



Antibacterial potential of *Lucilia sericata* larval secretions and extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

Maryam Rabeh¹ , Samaneh Shahrokh² , Azadeh Karimi³ , Mansour Siavash⁴

1. Department of Microbiology, Faculty of Biological sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Falavarjan, Isfahan, Iran. E-mail: m97rabeh@gmail.com
2. Corresponding Author, Isfahan Endocrine and Metabolism Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Iran & Siavash Diabetes Clinic, Affiliated with Zist Eltiam Sepanta Knowledge-Based Company, Isfahan, Iran. E-mail: s.shahrokh143@gmail.com
3. Siavash Diabetes Clinic, Affiliated with Zist Eltiam Sepanta Knowledge-Based Company, Isfahan, Iran. E-mail: siavashdiabet@gmail.com
4. Isfahan Endocrine and Metabolism Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Iran. E-mail: siavash@med.mui.ac.ir

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Article Article history: Received: 21 March 2025 Revised: 24 May 2025 Accepted: 28 May 2025 Published online: Spring and Summer 2025 Keywords: <i>antibacterial effect, extraction, secretion, Lucilia sericata.</i>	The rising resistance of bacteria to common antibiotics has underscored the urgent need to discover and develop novel antibacterial agents. One promising natural source in this regard is the secretions and extracts of <i>Lucilia sericata</i> larvae, which have gained attention in recent years due to their antimicrobial properties and wound-healing potential. This study aimed to evaluate and compare the antibacterial effects of the secretions and extracts derived from <i>L. sericata</i> larvae against <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Escherichia coli</i> using standard microbiological methods. In this study, larval secretions and extracts were obtained from three-day-old larvae using different solvents (70% ethanol and a mixture of methanol: water: acetic acid). The antibacterial activity of the samples was assessed using well diffusion, disk diffusion, and colony counting methods against standard strains of <i>S. aureus</i> and <i>E. coli</i>. The results indicated that larval secretions alone exhibited no significant antibacterial activity. However, the extracts from dried larvae using 70% ethanol and the mixed solvent (methanol: water: acetic acid) showed considerable inhibitory effects against pathogenic bacteria. The largest inhibition zone diameter was observed with the extract prepared using the mixed solvent. Furthermore, concentrating the extracts with Dimethyl sulfoxide (DMSO) enhanced their efficacy. This study demonstrates that <i>L. sericata</i> larval extracts, especially when combined with suitable solvents, possess notable potential for inhibiting pathogenic bacteria. These extracts may serve as a complementary or alternative approach in treating infections caused by antibiotic-resistant bacteria.
Cite this article: Rabeh, M., Shahrokh, S., Karimi, A. & Siavash, M. (2025). Antibacterial potential of <i>Lucilia sericata</i> larval secretions and extracts against <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Escherichia coli</i>. <i>Iranian Journal of Plant Protection Science</i>, 56 (1), 139-150. DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2026.410134.1007111	
	© The Author(s). DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2026.410134.1007111
Publisher: The University of Tehran Press.	

Extended Abstract

Introduction

The overuse of antibiotics has led to a global crisis of bacterial drug resistance, complicating infection treatment, increasing costs, and reducing drug efficacy. The World Health Organization considers this a major threat to public health. In this context, biological products from *Lucilia sericata* larvae, of the Calliphoridae family, have emerged as a promising alternative. Maggot therapy, an FDA-approved method, is used for debriding chronic wounds and accelerating tissue repair. The secretions and extracts of these larvae contain enzymes, antimicrobial peptides, and bactericidal compounds that disrupt bacterial membranes, inhibit enzymes, and create an unfavorable environment for pathogens. These compounds can also degrade bacterial biofilms and prevent resistant colony formation. Studies demonstrate their effectiveness against resistant strains like MRSA and *Pseudomonas aeruginosa*, though research on dried or frozen larval extracts and solvent

comparisons is limited. Standardizing extraction methods and identifying active compounds are critical for broader clinical applications. Thus, this study aimed to prepare *L. sericata* secretions and extracts using multiple solvents (70% ethanol and mixed solvent including methanol: water: acetic acid mixture) and evaluate their efficacy against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* using three standard microbial methods (well plate, disk diffusion, and colony count). The study also investigated the role of DMSO in enhancing the antibacterial performance of these extracts to provide a comprehensive view of their therapeutic potential.

Materials and Methods

Three-day-old *L. sericata* larvae were reared and prepared under sterile conditions with strict hygiene protocols. For secretion preparation, live larvae were incubated in phosphate buffer saline (PBS), and the filtered secretion fluid was tested. For extract preparation, dried larvae were homogenized with two solvents: 70% ethanol and a mixture of methanol: water, acetic acid mixture (90:9:1 ratio). The resulting extracts were centrifuged, filtered, and concentrated for use. Antibacterial activity was assessed using three standard methods: well plate, disk diffusion, and colony count. Two standard strains, including *S. aureus* ATCC 25923 and *E. coli* ATCC 25922 strains were used as target bacteria. Negative controls included pure solvents (without extracts).

Results

The results showed that the dried larval extract with mixed solvent (DL9) exhibited the highest antibacterial activity across all tests, including well plate, disk diffusion, and colony count. In the disk diffusion method, DL9 produced inhibition zones of 22 mm against *S. aureus* and 16 mm against *E. coli*. In the colony count method, a 10-fold reduction in *S. aureus* colonies and a remarkable 1000-fold reduction in *E. coli* colonies were recorded after 24 hours of exposure to DL9, indicating significant bacteriostatic properties. Additionally, the 70% ethanol extract (DLE), while less effective than DL9, produced a 17 mm inhibition zone against *S. aureus* and a 10-fold reduction in bacterial count. The addition of DMSO significantly enhanced the efficacy of both extracts, particularly the ethanol extract, which showed a greater reduction in microbial load with DMSO.

