoproteins by ICP-MS. *Anal Bioanal Chem* 2010; 397: 655-664.  
<https://doi.org/10.1007/s00216-010-3588-9>  
PMid:20225054
- [23] Zargan J, Sajad M, Umar S, Naime M, Ali S, Khan HA. Scorpion (*Androctonus crassicauda*) venom limits growth of transformed cells (SH-SY5Y and MCF-7) by cytotoxicity and cell cycle arrest. *Exp Mol Pathol* 2011; 91: 447-454.  
<https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2011.04.008>  
PMid:21536027
- [24] CaLSI, C., Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. 2012, M07A9.
- [25] Yalcin HT, Ozen MO, Gocmen B, Nalbantsoy A. Effect of Ottoman viper (*Montivipera xanthina* (Gray, 1849)) venom on various cancer cells and on microorganisms. *Cytotechnology* 2014. 66: 87-94.  
<https://doi.org/10.1007/s10616-013-9540-z>  
PMid:23381026 PMCid:PMC3886531
- [26] Hosseinpour MO, Zargan JA, Honari H, Haji Nour Mohammadi A, Hajizadeh AB, et al. Introduction of dianthins: a new promising horizon toward continuous research on breast cancer bulldozing in Iran. *Int J Med Toxicol Forens Med* 2019; 9: 133-140. (Persian).  
<https://doi.org/10.32598/ijmtfm.v9i3.25706>
- [27] Petricevich VL. Scorpion venom and the inflammatory response. *Med Inflamm* 2010; 2010.  
<https://doi.org/10.1155/2010/903295>  
PMid:20300540 PMCid:PMC2838227
- [28] Talan DA, Citron DM, Overturf GD, Singer B, Froman P, Goldstein EJ. Antibacterial activity of crotalid venoms against oral snake flora and other clinical bacteria. *J Infect Dis* 1991; 164: 195-198.
- [1] Nabavi SM, Marchese A, Izadi M, Curti V, Daglia M, Nabavi SF. Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food Chem* 2015; 173: 339-347.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.042>  
PMid:25466031
- [2] Organization WH. World health statistics 2010. 2010; World Health Organization.
- [3] Rolain J, Canton R, Cornaglia G. Emergence of antibiotic resistance: Need for a new paradigm. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 615-616.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03902.x>  
PMid:22703444
- [4] Brogden N, Brogden K. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? *Int J Antimicrob Agents* 2011; 38: 217-225.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.05.004>  
PMid:21733662 PMCid:PMC3159164
- [5] Fratini F, Cilia G, Turchi B, Felicioli A. Insects, arachnids and centipedes venom: A powerful weapon against bacteria. A literature review. *Toxicon* 2017; 130: 91-103.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.02.020>  
PMid:28242227
- [6] Tarazi S. Scorpion venom as antimicrobial peptides (AMPs): A review article. *Int Arabic J Antimicrob Agents* 2016; 5: 1-9.  
<https://doi.org/10.3823/777>
- [7] Almaaytah A, Albalas Q. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: a review. *Peptides* 2014; 51: 35-45.  
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.10.021>  
PMid:24184590
- [8] Sit CS, Vederas JC. Approaches to the discovery of new antibacterial agents based on bacteriocins. *Biochem Cell Biol* 2008; 86: 116-123.  
<https://doi.org/10.1139/O07-153>  
PMid:18443625
- [9] Carriel-Gomes MC, Kratz JM, Barracco MA, Bachere E, Barardi CR, Simões CM. In vitro antiviral activity of antimicrobial peptides against herpes simplex virus 1, adenovirus, and rotavirus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 469-472.  
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762007005000028>  
PMid:17612767
- [10] Moreira CK, Rodrigues FG, Ghosh A, Varotti FD, Miranda A, Daffre S, et al. Effect of the antimicrobial peptide gomesin against different life stages of *Plasmodium* spp. *Exp Parasitol* 2007; 116: 346-353.  
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.01.022>  
PMid:17376436 PMCid:PMC1978196
- [11] Cole AM, Cole AL. Antimicrobial polypeptides are key anti-HIV-1 effector molecules of cervicovaginal host defense. *Am J Reproduct Immunol* 2008; 59: 27-34.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2007.00561.x>  
PMid:18154593
- [12] Ortiz E, Gurrola GB, Schwartz EF, Possani LD. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon* 2015; 93: 125-135.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.11.233>  
PMid:25432067 PMCid:PMC7130864
- [13] Goyffon M, Tournier JN. Tournier, Scorpions: A presentation. *Toxins* 2014; 6: 2137-2148.  
<https://doi.org/10.3390/toxins6072137>  
PMid:25133517 PMCid:PMC4113747
- [14] Dehghani R, Haghi FM, Mogaddam MY, Sedaghat MM, Hajati H. Review study of scorpion classification in Iran. *J Entomol Zool Stud* 2016; 4: 440-444.

