Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 1 (March-April)

Journal homepage: www.ijmm.ir

The survey of molecular and antimicrobial activity of isolated bacteria from the Caspian Sea

Sajad Harounabadi, Seyyed Mansour Meybodi, Seyyed Khalil Shokouhi Mostafavi

Department of Microbiology, Islamic Azad University, Tonekabon branch, Tonekabon, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2014/11/23
Accepted: 2015/03/04
Available online:2016/03/10

Article Subject:
Antimicrobial Metabolits

IJMM 1395; 10(1): 16-23

Corresponding author at:
Sajad Harounabadi

Department of Microbiology, Islamic Azad University, Tonekabon branch, Iran.

Tel:
+98 912 5275053

Email:
s.harounabadi@gmail.com

Abstract

Background and Aim: Marine microorganisms have an astonishing potential for producing antimicrobial substances against pathogenic bacteria. In this study, isolation and measurement of antimicrobial activity among these microorganisms against some pathogenic bacteria was carried out.

Materials and Methods: Samples were collected in autumn from the west of the Caspian Sea. Isolated samples were purified and antimicrobial activity among these samples against some pathogenic bacteria were measured by the use of two methods. At the end, genetic substance (DNA) of the strains with antimicrobial effect against pathogenic bacteria was extracted and polymerase chain reaction with universal primers was carried out. Isolated strains were identified by molecular method (16SrDNA PCR sequencing) and the strains were submitted and registered as new marine strains in the NCBI.

Results: Results showed, the strains with antimicrobial activity had a noticeable effect on gram positive bacteria. So that gram positive bacteria were nearly inhibited in all cases but antimicrobial activity was restricted against gram negative bacteria, because gram negative bacteria were inhibited only in few cases. Finally, identification of stains with antimicrobial effect showed, the strains belong to *Bacillus* genus.

Conclusions: According to this result; we can use marine bacteria for controlling growth of pathogenic bacteria that are resistant to drugs and as a big threat for the human health. Also we can optimize conditions for producing antimicrobial substances among them and we can extract them in industrial conditions for increasing quality and quantity antimicrobial substances in these bacteria for the use in different industries such as pharmaceutical industry.

Key Words: Sea water, Disk diffusion antimicrobial test, Antimicrobial Agents, Polymerase chain reaction, Sequence analysis, *Bacillus* spp.

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Harounabadi S, Meybodi S M, Shokouhi S K. The survey of molecular and antimicrobial activity of isolated bacteria from the Caspian sea. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (1) :16-23

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران
سال ۱۰، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۵
Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی مولکولی و فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های جداشده از دریای خزر

سجاد هارون آبادی، سید منصور میبدی، سید خلیل شکوهی مصطفوی

گروه میکروب شناسی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه ازاد اسلامی واحدتنکابن، تنکابن، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۰۱
پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۱۳
انتشار آنلاین: ۱۳۹۴/۱۲/۲۱
موضوع:
متابولیت‌های ضد میکروبی
IJMM 1395; 10(1): 16-2۳

نویسنده مسئول:
سجاد هارون آبادی
گروه میکروب شناسی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه ازاد اسلامی واحدتنکابن، تنکابن، ایران
تلفن: ۰۹۱۲۵۲۷۵۰۵۳
پست الکترونیک:
s.harounabadi@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: میکروارگانیسم‌های آبزی توانایی شگرفی در تولید مواد ضد میکروبی علیه باکتری‌های پاتوژن دارند. در این مطالعه جداسازی این میکروارگانیسم‌ها و سنجش اثر ضد میکروبی آن‌ها علیه برخی پاتوژن‌های بیماری‌زا انجام شد.

مواد و روش ها: نمونه‌ها در فصل پاییز و از غرب دریای خزر جمع‌آوری شدند، نمونه‌های جداشده تخلیص و اثر آن‌ها بر برخی پاتوژن‌های بیماری‌زا با استفاده از دو روش سنجیده شد. سویه‌های دارای اثر ضد میکروبی بر پاتوژن‌های شاخص، ماده ژنتیکی موجود در آن‌ها (DNA) استخراج و با استفاده از پرایمرهای جهانی واکنش زنجیری پلیمراز انجام شد. سویه‌های جداشده با استفاده از تکنیک مولکولی ۱۶srDNA PCR sequencing شناسایی و به عنوان سویه‌های جدید آبزی در پایگاه بانک اطلاعات ژنی ثبت شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد سویه‌های دارای خاصیت ضد میکروبی اثر قابل‌توجهی بر پاتوژن‌های گرم مثبت داشتند، بطوریکه گرم مثبت‌ها تقریباً در اکثر موارد مهار شدند. اما اثر ضد میکروبی این سویه‌ها در برابر گرم منفی‌ها بسیار ناچیز بود و تنها در چند مورد مشاهده شد. شناسایی سویه‌های دارای اثر ضد میکروبی نشان داد که متعلق به جنس باسیلوس ها می‌باشند.