Discussion

This study highlights the significant potential of *L. sericata* larval extracts, particularly in dried form and extracted with suitable solvents, for inhibiting pathogenic bacterial growth. The observed inhibitory effects against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, especially *S. aureus*, support the potential use of these extracts as disinfectants or adjuncts to antibiotic therapies in clinical settings. The results emphasize the importance of solvent selection in extracting bioactive compounds and the effectiveness of concentration methods like DMSO in enhancing their activity. These extracts could serve as alternatives to traditional antibiotics for treating drug-resistant infections. Moreover, optimizing the extraction process could lead to standardized biological products for therapeutic applications.

Conclusion

Consistent with previous studies, our findings confirm the antibacterial activity of maggot secretions and extracts. Limitations include the focus on only two bacterial species and the lack of molecular analyses to identify active compounds. Future research should explore a broader range of pathogens, cytotoxicity, biocompatibility, and the potential for loading extracts into nanocarriers.

Author contribution

All authors contributed equally to the conceptualization of the article and writing of the original and subsequent drafts.

Data availability

The data will be made available on request.

Acknowledgement

This research was supported by the Plant Protection Department of University of Kurdistan. We thank university of Kurdistan for providing research facility and support.

Ethical consideration

The study was conducted on plant-pathogen fungus and beneficial entophytic fungi that are abundant in the environment and do not require ethical approval.

Conflict of interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.



پتانسیل ضدباکتریایی ترشحات و عصاره لارو *Lucilia sericata* علیه استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی

مریم رابه^۱ | سمانه شاهرخ^۲ | آزاده کریمی^۳ | منصور سیاوش^۴

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، فلاورجان، اصفهان، ایران. رایانامه: m97Rabeh@gmail.com
۲. نویسنده مسئول، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران و کلینیک دیابت سیاوش، وابسته به شرکت دانش بنیان زیست التیام سپنتا، اصفهان، ایران. رایانامه: s.shahrokh143@gmail.com
۳. کلینیک دیابت سیاوش، وابسته به شرکت دانش بنیان زیست التیام سپنتا، اصفهان، ایران. رایانامه: siavashdiabet@gmail.com
۴. مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران. رایانامه: siavash@med.mui.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۰۱ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۳/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۰۷ تاریخ انتشار: بهار و تابستان ۱۴۰۴ کلیدواژه‌ها: اثر ضدباکتریایی، ترشحات، عصاره، لوسیلیا سریکاتا.	افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های رایج، نیاز به کشف و توسعه ترکیبات ضدباکتریایی نوین را بیش از پیش ضروری ساخته است. یکی از منابع طبیعی امیدوارکننده در این زمینه، ترشحات و عصاره‌های لارو <i>Lucilia sericata</i> می‌باشد که در سال‌های اخیر به دلیل خواص ضد میکروبی و کمک به بهبود زخم مورد توجه قرار گرفته‌اند. هدف از این مطالعه، بررسی و مقایسه اثرات ضدباکتریایی ترشحات و عصاره‌های حاصل از لارو <i>L. sericata</i> علیه باکتری‌های <i>Staphylococcus aureus</i> و <i>Escherichia coli</i> با استفاده از روش‌های استاندارد میکروبی است. در این پژوهش، ترشحات و عصاره لارو تهیه‌شده با استفاده از حلال‌های مختلف (اتانول ۷۰ درجه و ترکیب متانول:آب: اسید استیک) از لاروهای سه‌روزه استخراج شدند. فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌ها با استفاده از روش‌های چاهک پلیت، انتشار از دیسک و شمارش کلنی علیه دو سویه استاندارد باکتریایی <i>S. aureus</i> و <i>E. coli</i> ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که ترشحات لاروی به‌تنهایی فاقد اثر ضدباکتریایی قابل توجه بودند، اما عصاره‌های حاصل از لارو خشک‌شده در حلال‌های اتانول ۷۰٪ و حلال ترکیبی متانول:آب:اسید استیک، فعالیت مهاری قابل ملاحظه‌ای علیه باکتری‌های بیماریزا از خود نشان دادند. بیشترین قطر ناحیه مهاری مربوط به عصاره با حلال ترکیبی بود. همچنین، تغلیظ عصاره‌ها با DMSO اثربخشی آن‌ها را افزایش داد. این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره‌های لارو <i>L. sericata</i> به‌ویژه در ترکیب با حلال‌های مناسب، دارای پتانسیل قابل توجهی در مهار باکتری‌های بیماریزا هستند. استفاده از این عصاره‌ها می‌تواند به‌عنوان رویکردی مکمل یا جایگزین در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک مدنظر قرار گیرد.

استناد: رابه، مریم؛ شاهرخ، سمانه؛ کریمی، آزاده و سیاوش، منصور (۱۴۰۴). مهار زیستی پرمردگی فوزاریومی خیار با استفاده از دو قارچ اندوفیت *Coprinosopsis urticicola* و *Fomes fomentarius*. نشریه دانش گیاهپزشکی ایران، ۵۶ (۱)، ۱۵۰-۱۳۹. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijpps.2026.410134.1007111>



مقدمه

یکی از درمان‌های سنتی در جهان برای درمان زخم‌های مزمن، لارو درمانی (Maggot Therapy) است که به دلیل اثرات مؤثر، ایمن و مقرون به صرفه بودن، و درمان بیمار در منزل بدون نیاز به بستری شدن در مراکز درمانی و دوری از خانواده، در سال‌های اخیر به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است (Yang, Rong, & Wu, 2022). در این روش، از لاروهای استریل شده برای پاک‌سازی بافت نکروزه، ضد عفونی موضعی، و تحریک روند طبیعی ترمیم زخم استفاده می‌شود (Yan et al., 2018). ترشحات لاروها نقش مهمی در بهبود زخم از طریق چهار مرحله فیزیولوژیک دارند: هموستاز، التهاب، تکثیر و بازسازی. لاروها ضمن تحریک فیبروبلاست‌ها، کراتینوسیت‌ها و آنژیوژنز، باعث تسریع ترمیم زخم و بازسازی بافتی می‌شوند (Gazi, Taylan-Ozkan, & Mumcuoglu, 2021).