## منابع

[https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO;2-M)

[43] Dathe M, Wieprecht T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1462: 71-87.

[https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00201-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00201-1)

[44] Ahmed U, Malik Mujaddad-ur-Rehman NK, Fawad SA, Fatima A. Antibacterial activity of the venom of *Heterometrus xanthopus*. *Indian J Pharmacol* 2012; 44: 509. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.99332> PMID:23087515 PMCID:PMC3469957

[45] 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: 650-659.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03161.x>

PMid:17309613

[46] Erdeş E, Doğan TS, Coşar İ, Danişman T, Kunt KB, Şeker T, et al. Characterization of *Leiurus abdullahbayrami* (Scorpiones: Buthidae) venom: peptide profile, cytotoxicity and antimicrobial activity. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2014; 20: 48.

<https://doi.org/10.1186/1678-9199-20-48>

PMid:25414725 PMCID:PMC4237746

[47] Salama W, Geasa N. Investigation of the antimicrobial and hemolytic activity of venom of some Egyptian scorpion. *J Microbiol Antimicrob* 2014; 6: 21-28.

<https://doi.org/10.5897/JMA2013.0286>

[48] Keshavarz Alikhani H, Zargan J, Bidmeshkipour A, Haji Nour Mohammadi A, Hosseinpour M, et al. Antibacterial Activity of the Iranian Scorpion's Crude Venom (*Odontobuthus bidentatus*) on Gram-positive and Gram-negative Bacteria. *Iran J Toxicol* 2020; 14: 105-110.

<https://doi.org/10.32598/ijt.14.2.627>

[49] Bernier SP, Surette MG. Concentration-dependent activity of antibiotics in natural environments. *Front Microbiol* 2013; 4: 20.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00020>

PMid:23422936 PMCID:PMC3574975

[50] Vasilchenko AS, Rogozhin EA. Sub-inhibitory effects of antimicrobial peptides. *Front Microbiol* 2019; 10: 1160.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01160>

PMid:31178852 PMCID:PMC6543913

[51] Prasetyoputri A, Jarrad AM, Cooper MA, Blaskovich MA. The Eagle effect and antibiotic-induced persistence: two sides of the same coin? *Trends Microbiol* 2019; 27: 339-354.

<https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.10.007>

PMid:30448198

[52] Eagle H. A paradoxical zone phenomenon in the bactericidal action of penicillin in vitro. *Science (Washington)* 1948; 44-45.

<https://doi.org/10.1126/science.107.2767.44>

PMid:17778247

[53] Eagle H, Musselman A. The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. *J Exp Med* 1948; 88: 99-131.

<https://doi.org/10.1084/jem.88.1.99>

PMid:18871882 PMCID:PMC2135799

[54] Standards, N.C.f.C.L. and A.L. Barry, Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: approved guideline. Vol. 19. 1999: National Committee for Clinical Laboratory Standards Wayne, PA..

[55] Kirby WM. Bacteriostatic and lytic actions of penicillin on sensitive and resistant staphylococci. *J Clin Invest* 1945; 24: 165-169.