نتیجه‌گیری: می‌توان از توانایی این باکتری‌های آبزی جهت کنترل رشد پاتوژن‌های مقاوم به دارو که تهدید جدی برای سلامت انسانی می‌باشند استفاده کرد. همچنین با بهینه‌سازی شرایط تولید ماده ضد میکروبی در آن‌ها و تخلیص در شرایط صنعتی می‌توان کیفیت و مقدار عصاره ضد میکروبی تخلیص شده از آن‌ها را جهت استفاده در صنایع مختلف مانند صنعت دارویی افزایش داد.

کلمات کلیدی: آب دریا، تست ضد میکروبی انتشار از دیسک، عوامل ضد میکروبی، واکنش زنجیری پلیمراز، آنالیز توالی، باسیلوس

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

اقیانوس ها و دریاها دارای تنوع وسیعی از جمعیت‌های میکروبی می‌باشند که بسیاری از آن‌ها تاکنون شناخته نشده اند (۱). حدود $۳/۶ \times ۱۰^{۲۹}$ میکروارگانیسم از لایه‌های مختلف محیط‌های آبزی شامل: سطح، عمق و ... کشف و جداسازی شده است (۲). در مدت دو دهه گذشته تحقیقاتی در رابطه با باکتری‌های آبزی، به ویژه در مورد پتانسیل این میکروارگانیسم‌ها جهت تولید متابولیت های ثانویه انجام شده است. دلیل منطقی برای تولید متابولیت های ثانویه از قبیل مواد ضد میکروبی در میان میکروب‌ها بر اساس این حقیقت است که تولید ترکیبات ضد میکروبی مزیتی بزرگ برای میکروارگانیسم‌ها جهت رقابت برای تصاحب فضا و غذا محسوب می‌شود (۳-۱). از سال ۱۹۵۰ تاکنون تعداد زیادی از ترکیبات طبیعی با ساختارهای متنوع و فعالیت‌های خیره‌کننده از ارگانیسم‌های آبزی کشف و جداسازی شده است (۴). تعداد ترکیبات جداشده از باکتری‌های آبزی به‌طور سریعی رو به افزایش است و هم‌اکنون بالغ بر ۱۸۰۰۰ ترکیب شناسایی شده و همچنین صدها ترکیب مختلف نیز هر ساله کشف و جداسازی می‌شوند (۵). در طی سال‌های گذشته میکروارگانیسم‌هایی با مقاومت‌های چند دارویی شناسایی‌شده‌اند که نابودی آن‌ها با آنتی‌بیوتیک‌های منفرد بسیار مشکل است. درنتیجه این امر شناسایی و کشف میکروارگانیسم‌های وحشی با توانایی تولید آنتی‌بیوتیک یا مواد ضد میکروبی امری ضروری می‌باشد (۸-۶). مواد ضد میکروبی به‌طور وسیعی در میان باکتری‌های مختلف تولید می‌شوند، این مواد قادر به کشتن و یا ممانعت از رشد دیگر میکروارگانیسم‌ها می‌باشند (۹). گونه‌های *باسیلوس* باکتری‌هایی