یکی از گونه‌های شناخته شده و ترجیحی در این حوزه، مگس *Lucilia sericata* از خانواده *Calliphoridae* است. لاروهای این گونه به‌طور خاص به دلیل قابلیت بالای تولید آنزیم‌های پروتولیتیک (مانند سرین پروتئازها و متالوپروتئینازها)، افزایش pH محیط زخم، و اثر مستقیم بر باکتری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Cabirol & Haase, 2019). لاروهای استریل شده *L. sericata* تنها بافت‌های مرده را هدف قرار داده و از این رو ایمنی قابل توجهی در کاربردهای بالینی دارند (Milne, Searle, & Styche, 2020).

با توجه به نقش مؤثر لارو *L. sericata* در بهبود زخم و ویژگی‌های ضدباکتریایی آن‌ها (Jiang, 2023; Nezakati, 2020; Ehteshaminia, 2020; Bazaliński, 2019)، هدف از مطالعه حاضر، تعیین فعالیت ضدباکتریایی ترشحات و عصاره‌های حاصل از این لارو علیه دو باکتری بیماری‌زا رایج، *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* به ترتیب به‌عنوان یک باکتری گرم مثبت و گرم منفی می‌باشد. در این راستا، از حلال‌های مختلف جهت عصاره گیری استفاده و ارزیابی اثرات ضد میکروبی با استفاده از روش‌های چاهک پلیت، انتشار از دیسک و شمارش کلنی انجام شد تا اثر ضدباکتریایی ترکیبات زیستی موجود در ترشحات و عصاره‌ها به‌طور جامع‌تری مشخص شود.

پیشینه پژوهش

مطالعات متعددی به بررسی اثرات ضدباکتریایی ترشحات و عصاره‌های لارو *L. sericata* پرداخته‌اند. به‌عنوان مثال، پژوهشی نشان داد که این ترشحات قادر به مهار رشد باکتری‌های مقاوم به دارو مانند *S. aureus* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) و *Pseudomonas aeruginosa* هستند (Kehrli et al., 2022). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۸ اثرات ضدباکتریایی عصاره کامل بدن لاروهای *L. sericata* علیه *S. aureus*، *E. coli* و *E. faecalis* مشاهده شد، در حالی که تأثیری بر *P. aeruginosa* نداشت. همچنین، وجود پروتئین‌های متعدد با وزن‌های مولکولی متنوع (260–10 kDa) احتمال دخالت آن‌ها در خاصیت ضدباکتریایی را تقویت می‌کند (Sig, Koru, & Araz, 2018). علاوه بر این، در بررسی شریعتی‌نیا در سال ۲۰۲۴ مشخص شد که ترشحات لارو *L. sericata* با غلظت‌های کمتر از ۰.۲۵ mg/mL، بدون اثر منفی بر سلول‌های فیبروبلاست، می‌توانند رشد باکتری‌های *S. aureus*، *E. coli* و *P. aeruginosa* را مهار کنند، در حالی که مقادیر بالاتر موجب کاهش زنده‌مانی سلول‌های میزبان می‌شود (Shariatnia, Zandi, Sanjabi, & Ghaedrahmati, 2024). همچنین پژوهش طهماسبی و همکاران نشان داد که ترشحات و عصاره‌های لارو استریل این مگس، دارای اثر ضدیشمانیایی قابل توجهی بر مراحل پرماسیتیگوت و آماسیتیگوت *Leishmania major* بوده و بدون ایجاد سمیت بر ماکروفاژها عمل می‌کنند (Tahmasebi, Soleimanifard, Sanei, Karimy, & Abtahi, 2020).

مکانیسم‌های پیشنهادی برای این اثر شامل تغییر در نفوذپذیری غشای باکتری، مهار فعالیت آنزیم‌های حیاتی و القای تخریب دیواره سلولی باکتری‌ها است. برخی مطالعات نیز به وجود آنزیم‌هایی مانند سرین پروتئازها، متالوپروتئینازها و پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs) در ترشحات لارو اشاره کرده‌اند که نقش کلیدی در خاصیت ضدباکتریایی آن‌ها دارند. این یافته‌ها تأیید

می‌کنند که ترشحات لارو می‌توانند به عنوان گزینه‌ای مؤثر و طبیعی در کنترل عفونت‌های باکتریایی، به‌ویژه در زخم‌های مزمن و مقاوم به درمان، مورد استفاده قرار گیرند (Gandy, Hansford, & Medlock, 2023).

روش‌شناسی پژوهش

۱. موجودات زنده مورد استفاده لاروهای تازه از تخم‌های مگس *L. sericata* تهیه شدند که از شرکت زیست التیام سپنتا، واقع در مرکز رشد و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان، دریافت گردید.

بیماریزاهای باکتریایی استاندارد *E. coli* ATCC 25922 و *S. aureus* ATCC 25923 از کلکسیون باکتری‌های استاندارد بیمارستان امام حسین (ع) اصفهان تهیه شدند. این پژوهش در آزمایشگاه تحقیقاتی مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم اصفهان در سال ۱۴۰۲-۱۴۰۳ انجام شد.

۲. شرایط پرورش و تغذیه لاروها تخم‌های ۰ تا ۱۲ ساعته در ویال‌های شیشه‌ای با درب‌های قابل تهویه تغذیه شدند. لاروهای سن سه از ظرف پرورش خارج شده و پس از جدا کردن بقایای محیط کشت لاروها به صورت شیمیایی استریل شده و در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگه داری شدند و همچنین خشک کردن لاروها در آن ۴۰ درجه سلسیوس انجام شد.

۳. روش‌های استخراج

ترشحات لاروی (LS):

در این روش، ۵ گرم لارو زنده سن سه استریل شده با طول حدود یک سانتی‌متر به ۵۰ میلی‌لیتر بافر فسفات اضافه شده و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس محلول از کاغذ صافی عبور داده شده و مایع حاصل از صافی میکروبی با قطر ۰/۴ میکرون عبور داده شد و در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد.