<https://doi.org/10.1172/JCI101593>

PMid:16695203 PMCID:PMC435445

[56] Fisher RA, Gollan B, Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat Rev Microbiol* 2017; 15: 453.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.42>

PMid:28529326

[57] Radzikowski JL, Schramke H, Heinemann M. Bacterial persistence from a system-level perspective. *Curr Opin Biotechnol* 2017; 46: 98-105.

<https://doi.org/10.1093/infdis/164.1.195>

PMid:2056205

[29] Zargan J, Sobati H, Goodarzi H, Haji Noor Mohammadi A, Ebrahimi F. Anti-cancer and anti-bacterial effects of crude venom of *Pseudocerastes persicus* snake. *Koomesh* 2020; 22: 518-528. (Persian).

<https://doi.org/10.29252/koomesh.22.3.518>

[30] Zargan J, Umar S, Sajad M, Naime M, Ali S, Khan HA. Scorpion venom (*Odontobuthus doriae*) induces apoptosis by depolarization of mitochondria and reduces S-phase population in human breast cancer cells (MCF-7). *Toxicol in Vitro* 2011; 25: 1748-1756.

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.09.002>

PMid:21945044

[31] Zargan J, Sajad M, Umar S, Naime M, Ali S, Khan HA. Scorpion (*Odontobuthus doriae*) venom induces apoptosis and inhibits DNA synthesis in human neuroblastoma cells. *Mol Cell Biochem* 2011; 348: 173-181.

<https://doi.org/10.1007/s11010-010-0652-x>

PMid:21061047

[32] Salarian AA, Jalali A, Mirakabadi AZ, Vatanpour H, Shirazi FH. Cytotoxic effects of two Iranian scorpions *Odontobuthusdoriae* and *Bothutus saulcyi* on five human cultured cell lines and fractions of toxic venom. *Iran J Pharm Res* 2012; 11: 357.

[33] Dezianian S, Zargan J, Goudarzi HR, Noormohamadi AH, Mousavi M, Alikhani HK, Johari B. In-vitro study of hottentotta schach crude venom anticancer effects on mcf-7 and vero cell lines. *Iran J Pharm Res* 2018; 19: 192-202.

[34] Mousavi M, Zargan J, Haji Noor Mohammadi A, Goudarzi HR, Dezianian S, Keshavarz Alikhani H, Johari B. Anticancer effects of the *Latrodectus dahli* crude venom on MCF-7 breast cancer cell line. *Breast J* 2019; 25: 781-782.

<https://doi.org/10.1111/tbj.13332>

PMid:31131490

[35] Torres-Larios A, Gurrola GB, Zamudio FZ, Possani LD. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *Eur J Biochem* 2000; 267: 5023-5031.

<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01556.x>

PMid:10931184

[36] Moerman L, Bosteels S, Noppe W, Willems J, Clynen E, Schoofs L, et al. Antibacterial and antifungal properties of  $\alpha$ -helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *Eur J Biochem* 2002; 269: 4799-4810.

<https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03177.x>

PMid:12354111

[37] Conde R, Zamudio FZ, Rodríguez MH, Possani LD. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett* 2000; 471: 165-168.

[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01384-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01384-3)

[38] Mousavi M, Johari B, Zargan J, Haji Noor Mohammadi A, Goudarzi HR, Dezianian S, Keshavarz Alikhani H. Investigating antibacterial effects of *Latrodectus dahli* crude venom on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. *Med Laborat J* 2019; 13: 14-19.

<https://doi.org/10.29252/mlj.13.3.14>

[39] Yağmur EA, Özkan O, Karaer KZ. Determination of the median lethal dose and electrophoretic pattern of *Hottentotta saulcyi* (Scorpiones, Buthidae) scorpion venom. *J Arthropod Borne Dis* 2015; 9: 238.

[40] San TM, Vejayan J, Shanmugan K, Ibrahim H. Screening antimicrobial activity of venoms from snakes commonly found in Malaysia. *J Appl Sci* 2010; 10: 2328-2332.