گرم مثبت، هوازی یا بی‌هوازی اختیاری، میله‌ای شکل و دارای اسپور می‌باشند که به‌طور وسیعی در طبیعت پراکنده شده اند. *باسیلوس*‌ها دارای توانایی‌های گوناگونی می‌باشند که به آن‌ها قدرت بقا در محیط‌های گوناگون و رقابت با سایر ارگانیسم‌های حاضر در این محیط‌ها را می‌دهد. این توانایی‌ها مربوط به تشکیل اسپور و تولید متابولیت هایی می‌باشد که باعث مقاومت و پایداری آن‌ها در برابر گرما، سرما و همچنین اثرات آنتاگونیستی بر دیگر میکروارگانیسم‌ها می‌شود (۱۲-۱۰). جنس *باسیلوس* شامل گونه‌های متنوعی می‌باشد که تاریخچه‌ای قدیمی در زمینه استفاده در صنعت به شکل بی‌خطر را دارند. محصولات تجاری که به‌طور رایج از *باسیلوس ها* مشتق می‌شوند شامل: آنزیم‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها، آمینواسیدها و حشره‌کش‌ها می‌باشند. پتانسیل *باسیلوس ها* جهت تولید آنتی‌بیوتیک بیشتر از ۵۰ سال است که مورد شناسایی قرار گرفته است. بسیاری از باکتریوسین ها و مواد ممانعت کننده شبیه باکتریوسین از جنس *باسیلوس* استخراج و شناسایی شده است، در این زمینه به‌طور مثال می‌توان به سرین تولید شده از *Bacillus cereus Gn105* و سرین ۷ تولید شده از *Bacillus cereus Bc7* اشاره کرد که سبب ممانعت از رشد در محدوده وسیعی از گرم مثبت‌ها می‌شوند (۱۳). *باسیلوس ها* در زمینه‌های صنعتی به دلایل زیادی از جمله: رشد بالا در زمان کوتاه، توانایی تولید پروتئین‌های ترشحی در محیط کشت خارج سلولی و نیز بی‌خطر بودن برای استفاده در صنایع دارویی و غذایی مورد توجه هستند (۱۴). باکتریوسین ها پلی پپتیدهایی هستند که توانایی ممانعت از رشد ارگانیسم‌های خاص را دارند. انواع مختلفی از این مولکول‌ها از ارگانیسم‌های ساکن در زیستگاه‌های مختلف جدا شده‌اند، ارگانیسم‌هایی از قبیل: *Bacillus subtilis, Bacillus badius, Bacillus marinus, Bacillus mycoides, Bacillus licheniformis, Bacillus pumilus* از زیستگاه های آبی برای تولید متابولیت های ثانویه مورد تحقیق و مطالعه قرار گرفته اند. بعلاوه باکتریوسین تولید شده از گونه‌های *باسیلوس* و به‌طور منحصر به فرد از *باسیلوس پومیلوس* دارای خاصیت ممانعت کنندگی در برابر محدوده وسیعی از میکروارگانیسم‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشد (۱۵). باکتری‌های آبزی از جنس *باسیلوس* به عنوان تولید کننده متابولیت های ضد میکروبی به خوبی شناخته شده‌اند، نمونه‌های گزارش‌شده شامل: macrolactin F, Osuccinylmacrolactin F-7, Osuccinylmacrolactin A-7 از گونه *باسیلوس* می‌باشند (۱۶). تعداد آنتی‌بیوتیک‌های مشتق از *باسیلوس ها* بالغ بر ۱۶۷ عدد می‌باشد که از این تعداد حدود ۶۶ عدد مشتق از *باسیلوس سوبتیلیس*، حدود ۲۳ عدد مشتق از *باسیلوس برویس*، سایر آنتی‌بیوتیک‌های پپتیدی باقی مانده از دیگر گونه‌های جنس *باسیلوس* مشتق می‌شوند. آنتی‌بیوتیک‌های اصلی از این جنس شامل: cerexin, zwittermicin (مشتق از *باسیلوس سرئوس*) pumulin (مشتق از *باسیلوس پومیلوس*) و mycobacillin, baci-tracin polymyxin, difficidin, subtilin, (مشتق از *باسیلوس سوبتیلیس*) می‌باشند. بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های پپتیدی مشتق از *باسیلوس ها* در برابر گرم مثبت‌ها فعال هستند، اگرچه ترکیباتی از قبیل Poly-myxin, Colistin, circulin تقریباً به‌طور ویژه‌ای بر روی گرم منفی‌ها فعالیت دارند (۲۰-۱۷). هدف اصلی این تحقیق شناسایی و جداسازی باکتری‌های آبزی با اثر ممانعت کنندگی بر برخی سویه‌های شاخص پاتوژن (تهدید کننده سلامت انسانی و تا حدی دارای مقاومت دارویی) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

نمونه‌گیری در فصل پاییز از بخش غربی دریای خزر در استان مازندران (شهرستان رامسر) و تحت شرایط کاملاً استریل صورت گرفت. نمونه‌گیری از عمق ۵۰ سانتی‌متری و در فاصله ۱۵۰ الی ۲۰۰ متری از ساحل انجام شد (دلیل لحاظ کردن این فاصله احتراز از آلودگی‌های نزدیک به ساحل و وجود سویه‌های غیربومی بود). نمونه‌ها در حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر داخل ظروف در پیچ‌دار تهیه و در جعبه یخ به آزمایشگاه انتقال داده شدند. هر یک از نمونه‌ها با نام اختصاری مشخص (RS) که برگرفته از ابتدای نام منطقه و شماره سویه می‌باشد مشخص شدند.

جداسازی باکتری‌های آبزی

از هر یک از نمونه‌ها تحت حالت سترون رقت‌های ۱-۱۰ تا ۸-۱۰ تهیه و مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از هر کدام از رقت‌ها روی سطح پلیتی که حاوی محیط کشت مارین آگار (مرک-آلمان) بود کشت سفره‌ای داده شد. محیط مارین آگار (مرک-آلمان) با غلظت یک‌دهم تهیه و pH آن بین ۷/۲ تا ۷/۶ تنظیم گردید. در انتها پلیت ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس داخل گرمخانه قرار داده شدند (۲۱).

بهینه‌سازی باکتری‌های آبزی جهت تولید فراورده ضد میکروبی و تخلیص عصاره ضد میکروبی

باکتری‌هایی که بر اساس شکل ظاهری و رنگ‌آمیزی گرم از یکدیگر تفکیک‌شده بودند، به‌طور جداگانه تحت شرایط سترون و به میزان ۱ لوپ در ۳۰۰ میلی‌لیتر محیط مارین براث (مرک-آلمان) تلقیح شدند. در این مرحله نیز pH محیط بین ۷/۲-۷/۶ تنظیم شد. ارلن های حاوی باکتری تلقیح شده در داخل گرمخانه شیکردار در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و دور ۲۲۰ rpm به مدت ۷ روز قرار داده

شدند. پس از گذشت ۷ روز نمونه‌ها از داخل شیکر انکوباتور خارج و جهت انجام سانتریفیوژ به لوله‌های آزمایش منتقل شدند. سانتریفیوژ در دور ۸۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه انجام و در پایان مایع رویی جدا شد. عمل استخراج ماده ضد میکروبی از مایع رویی ۳ بار و هر بار به وسیله ۱۰۰ میلی‌لیتر اتیل استات انجام شد، در مجموع ۳۰۰ میلی‌لیتر اتیل استات برای استخراج عصاره ضد میکروبی برای هر نمونه استفاده شد. درنهایت تحت دمای ۳۷ درجه سلسیوس حلال خارج و عصاره خام میکروبی به دست آمد (۲۱).