عصاره لاروی (LE): لاروهای سن سه (زنده، خشک و منجمد) هموژنیزه شده، سپس با محلول‌های مختلف شامل بافر فسفات، اتانول (۳۰، ۵۰، ۷۰، و ۹۶ درصد)، و مخلوط متانول: آب مقطر: اسید استیک (نسبت ۹۰:۹:۱) مخلوط گردیدند و به مدت یک ساعت در دمای محیط (۲۸ درجه سلسیوس) قرار گرفتند. سپس مخلوط در دمای ۴ درجه سلسیوس و با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد، مایع رویی جدا شده و از صافی میکروبی (۰/۴ میکرون) عبور داده شد و در یخچال نگهداری شد (تمام مراحل بر روی یخ انجام شد) (Meylears et al., 2002).

۴. عصاره گیری از لارو خشک LS با درصدهای مختلف اتانول با و بدون دی متیل سولفوکساید (DMSO):

پنج گرم نمونه لارو خشک به همراه ۴۰ سی سی اتانول با درصدهای ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۶ و در دمای ۴ درجه در ظرف یخ و آب در هاون چینی ساییده شده و مخلوط حاصل را به صورت جداگانه در لوله‌های فالكون استریل ریخته و برای هر درصد اتانول دو فالكون در نظر گرفته و بر روی یکی از فالكون‌ها DMSO به میزان ۵ درصد حجم نهایی اضافه کرده و در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. در نهایت نمونه‌ها در دمای ۴ درجه با دور ۳۲۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و سپس روشنشین با فیلترهای ۰/۲۲ جدا شد.

۵. بررسی فعالیت آنتی‌باکتریال ترشحات/عصاره‌ها:

الف) با استفاده از روش چاهک در پلیت:

در این روش، تعلیقی با غلظت معادل ۰/۵ مک‌فارلند از کشت تازه باکتری‌های بیماریزای استاندارد شامل *E. coli* ATCC 25922 و *S. aureus* ATCC 25923 در نرمال سالین تهیه و به روش چمنی روی محیط مولر هینتون آگار (MHA) کشت داده شد. سپس در فواصل مناسب چاهک‌هایی روی محیط کشت ایجاد شده و ۱۰۰ میکرولیتر از هر عصاره به درون چاهک‌ها

اضافه شد. برای هر مورد، حلال‌های مورد استفاده نیز به عنوان کنترل به کار رفتند. تمام پلیت‌های مولر هینتون آگار در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت نگهداری شدند و سپس قطر ناحیه مهار رشد اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد (Puttaswamy, Gupta, Regunath, Smith, & Sengupta, 2018). این آزمون با سه تکرار انجام شد.

(ب) با استفاده از روش انتشار از دیسک:

این روش یکی از رایج‌ترین روش‌های ارزیابی مواد ضد میکروبی شناخته می‌شود. دیسک‌های استریل (دیسک خالی) با ۵۰ میکرولیتر از هر عصاره پوشانده شده و تحت شرایط استریل خشک شدند. سپس تعلیقی با غلظت معادل ۰/۵ مک‌فارلند از کشت تازه باکتری استاندارد در نرمال سالین تهیه و به روش چمنی روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. دیسک‌های خشک‌شده در فواصل مناسب روی محیط کشت قرار گرفتند. دیسک‌هایی که فقط با حلال آغشته شده بودند، به عنوان شاهد استفاده شدند. در نهایت، پلیت‌های تلقیح‌شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. سپس قطر ناحیه مهار رشد اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد (Wagner et al., 2023). این آزمون با سه تکرار انجام شد.

(ج) با استفاده از روش شمارش کلنی:

در این آزمایش، برای هر عصاره شامل حلال اتانول با درصدهای مختلف (۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۶ درصد) و حلال ترکیبی دو لوله (آزمایش و شاهد) در نظر گرفته شد. هر دو لوله حاوی مخلوطی از محیط کشت TSB و بافر سالین فسفات (PBS) با نسبت ۱:۱۰۰ بودند. سپس تعلیق باکتریایی به گونه‌ای اضافه شد که غلظت نهایی باکتری در هر دو لوله آزمایش و شاهد برابر با 10^6 CFU/ml باشد. عصاره‌ها و حلال‌ها (به میزان ۲۰٪ از حجم نهایی لوله‌ها) به ترتیب به لوله‌های آزمایش و شاهد اضافه شدند. سپس از هر دو لوله آزمایش و شاهد برای هر کدام از عصاره‌ها در زمان صفر و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به روش دراپ پلیت بر روی محیط کشت TSA کشت داده شد. عصاره ای که در روش دراپ پلیت بهترین نتیجه را به دست داد به روش شمارش کلنی در زمان صفر و ۲۴ ساعته مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت، نتایج شمارش کلنی با استفاده از فرمول محاسبه تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر محاسبه شد (Singh, Pattnaik, Neogi, Jena, & Mallick, 2016). این آزمون با سه تکرار انجام شد.

یافته‌های پژوهشی

ترشحات و عصاره‌های لارو با روش‌های مختلف ذکر شده در بخش مواد و روش‌ها تهیه شدند. ترشحات تهیه شده از لارو فعالیت ضد باکتریایی قابل قبولی نشان نداد و از بین روش‌های مختلف عصاره‌گیری تنها لارو خشک و با دو نوع حلال اتانول (۷۰٪) و حلال ترکیبی (متانول: آب مقطر: اسید استیک با نسبت ۹۰:۹:۱) خواص ضد باکتریایی علیه *S. aureus* ATCC 25923 نشان دادند. همچنین از بین روش‌های به کار گرفته شده در بخش میکروب‌شناسی، بهترین نتایج با استفاده از روش‌های انتشار از دیسک و شمارش کلنی به دست آمد.