<https://doi.org/10.3923/jas.2010.2328.2332>

[41] Zeng XC, Wang S, Nie Y, Zhang L, Luo X. Characterization of BmKbpp, a multifunctional peptide from the Chinese scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch: gaining insight into a new mechanism for the functional diversification of scorpion venom peptides. *Peptides* 2012; 33: 44-51.

<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.11.012>

PMid:22115565

[42] Tossi A, Sandri L, Giangaspero A. Amphipathic,  $\alpha$ -Helical Antimicrobial Peptides. *Pept. Pept Sci* 2000; 55: 4-30.

- [61] Ulagesan S, Kim HJ. Antibacterial and antifungal activities of proteins extracted from seven different snails. *Appl Sci* 2018; 8: 1362.  
<https://doi.org/10.3390/app8081362>
- [62] Cesa-Luna C, Muñoz-Rojas J, Saab-Rincon G, Baez A, Morales-García YE, Juárez-González VR, Quintero-Hernández V. Structural characterization of scorpion peptides and their bactericidal activity against clinical isolates of multidrug-resistant bacteria. *Plos One* 2019; 14: e0222438.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222438>  
 PMid:31710627 PMCID:PMC6844485
- [63] Zerouti K, Khemili D, Laraba-Djebari F, Hammoudi-Triki D. Nontoxic fraction of scorpion venom reduces bacterial growth and inflammatory response in a mouse model of infection. *Toxin Rev* 2019; 1-15.  
<https://doi.org/10.1080/15569543.2019.1614064>
- <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.02.012>  
 PMid:28292710
- [58] Harms A, Maisonneuve E, Gerdes K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science* 2016; 354.  
<https://doi.org/10.1126/science.aaf4268>  
 PMid:27980159
- [59] Brauner A, Fridman O, Gefen O, Balaban NQ. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat Rev Microbiol* 2016; 14: 320-330.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.34>  
 PMid:27080241
- [60] Tincho MB, Morris T, Meyer M, Pretorius A. Antibacterial activity of rationally designed antimicrobial peptides. *Int J Microbiol* 2020; 2020: 2131535.  
<https://doi.org/10.1155/2020/2131535>  
 PMid:32322274 PMCID:PMC7168710

## Antibacterial effects of crude venom and their protein fractions of *Hottentotta saulcyi* scorpion

Yusof Alipour (M.Sc), Jamil Zargan (Ph.D)\*, Ashkan Haji Nour Mohammadi (M.Sc)  
Science Biology Research Center, Imam Hussein University, Tehran, Iran

\* Corresponding author. +98 21 77104934 jazrgan@ihu.ac.ir

Received: 9 Oct 2020 ; Accepted: 16 Nov 2021

**Introduction:** Infectious diseases, mainly caused by bacterial agents, are one of the most common causes of death worldwide. A significant number of these agents have been resistant to one or more antibiotics; some of them are multi-drug resistant and others are extensively drug resistant. Various antimicrobial and anticancer compounds have been reported from the venom of various species of scorpions. In this study, the antibacterial effects of crude venom and protein fractions of *Hottentotta saulcyi* were studied.

**Materials and Methods:** In this study, the electrophoresis and chromatographic patterns of crude venom of the scorpion were obtained. Then, the antibacterial properties of the crude venom and its protein fractions on a Gram-positive bacterium, *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), and a Gram-negative bacterium, *Escherichia coli* (*E. coli*), were evaluated using the minimal inhibitory concentration (MIC) assay by microdilution method.

**Results:** In the Tricine SDS-PAGE profile of the crude venom, 7 protein bands, with a molecular weight of 4.1 to 104 kDa were observed. In chromatographic studies, 14 main peaks were isolated and collected, of which 9 fractions contained protein. The crude venom at a concentration of 200 µg/ml had a significant inhibitory effect on Gram-positive and Gram-negative bacteria. The effect of the protein fractions of the crude venom was also different in these two types of bacteria.

**Conclusion:** The results of this study showed for the first time that the crude venom of *Hottentotta saulcyi* and some of its protein fractions have antibacterial properties.

**Keywords:** *Hottentotta saulcyi* scorpion, Antibacterial effects, Protein fractions

---