ارزیابی و سنجش فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های آبزی

در مرحله سنجش فعالیت ضد میکروبی به سویه‌های مرجع خاصی برای بررسی اثر ضد میکروبی باکتری‌های آبزی بر روی آن‌ها نیاز بود. این سویه‌های مرجع شامل *باسیلوس سوبتیلیس* (PTCC ۱۷۲۰ DSM۱۰)، *اشریشیاکلی* (PTCC۱۳۹۹ ATCC۲۵۹۲۲)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC۱۴۳۱ATCC ۲۵۹۲۳) و *سودوموناس ائروژینوزا* (PTCC۱۴۳۰ ۲۷۸۵۳ATCC) بودند که از بانک میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی کشور تهیه شدند.

سنجش فعالیت ضد میکروبی با دو روش مختلف

آنتاگونیسم میکروبی

در این روش باکتری‌های آبزی به‌صورت زنده جهت بررسی اثر ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفتند. در ابتدا پلیت به دونیمه مساوی تقسیم شد. در یک‌نیمه پلیت، باکتری آبزی موردنظر به‌صورت انبوه کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در داخل گرمخانه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شد تا به‌اندازه‌ی کافی رشد کند و انتشار ماده ضد میکروبی در ژل صورت پذیرد. سپس از هر یک از سویه‌های مرجع رقت ۰/۵ مک فارلند تهیه و به‌صورت عمود بر کشت قبلی از پایین به بالا به نیمه بالای پلیت که باکتری آبزی قبلاً در آن ناحیه به‌صورت انبوه کشت داده‌شده بود متصل گردید.

سپس پلیت های کشت داده شده (حاوی باکتری آبزی و سویه‌های مرجع متصل شده به آن) به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. محیط کشت مورد استفاده در این روش مولر هینتون آگار (مرک-آلمان) بود که با آب دریا ساخته شده بود (استفاده از آب دریا به دلیل وجود املاح لازم برای رشد باکتری‌های آبزی است). این روش به صورت ۳ بار تکرار انجام شد

بررسی هاله ممانعت از رشد با روش دیسک گذاری

در این روش سنجش فعالیت ماده ضد میکروبی بر اساس انتشار آن از دیسک صورت گرفت. در ابتدا از هر ۴ سویه مرجع رقت ۰/۵ مک فارلند تهیه گردید و بر روی سطح پلیت هایی که حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک-آلمان) بودند کشت سفره‌ای داده شدند. سپس عصاره خام ماده ضد میکروبی تهیه شده به مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در اتیل استات حل و مقدار ۲۰ میکرولیتر از آن به دیسک‌های بلانک استریل اضافه شد.

دیسک‌های آغشته شده به ماده ضد میکروبی بر روی سطح پلیت‌هایی که سویه مرجع بر روی آن کشت داده‌شده بود قرار داده شدند. پلیت های دیسک گذاری شده در ابتدا به مدت ۱۰ ساعت در دمای ۸ درجه سلسیوس قرار داده شدند که انتشار ماده ضد میکروبی در داخل ژل صورت بگیرد. پس از این مرحله پلیت های دیسک گذاری شده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. در انتها قطر هاله اطراف هر دیسک سنجیده شد (۲۱).(این روش به صورت ۲ بار تکرار انجام شد)

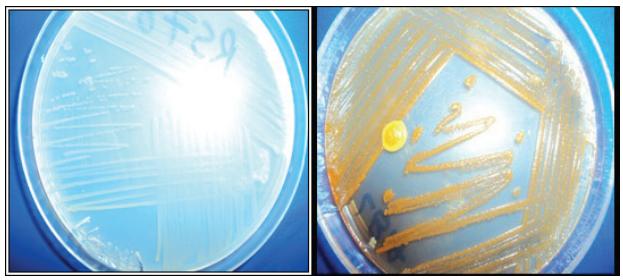
شناسایی سویه‌های باکتریایی دارای اثر ضد میکروبی

باکتری‌هایی که توانایی تولید ماده ضد میکروبی را داشتند به‌وسیله تکنیک مولکولی ۱۶srDNA PCR sequencing شناسایی شدند.