بررسی اثرات ضدباکتریایی به روش چاهک پلیت:

اثر ضدباکتریایی تمامی ترشحات و عصاره‌های تهیه شده از لارو با روش‌های مختلف به روش چاهک پلیت بررسی گردید. تنها عصاره لارو خشک با حلال ترکیبی به روش چاهک پلیت خاصیت ضدباکتریایی نشان داد. نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های لارو خشک با دو نوع حلال اتانول ۷۰ درجه و حلال ترکیبی به روش چاهک پلیت علیه دو سویه استاندارد باکتریایی در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج نشان می‌دهد که عصاره لارو خشک با حلال ترکیبی دارای فعالیت مهارتی قابل توجهی علیه *S. aureus* (قطر هاله عدم رشد ۱۶ میلی‌متر) و *E. coli* (قطر هاله عدم رشد ۱۳ میلی‌متر) بودند، در حالی که حلال‌های مورد استفاده به تنهایی فاقد هرگونه اثر مهارتی بودند. این داده‌ها مؤید نقش ترکیبات زیستی موجود در عصاره‌ها در مهار رشد باکتری‌ها هستند (جدول ۱).

جدول ۱. اندازه قطر هاله عدم رشد عصاره ها به روش چاهک پلیت

بakterی	DL9	DLE	کنترل ۱ (حلال ترکیبی)	کنترل ۲ (اتانول ۷۰ درصد)
<i>S. aureus</i>	16 mm	8 mm	8 mm	8 mm
<i>E. coli</i>	13 mm	8 mm	8 mm	8 mm

اختصارات: DL9: عصاره لارو خشک با حلال ترکیبی، DLE: عصاره لارو خشک با حلال اتانول ۷۰٪
 شکل ۱ نتایج تصویری از آزمون چاهک پلیت برای عصاره با حلال ترکیبی علیه *S. aureus* و *E. coli* را نمایش می دهد. همان طور که در تصویر مشاهده می شود، تشکیل ناحیه شفاف اطراف چاهک ها نشان دهنده حضور ترکیبات مؤثر ضدباکتریایی در عصاره است. این نتایج تصویری با داده های کمی جدول ۱ مطابقت داشته و اثربخشی عصاره DL9 را در مهار هر دو سویه باکتری تأیید می کند.

شکل ۱. اثر ضد باکتریایی عصاره با حلال ترکیبی به روش چاهک پلیت علیه *E. coli* (سمت چپ) *S. aureus* (سمت راست).

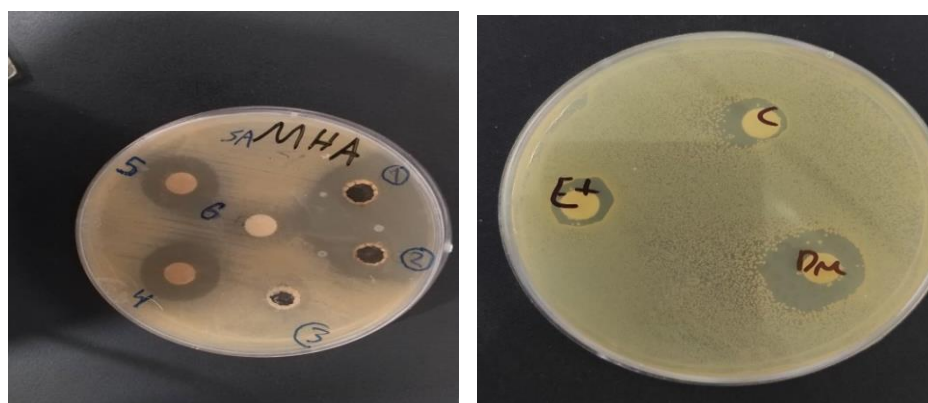
بررسی اثرات ضدباکتریایی به روش انتشار از دیسک:

نتایج حاصل از آزمون انتشار از دیسک (جدول ۲) نشان می دهند که هر دو نوع عصاره لارو خشک با حلال اتانول و بخصوص حلال ترکیبی دارای خاصیت ضدباکتریایی هستند و به ویژه علیه باکتری های گرم مثبت عملکرد مؤثرتری دارند. شکل ۲ مؤید داده های کمی جدول ۲ هستند و تأثیر مثبت عصاره های لارو خشک بر مهار رشد *S. aureus* را به تصویر می کشد.

جدول ۲. قطر هاله عدم رشد عصاره ها به روش انتشار از دیسک

بakterی	DLE	کنترل ۲ (اتانول ۷۰ درصد)	DL9	کنترل ۱ (حلال ترکیبی)
<i>S. aureus</i>	17 mm	10 mm	22 mm	6 mm
<i>E. coli</i>	-	-	16 mm	6 mm

اختصارات: DL9: عصاره لارو خشک با حلال ترکیبی، DLE: عصاره لارو خشک با حلال اتانول ۷۰٪



شکل ۲. اثر مهاری عصاره LD9 (سمت چپ) و عصاره DLE (سمت راست) (C: شاهد، ET: اتانول، DMSO:DM) علیه *S. aureus* به روش انتشار از دیسک

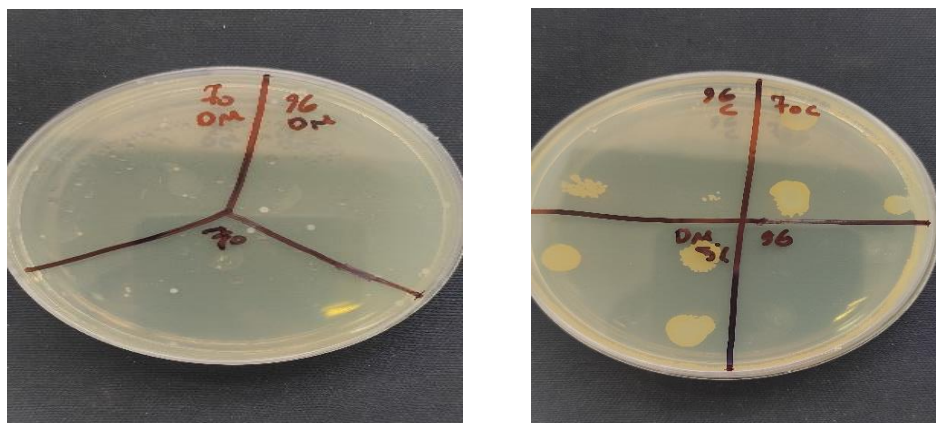
بررسی اثرات ضدباکتریایی به روش شمارش کلنی

جدول ۳ تعداد باکتری را در زمان صفر و پس از ۲۴ ساعت مجاورت عصاره لارو خشک با حلال ترکیبی با سوسپانسیون باکتری های *S. aureus* و *E. coli* نشان میدهد. کاهش تعداد باکتری ها نسبت به کنترل حلال به میزان ۱۰ و ۱۰۰۰ برابر به ترتیب پس از ۲۴ ساعت مجاورت عصاره با باکتری های *S. aureus* و *E. coli* مشاهده شد. نتایج نشان میدهد، گرچه مهار کامل حاصل نشده، اما کاهش بار میکروبی تأییدی بر خاصیت باکتریوستاتیک عصاره با حلال ترکیبی است.