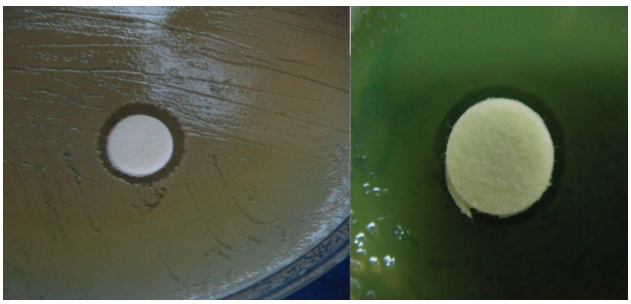
واکنش زنجیری پلیمراز

پس از استخراج DNA از باکتری‌ها به وسیله کیت استخراج DNA(شرکت سینا ژن)، با استفاده از پرایمرهای عمومی، ماده ژنتیکی ۱۶S rRNA با کمک تکنیک مولکولی واکنش زنجیری پلیمراز مورد تکثیر قرار گرفت. در این پژوهش از پرایمرهای Forward به توالی (۵'AACTGGAGGAAGGTGGGGAT۳') و پرایمرهای Reverse به توالی (۵'AGGAGGTGATCCAACCGCA۳') استفاده شد که قطعه‌ای به طول تقریبی ۳۷۰ bp را از ناحیه‌ای در داخل این ژن تکثیر می‌کند (۲۲). پس از انجام واکنش زنجیری پلیمراز مقدار ۵ میکرولیتر از محصول واکنش زنجیری پلیمراز بر روی ژل آگارز ۱ درصد به همراه اندازه نشانگر ۱۰۰۰-۱۰۰ الکتروفورز گردید و باندهای اختصاصی مشاهده شد. ۴۵ میکرولیتر از محصول نهایی واکنش زنجیری پلیمراز به همراه پرایمر فوروارد برای تعیین توالی و شناسایی مولکولی بر اساس ژن ۱۶sr RNA به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد.

توالی‌های ارسال شده از شرکت ماکروژن، توسط نرم‌افزار کروماس مشاهده و کیفیت تعیین توالی از روی پیک‌های ترسیمی بررسی شد. با استفاده از نرم‌افزار بلاست در پایگاه اینترنتی بانک اطلاعات ژنی توالی‌های همسان مشخص و درصد تشابه آن‌ها بررسی گردید.



شکل ۱ : پرگنه های مختلف باکتریایی جداشده از دریای خزر به رنگ‌های مختلف.



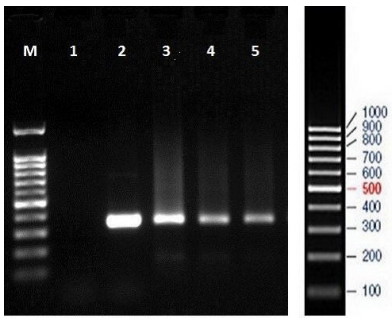
شکل ۳ : هاله ممانعت از رشد در روش دیسک گذاری

یافته‌ها

جداسازی سویه‌ها

۱۶۲ پرگنه مختلف باکتریایی جدا شد. اکثر سویه‌های جداشده

شکل ۲ : اثر ممانعت کنندگی در روش کشت متقاطع خطی



شکل ۳ : نتیجه حاصل از الکتروفورز با ژل ۱٪ محصول تکثیر با روش ۱۶SrDNA چاهک شماره ۱ کنترل منفی و چاهک‌های ۲ تا ۵ محصول نمونه‌های جداشده. M لدر (Fermenta, Lithuania)

دارای رنگ‌دانه بودند که به رنگ‌های مختلف قرمز، سبز، نارنجی و زرد مشاهده شدند (شکل شماره ۱).

جدول ۱ : نتایج بدست آمده در روش کشت متقاطع خطی (آنتاگونیسم میکروبی).

نام سویه	استافیلوکوکوس اورئوس	سودوموناس ائروژینوزا	باسیلوس سوبتیلیس	اشریشیاکلی
RS۲۸	+	–	+	–
RS۵۴	+	–	–	–
RS۵۶	+	–	+	–
RS۸۲	+	–	–	–
کنترل	+	–	+	–

جدول ۲ : نتایج بررسی فعالیت ضدمیکروبی از طریق دیسک گذاری و سنجش هاله ممانعت از رشد (بدون هاله ممانعت به صورت ()، هاله‌ی ممانعت بین ۳-۰ میلی‌متر به‌صورت (+)، هاله‌ی ممانعت بین ۵-۳ میلی‌متر به‌صورت (++) و هاله ممانعت بیشتر از ۵ میلی‌متر به‌صورت (+++) مشخص شد.)

نام سویه	استافیلوکوکوس اورئوس	سودوموناس ائروژینوزا	باسیلوس سوبتیلیس	اشریشیاکلی
RS۲۸	++	+	++	–
RS۵۴	+	–	–	–
RS۵۶	+++	–	+	–
RS۸۲	++	+	+	–
کنترل	–	–	–	–

نتایج به دست آمده در روش کشت متقاطع خطی (آنتاگونیسم میکروبی)

نتایج این روش نشان داد که گرم مثبت‌ها تقریباً در اکثر موارد مهار شدند، بطوریکه *استافیلوکوکوس اورئوس* در ۱۰۰٪ موارد و *باسیلوس سوبتیلیس* در ۵۰٪ موارد مهار شد (شکل شماره ۲). نتایج به دست آمده در رابطه با گرم منفی‌ها دقیقاً برعکس گرم مثبت‌ها بود، بطوریکه *سودوموناس ائروژینوزا* و *اشریشیاکلی* در هیچ‌یک از موارد مهار نشدند (جدول شماره ۱). *استرپتومایسس اریترئوس* به‌عنوان شاهد مثبت برای بررسی فعالیت ضد میکروبی استفاده شد. این باکتری دارای اثر ضد میکروبی وسیعی است. در این مطالعه اثر این باکتری بر سویه‌های مرجع بررسی و نتایج آن سنجیده شد.

نتایج برسی فعالیت ضد میکروبی از طریق دیسک گذاری و سنجش هاله ممانعت از رشد

نتایج به دست آمده در این روش نیز تا حد بسیار زیادی در راستای نتایج به دست آمده در روش قبلی بود. نتایج نشان داد که *استافیلوکوکوس اورئوس* در ۱۰۰٪ موارد و *باسیلوس سوبتیلیس* در ۷۵٪ موارد مهار شدند (شکل شماره ۳). در این روش نیز گرم منفی‌ها تقریباً مقاوم بودند، بطوریکه *اشریشیاکلی* به‌طور کامل مقاوم بود و *سودوموناس ائروژینوزا* نیز تنها در ۲ مورد رشد آن مهار شد (جدول شماره ۲). (دیسک حاوی اتیل استات به عنوان شاهد منفی استفاده شد).

سویه‌ها پس از استخراج DNA با تکنیک 16s rDNA PCR sequencing تکثیر و بر روی ژل آگارز نمایان شدند و درنهایت مشخص گردید که ۴ سویه جدید باکتریایی هستند (جدول شماره ۳).

بحث

در این تحقیق تعداد ۱۶۲ کلنی از منطقه رامسر در استان مازندران جمع‌آوری شد. فعالیت ضد میکروبی در بین ۱۶۲ کلنی مختلف باکتریایی با استفاده از ۲ روش مختلف سنجیده و ۴ سویه با اثر ضد میکروبی شناسایی گردید. در روش اول اثر ضد میکروبی باکتری‌های جداشده با روش آنتاگونیسم میکروبی مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که باکتری‌های جداشده با اثر ضد میکروبی در اکثر موارد علیه گرم مثبت‌ها مؤثر بودند، ولی اثر آن‌ها بر روی گرم منفی‌ها بسیار ضعیف بود، بطوریکه *اشریشیاکلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* در هیچ یک از موارد رشد آن‌ها مهار نشد. در روش بررسی از طریق دیسک نیز نتایج تا حد بسیار زیادی مشابه روش اول بود، بطوریکه گرم مثبت‌ها تقریباً در همه موارد مهار شدند، اما گرم منفی‌ها بسیار مقاوم بودند و ممانعت از رشد تنها در ۲ مورد از *سودوموناس ائروژینوزا* مشاهده شد و *اشریشیاکلی* بسیار مقاوم بود. در مورد نتایج این دو روش می‌توان گفت: در این دو روش اثر مهاری بر روی گرم مثبت‌ها بوده است و گرم منفی‌ها به مقدار بسیار کمی مهار شده اند. در تحقیقات گوناگون در نقاط مختلف نیز نتایج تحقیق حاضر به شکل چشمگیری تایید و نتایج بدست آمده تا حد زیادی با نتایج حاصل در تحقیق در انطباق می‌باشد. در تحقیقی که در سال ۲۰۰۹ انجام شد طیف ضد میکروبی سویه *باسیلوس* در برابر ارگانیسم‌های متنوعی مورد سنجش قرارگرفت و مشخص شد که بهترین فعالیت در برابر گرم مثبت‌هایی همچون *استافیلوکوکوس اورئوس* و *میکروکوکوس لوتئوس* بود، در این تحقیق فعالیتی علیه *سودوموناس ائروژینوزا* مشاهده نشد (۱۹). در سال ۲۰۰۹ تحقیقی در رابطه با غربالگری گونه‌های *باسیلوس* با پتانسیل تولید آنتی‌بیوتیک صورت گرفت، در این مطالعه مشخص شد تمام ۱۲ گونه *باسیلوس* جداشده اثر ممانعت کنندگی بسیار ناچیزی در برابر *سودوموناس ائروژینوزا* و *اشریشیاکلی* داشتند (۱۲). در تحقیقی در سال ۲۰۰۵ در میان ۴۲ سویه با فعالیت ضد میکروبی اثرات بسیار متفاوت بود، بطوریکه ۶۹٪ از سویه‌ها (۲۹ سویه) اثر ممانعت کنندگی بر روی *باسیلوس سوبتیلیس* داشتند، ۲۲ سویه (۵۲٪) اثر مهاری بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* داشتند و تنها ۴ سویه (۹٪) اثر ممانعت کنندگی بر *اشریشیاکلی* داشت. نکته جالب در این تحقیق این بود که تنها ۴ سویه اثر ممانعت کنندگی بر روی *اشریشیاکلی* داشت (۲۱). در تحقیقی که انجام شد و دیگر مطالعات ذکر شده این امر به وضوح دیده شد که بیشترین اثر ممانعت کنندگی بر روی گرم مثبت‌ها صورت گرفته و اثر بر روی گرم منفی‌ها در بسیاری از موارد ناچیز بوده است، این امر می‌تواند ناشی از تفاوت ساختاری بین گرم منفی‌ها و گرم مثبت‌ها باشد. باکتری‌های گرم منفی دارای غشای خارجی پلی ساکاریدی می‌باشند که دارای ترکیب ساختاری لیپو پلی ساکاریدی می‌باشد. حساسیت بیشتر در گرم مثبت‌ها مربوط به این حقیقت است که گرم مثبت‌ها تنها دارای یک لایه خارجی پپتیدوگلیکان می‌باشند که این لایه نمی‌تواند سد مؤثری در برابر نفوذ باشد (۲۳).