جدول ۳. میزان اثر بخشی عصاره با حلال ترکیبی علیه باکتریهای پاتوژن به روش شمارش کلنی

سوسپانسیون باکتری (CFU/ml)	پس از ۲۴ ساعت مجاورت عصاره با	در زمان صفر (CFU/ml)	نمونه	باکتری
$1/3 \times 10^4$		$1/5 \times 10^5$	شاهد حلال	<i>S. aureus</i>
$1/2 \times 10^3$		$1/12 \times 10^5$	تیمار	
$1/5 \times 10^6$		$1/6 \times 10^5$	شاهد حلال	<i>E. coli</i>
$1/2 \times 10^3$		$1/4 \times 10^5$	تیمار	

اثر ضد باکتریایی عصاره های لارو با درصدهای مختلف حلال اتانول به روش دراپ پلیت در شکل ۳ (تصویر سمت چپ) نشان داده شده است. همانطور که ملاحظه می گردد اتانول ۷۰٪ بیشترین اثر ضدباکتریایی را علیه *S. aureus* دارد. این داده ها از نظر کاربردی حائز اهمیت هستند زیرا غلظت حلال تأثیر مستقیم بر استخراج ترکیبات فعال زیستی و اثربخشی آنها دارد.



شکل ۳. بررسی خاصیت ضد باکتریایی عصاره های اتانولی با درصدهای مختلف علیه *S. aureus* استاندارد به روش دراپ پلیت (عکس سمت چپ DMSO:DM70 ۷۰ درصد، DMSO:DM96 ۹۶ درصد، DMSO: ۷۰ درصد به همراه عصاره عکس سمت راست 96C: اتانول ۹۶ درصد، 70C: اتانول 70 درصد، ۹۶: اتانول ۹۶ درصد به همراه عصاره، DMS.C: DMSO شاهد)

جدول ۴ تعداد باکتری را در زمان صفر و پس از ۲۴ ساعت مجاورت عصاره لارو خشک با حلال اتانول ۷۰٪ با سوسپانسیون باکتری های *S. aureus* و *E. coli* نشان می دهد. کاهش تعداد باکتری ها نسبت به شاهد حلال به میزان ۱۰ برابر پس از ۲۴ ساعت مجاورت عصاره با باکتری های *S. aureus* و *E. coli* مشاهده شد. کاهش ده برابری بار میکروبی، تأییدی بر خاصیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی است.

جدول ۴. میزان اثر بخشی عصاره اتانول علیه باکتریهای بیماریزای استاندارد به روش کلنی کانت

باکتری	نمونه	شمارش کلنی بر حسب CFU/ml	
		زمان صفر	پس از ۲۴ ساعت
<i>S. aureus</i>	شاهد حلال	$10^5 \times 1/6$	$10^4 \times 1/2$
	تیمار	$10^5 \times 1/4$	$10^3 \times 3$
<i>E. coli</i>	شاهد حلال	$10^5 \times 1/26$	$10^4 \times 1/4$
	تیمار	$10^5 \times 1/0.1$	$10^3 \times 1/2$

جدول ۵ نشان دهنده تفاوت اثر عصاره اتانولی ۷۰٪ به تنهایی و در ترکیب با DMSO است. نتایج نشان می دهند که افزودن DMSO در مراحل انتهایی عصاره گیری میتواند سبب افزایش کارایی عصاره در کاهش رشد باکتری شود. این داده ها پیشنهاد می دهند که استفاده از روش های تغلیظ مناسب می تواند اثربخشی عصاره های زیستی را بهبود بخشد.

جدول ۵. بررسی خاصیت ضد باکتریایی عصاره اتانولی ۷۰ درصد با و بدون DMSO به روش کلنی کانت علیه *S. aureus* استاندارد بر حسب CFU/ml

	شاهد حلال	اتانول ۷۰ درصد	اتانول ۷۰ درصد با DMSO
کلنی کانت t_0	$10^5 \times 3/3$	$10^5 \times 2/1$	$10^5 \times 1/8$
کلنی کانت t_{24}	$10^5 \times 4$	$10^4 \times 3$	$10^4 \times 1$

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، فعالیت ضدباکتریایی ترشحات و عصاره‌های به‌دست‌آمده از لارو *Lucilia sericata* علیه دو باکتری بیماری‌زا رایج *E. coli* و *S. aureus* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ترشحات لارو به‌تنهایی فاقد اثر قابل توجهی بودند اما عصاره‌های حاصل از لارو خشک با استفاده از حلال‌های اتانول ۷۰ درصد و مخلوط متانول:آب:اسید استیک (نسبت ۹۰:۹:۱) دارای اثر مهاری، به‌ویژه علیه *S. aureus* بودند. همچنین، استفاده از DMSO به‌عنوان تغلیظ‌کننده عصاره‌ها موجب افزایش اثربخشی آن‌ها شد. از آنجایی که برخی پروتئین‌ها و پپتیدها دارای نواحی غیر قطبی هستند و این مورد سبب می‌شود که حلالیت آن‌ها در حلال‌های قطبی کاهش یابد، در این پژوهش از دی متیل سولفوکساید (DMSO) به‌عنوان حلال آلی استفاده شد تا حلالیت این نوع پپتیدهای احتمالی افزایش دهد.