جهت استخراج ماده ضد میکروبی در روش انتشار از دیسک از اتیل استات استفاده شد. استفاده از این حلال در تحقیقاتی دیگر برای استخراج ماده ضد میکروبی دیده شد. در تحقیقی در سال ۲۰۰۸ جهت استخراج ماده ضد میکروبی از اتیل استات استفاده شد، در این تحقیق مشاهده شد که استخراج ماده ضد میکروبی با استفاده از اتیل استات در مقایسه با متانول، الکل و کلروفرم بسیار مؤثرتر بوده و بیشترین هاله ممانعت از رشد در زمان استفاده از اتیل استات جهت استخراج ماده ضد میکروبی حاصل شده است (۲۴). در تحقیق انجام شده شرایط دمایی بهینه جهت تولید ماده ضد میکروبی و نیز pH مناسب جهت تولید ماده ضد میکروبی رعایت شد. نقش این دو فاکتور در تحقیقات

مختلف به وضوح دیده شد. در رابطه با این موضوع، در تحقیقی که در سال ۱۹۹۷ انجام شد مشخص گردید تغییر در فاکتور خارجی نظیر pH بسیاری از فرآیندهای سلولی از قبیل سنتز متابولیت های ثانویه را تحت تأثیر قرار می‌دهد، اثر pH در این تحقیق از طریق تنظیم اولیه آن بین مقادیر ۳ ، ۵ ، ۷ و ۹ بررسی شد.

در این تحقیق بیشترین هاله ممانعت از رشد در۷= pH سنجیده شد که با pH تنظیم و تعیین شده در مطالعه حاضر یکسان است (۲۵). سنتز ترکیبات میکروبی به شدت تحت تأثیر دمای انکوباسیون قرار می‌گیرد. در تحقیقی که در سال ۱۹۷۴ انجام شد ماکزیمم مقدار ماده ضد میکروبی باسیتراسین در دمای ۳۷ درجه سلسیوس تولید شد، این شرایط دمایی در مطالعه حاضر نیز کاملاً رعایت شد (۲۶). در راستای این امر در تحقیقی در سال ۲۰۰۷ گزارش شد، بیشترین ممانعت *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس پومیلوس* در برابر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *میکروکوکوس لوتئوس* در دمای ۳۰ درجه سلسیوس حاصل می‌شود، این شرایط بهینه دمایی در روش آنتاگونیسم میکروبی کاملاً رعایت شد (۲۷).

با توجه به نتایج حاصل می‌توان گفت، با ظهور و پیدایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در میان باکتری‌ها نیاز در جهت کشف و شناسایی داروهای ضد میکروبی جدید با قابلیت بالا جهت نابودی پاتوژن‌های بیماری‌زا لازم و ضروری می‌باشد. در مطالعه حاضر قدرت و توانایی باکتری‌های آبزی جهت مقابله با تعدادی از این پاتوژن‌ها بررسی شد. نتایج حاصل نوید راهبردی جدید و مؤثر در زمینه مقابله با عوامل خطرناک میکروبی را با استفاده از میکروارگانیسم‌های موجود در محیط‌های طبیعی را می‌دهد.

تقدیر و تشکر

در انتها لازم می‌دانیم از زحمات سرکار خانم مهندس بزرگ نیا جهت پیشبرد بهینه این مطالعه تقدیر و تشکر نماییم.

تعارض منافع

بین نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

Reference

1. Prieto ML, Sullivan LO, Tan SP, McLoughlin P, Hughes H, Connor PMO, et al. Assessment of the bacteriocinogenic potential of marine bacteria reveals Lichenicidin production by seaweed-derived Bacillus spp. Mar Drugs. 2012;10:2280-2299.

2. Das S, Mukherjee I, Sudarshan M, Sinha TP, Thakur AR, Chaudhuri SR. Bacterial isolates of marine coast as commercial producer of protease. OJBS. 2012;12 (3):96-107.

3. Uzair B, Ahmed N, Mohammad FV, Ahmad VU, Edwards D. Screening of marine bacteria of Pakistan coast for drug discovery potential. Proc Pakistan Acad Sci. 2009;46(3):137-144.

4. Zhang W, Li Z, Miao X, Zhang F. The screening of antimicrobial bacteria with diverse novel nonribosomal peptide synthetase (NRPS) genes from South China Sea sponges. Mar biotechnol. 2009;11: 346-355.

5. Orsod M, Joseph M, Huyop F. Characterization of Exopolysaccharides produced by Bacillus cereus and Brachybacterium sp. Isolated from Asian Sea Bass (Lates calcarifer). Mal J Microbiol. 2012; 8(3):170-174.

6. Perez C, Suarez C, Castro GR. Antimicrobial activity determined in strains of Bacillus circulans cluster. Folia Microbiol. 1993;38 (1):25-28.

7. Xie J, Zhang R, Shang C, Guo Y. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by an isolated Bacillus subtilis LFB112 that exhibits antimicrobial activity against domestic animal pathogens. Afr J Biotechnol. 2009;8(20):5611-5619.

8. Nastro RA, Costanzo A D, Gesuele R, Trifuoggi M, Inglese M, Guida M. Influence of temperature on the production of antibiotic molecules in Bacillus amyloliquefaciens strain HNA3. AMéndez-Vilas (Ed). 2011;1307-1310.

9. Brammavidhya S, Usharani G. Isolation and purification of low molecular weight peptide from marine B.cereus and its antimicrobial activity. IJRMS. 2013; 2(1):1-5.

10. George M, Cyriac N, Nair A, Hatha AAM, Diversity of Bacillus and Actinomycetes in the water and sediment samples from Kumarakom region of Vembanadu lake. IJMS. 2011;40(3):430-437

11. Baruzzi F, Quintieri L, Morea M, Caputo L. Antimicrobial compounds produced by Bacillus spp. and applications in food. AMéndez-Vilas (Ed). 2011;1102-1111.

12. Kuta FA, Nimzing L, Orka PY. Screening of Bacillus species with potentials of antibiotics production. AMI. 2009;24(1-2):42-46.

13. Ghanbari M, Rezaei M, Soltani M, Shah-Hosseini GH. Production of bacteriocin by a novel Bacillus sp. Strain RF 140, an intestinal bacterium of Caspian Frisian Roach (Rutilus frisii kutum). IJVR. 2009;10(3):267-272.

14. Schallmey M, Singh A, Ward OP. Developments in the use of Bacillus species for industrial production. Can. J. Microbiol. 2004;50:1–17.

15. Rajesh D, Karthikeyan S, Jayaraman G. Isolation and partial characterization of a new bacteriocin from Bacillus pumilus DR2 isolated from sea water. CJM. 2012;1(2-3):33-41.

16. Hosny AEDMS, Sheir DH, Eldewany AI. Production of antimicrobial agent from marine bacteria Isolated from Mediterranean. Aust J Basic & Appl Sci. 2011;5(5):121-128.

17. Awais M, Pervez A, Qayyum S, Saleem M. Effects of glucose, incubation period and pH on the production of peptide antibiotics by Bacillus pumilus. Afr J Microbiol Res. 2008;2: 114-119.

18. Awais M, Pervez A, Yaqub A, Shah MM. Production of antimicrobial metabolites by Bacillus subtilis immobilized in polyacrylamide gel. Pakistan J Zool. 2010; 42(3):267-275.

19. Muhammad SA, Ahmad S, Hameed A. Antibiotic production by Thermophilic Bacillus specie SAT4. Pak J Pharm. Sci. 2009;22(3):339-345.

20. Sadfi N, Cherif M, Hajlaoui MR, Boudabbous A, Belanger R. Isolation and partial purification of antifungal metabolites produced by Bacillus cereus. Ann Microbiol. 2002;52: 323-337.

21. Zheng L, Han X, Chen H, Lein W, Yan X. Marine bacteria associated with marine microorganisms: the potential antimicrobial resources. Ann micro. 2005; 55(2):119-124.

22. Teng LJ, Hsueh PR, Huang YH, Tsai JC. Identification of Bacteroides thetaiotaomicron on the Basis of an unexpected specific amplicon of universal 16S Ribosomal DNA PCR. JCM. 2004;42(4):1727-1730.

23. Pandey B, Ghimire P, Agrawal VP. Studies on the antibacterial activity of the Actinomycetes isolated from the Khumbu Region of Nepal. Aehms. 2013;1-4.

24. Remya M, Vijayakumar R. Isolation and characterization of marine antagonistic Actinomycetes from west coast of India. facta.junis.ni.ac.rs. 2008;15(1):13 – 19.

25. Solé M, A. Francia N, Rius L, and Lorén JG. The role of pH in the “glucose effect” on prodigiosin production by non-proliferating cells of Serratia marcescens. Lett. Appl. Microbiol.1997;25:81-84.

26. Berdy J. Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. Adv Appl Microbiol. 1974;18:309-406.

27. Awais M, Shah AA, Hameed A, Hasan F. Isolation, identification and optimization of bacitracin produced by Bacillus sp. Pak J Bot. 2007;39(4):1303-1312.