در مطالعه حاضر ثبت قطر هاله مهاری ۲۲ و ۱۶ میلی‌متری برای عصاره DL9 به ترتیب علیه *S. aureus* و *E. coli* و همچنین قطر هاله ۱۷ mm برای عصاره DLE علیه *S. aureus* در روش انتشار از دیسک و همچنین کاهش ۱۰ و ۱۰۰۰ برابری تعداد باکتری *S. aureus* و *S* و کاهش ۱۰ برابری تعداد این دو باکتری به ترتیب پس از ۲۴ ساعت مجاورت عصاره های DL9 و DLE با باکتری، گواهی بر فعالیت باکتریوستاتیک عصاره های مذکور است. یافته‌های این پژوهش در زمینه اثرات ضدباکتریایی ترشحات و عصاره‌های حاصل از لارو *L. sericata*، در تطبیق با مطالعات پیشین، نشان‌دهنده هم‌راستایی قابل توجهی با ادبیات علمی موجود است.

مطالعه (Meylars 2003) و همکاران با تمرکز بر جداسازی پپتیدهای ضدباکتریایی از عصاره لارو *Neobellieria bullata* با حلال ترکیبی (متانول: آب: اسید استیک)، به معرفی ترکیباتی با فعالیت میکروب‌کشی بالا مانند β -alanyl-tyrosine پرداخت که توانایی مهار طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها را داشت. اگرچه در پژوهش حاضر به تحلیل مولکولی پرداخته نشد، اما نتایج به دست آمده تأییدی بر حضور ترکیبات مؤثر ضدباکتریایی در عصاره های اتانولی و حلال ترکیبی است (Meylars et al., 2002).

در پژوهش (Daeschlein 2006)، کاهش معنی‌دار تعداد کلنی‌ها در مدل کشت همزمان عصاره لارو (استخراج شده با حلال اتانول) و باکتری (*E. coli* و *S. aureus*) با ضریب کاهش ۱/۴ گزارش شد (Daeschlein, Mumcuoglu, 2007). (Assadian, Hoffmeister, & Kramer, 2007).

مطالعه (Barnes 2010) با مقایسه میان گونه‌های مختلف مگس‌ها نشان داد که *Lucilia sericata* مؤثرترین منبع ترشحات و عصاره (ES) ضدباکتریایی برای کنترل *S. aureus* است. همچنین ES حاصل از *L. sericata* و *Calliphora vicina* باعث مهار رشد *E. coli* در مدت زمان ۲۴ ساعت شدند، به‌طوری‌که کاهش میانگین تعداد باکتری‌ها برای *L. sericata* معادل ۸۴٪ و برای *C. vicina* حدود ۶۳٪ گزارش شد (Barnes, K. M., Gennard, D. E., & Dixon, R. A. 2010).

در مطالعه (Korhan 2018) گزارش شد که عصاره کل بدن لارو *Lucilia sericata* توان مهاری قابل‌توجهی علیه باکتری‌های *S. aureus*، *E. coli* و *E. faecalis* دارد. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که عصاره DL9 در برابر *S. aureus* و *E. coli* اثر بازدارندگی داشته است. هرچند میانگین قطر ناحیه مهاری در دو مطالعه یکسان نیست، اما هم‌پوشانی نسبی میان یافته‌ها وجود دارد. این اختلاف می‌تواند ناشی از تفاوت در نوع عصاره (کل بدن در مقایسه با عصاره اختصاصی)، روش استخراج ترکیبات فعال، غلظت به‌کاررفته و همچنین شرایط آزمایشگاهی از جمله نوع محیط کشت، مدت انکوباسیون و ویژگی‌های سویه‌های باکتری مورد استفاده باشد. با وجود این اختلافات، شباهت کلی نتایج نشان می‌دهد که ترکیبات زیستی موجود در عصاره لارو به طور عمومی توانایی مهار رشد هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و منفی را دارند و این موضوع اهمیت توجه به استانداردسازی شرایط تهیه و آزمون عصاره را در مقایسه‌های بین‌مطالعه‌ای برجسته می‌کند.

در این پژوهش، سه نوع حلال شامل اتانول ۷۰٪، بافر فسفات و ترکیب متانول:آب:اسید استیک برای استخراج عصاره‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. ویژگی قطبی بودن اتانول و خاصیت نفوذپذیری ترکیب متانول:آب:اسید استیک، به استخراج بهتر ترکیبات زیست فعال از بافت لارو کمک کرد. نتایج نشان دادند که حلال ترکیبی دارای قدرت استخراجی بالاتری برای ترکیبات ضدباکتریایی مؤثر بوده است (Meylears et al., 2002).

از جمله نقاط قوت این پژوهش می‌توان به طراحی مقایسه‌ای با انواع مختلف لارو (زنده، خشک و فریز شده) و استفاده از چند نوع حلال اشاره کرد که امکان تحلیل دقیق‌تر را فراهم آورد. همچنین استفاده از چند روش استاندارد ارزیابی اثرات ضدباکتریایی (چاهک پلیت، انتشار از دیسک، کلنی کانت) دقت و صحت نتایج را افزایش داد. از مهم‌ترین محدودیت‌های این مطالعه، عدم امکان خالص‌سازی و آنالیز دقیق مولکولی ترکیبات مؤثره عصاره‌ها به دلیل کمبود منابع مالی و همچنین محدود بودن تعداد گونه‌های باکتریایی بررسی شده اشاره کرد. همچنین، زمان‌بر بودن فرآیند عصاره‌گیری و حفظ شرایط استریل در تمام مراحل کار نیز از چالش‌های اجرایی این مطالعه بود.

پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، این عصاره‌ها برای بررسی اثرات ضدباکتریایی روی سایر پاتوژن‌های انسانی و گیاهی به کار گرفته شوند. همچنین پیشنهاد می‌گردد عصاره‌گیری از لارو خشک با استفاده از حلال ترکیبی حاوی اتانول (به جای متانول) تکرار شده و نتایج از نظر سمیت سلولی و زیست‌سازگاری نیز ارزیابی شوند. ترکیب این عصاره‌ها با نانوذرات یا حامل‌های زیستی نیز می‌تواند در افزایش پایداری و اثربخشی آنها مؤثر باشد.

سپاسگزاری

در پایان، نگارندگان این اثر بر خود لازم می‌دانند از «مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی اصفهان» به دلیل همکاری صمیمانه و فراهم‌سازی زیرساخت‌های آزمایشگاهی و همچنین از «دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان» به منظور حمایت مالی از این پروژه صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند. همچنین از «شرکت زیست التیام سپنتا» به دلیل در اختیار گذاشتن لاروها و از «درمانگاه دیابت سیاوش» به واسطه‌ی حمایت‌های علمی و معنوی صمیمانه سپاسگزاری نماید.

هیچگونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

REFERENCES

- Barnes, K. M., Gennard, D. E., & Dixon, R. A. (2010). An assessment of the antibacterial activity in larval excretion/secretion of four species of insects recorded in association with corpses, using *Lucilia sericata* Meigen as the marker species. *Bulletin of entomological research*, 100(6), 635-640. doi.org/10.1017/S000748530999071X
- Bazaliński, D., Kózka, M., Karnas, M., & Więch, P. (2019). Effectiveness of chronic wound debridement with the use of larvae of *Lucilia sericata*. *Journal of clinical medicine*, 8(11), 1845.
- Cabirol, A., & Haase, A. (2019). The neurophysiological bases of the impact of neonicotinoid pesticides on the behaviour of honeybees. *Insects*, 10(10), 344.
- Daeschlein, G., Mumcuoglu, K., Assadian, O., Hoffmeister, B., & Kramer, A. (2007). In vitro antibacterial activity of *Lucilia sericata* maggot secretions. *Skin pharmacology and physiology*, 20(2), 112-115.
- Ehteshaminia, Y., Mohammadi, H., Mahdavi, S. A., & Rahimi, M. (2020). A Review on maggot therapy by *Lucilia sericata* larvae on infectious wounds. *Tabari Biomedical Student Research Journal*.
- Gandy, S. L., Hansford, K. M., & Medlock, J. M. (2023). Possible expansion of *Ixodes ricinus* in the United Kingdom identified through the Tick Surveillance Scheme between 2013 and 2020. *Medical and veterinary entomology*, 37(1), 96-104.

- Gazi, U., Taylan-Ozkan, A., & Mumcuoglu, K. Y. (2021). The effect of *Lucilia sericata* larval excretion/secretion (ES) products on cellular responses in wound healing. *Medical and veterinary entomology*, 35(3), 257-266.
- Jiang, X., Kong, X., Wang, X., Yu, Z., Guo, X., Jin, M., . . . Wei, L. (2023). Oroxylin a glucuronide as a novel class of reversible inhibitors of Sortase a, combats MRSA-induced infections. *Journal of Applied Microbiology*, 134(5), lxad089.
- Kehrli, P., Monnier, J., Vonlanthen, O., Cara, C., Jelmini, L., Steiner, T., . . . Linder, C. (2022). Optimization of the sampling method to monitor *Drosophila suzukii* infestation in vineyards. *Journal of Applied Entomology*, 146(4), 408-414.
- Meylears, K., Cerstiaens, A., Vierstraete, E., Baggerman, G., Michiels, C., De Loof, A., & Schoofs, L. (2002). Antimicrobial compounds of low molecular mass are constitutively present in insects: characterisation of β -alanyl-tyrosine. *Current Pharmaceutical Design*, 8, 99-110.
- Milne, J., Searle, R., & Styche, T. (2020). The characteristics and impact of hard-to-heal wounds: results of a standardised survey. *Journal of wound care*, 29(5), 282-288.
- Nezakati, E., Hasani, M. H., Zolfaghari, P., Rashidan, M., & Sohrabi, M. B. (2020). Effects of *Lucilia sericata* maggot therapy in chronic wound treatment: A randomized clinical trial. *Chronic Wound Care Management and Research*, 11-17.
- Puttaswamy, S., Gupta, S. K., Regunath, H., Smith, L. P., & Sengupta, S. (2018). A comprehensive review of the present and future antibiotic susceptibility testing (AST) systems. *Arch Clin Microbiol*, 9(3).
- Shariatnia, A., Zandi, M., Sanjabi, M. R., & Ghaedrahmati, A. (2024). Antibacterial Potential of *Lucilia Sericata* excretions/secretions in bovine cutaneous wounds. *Microbiology, Metabolites and Biotechnology*, 7(1), 48-56.
- Sig, A. K., Koru, O., & Araz, E. (2018). Investigation of whole body extract metabolites of *Lucilia sericata* larvae and potential antibacterial effects. *Turkish Journal of Clinics and Laboratory*, 9(3), 191-198.
- Singh, N., Pattnaik, D., Neogi, D. K., Jena, J., & Mallick, B. (2016). Prevalence of ESBL in *Escherichia coli* isolates among ICU patients in a tertiary care hospital. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 10(9), DC19.
- Tahmasebi, M., Soleimanifard, S., Sanei, A., Karimy, A., & Abtahi, S. M. (2020). A survey on inhibitory effect of whole-body extraction and secretions of *Lucilia sericata*'s Larvae on *Leishmania major* In vitro. *Advanced Biomedical Research*, 9(1), 12.
- Wagner, G. E., Berner, A., Lipp, M., Kohler, C., Assig, K., Lichtenegger, S., . . . Gad, A.-M. (2023). Protein microarray-guided development of a highly sensitive and specific dipstick assay for glanders serodiagnostics. *Journal of Clinical Microbiology*, 61(1), e01234-01222.
- Yan, L., Chu, J., Li, M., Wang, X., Zong, J., Zhang, X., . . . Wang, S. (2018). Pharmacological properties of the medical maggot: a novel therapy overview. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018(1), 4934890.
- Yang, L., Rong, G.-C., & Wu, Q.-N. (2022). Diabetic foot ulcer: challenges and future. *World journal of diabetes*, 13(12), 1014.