جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
تابستان 1391، دوره چهارم، شماره سیزدهم، صفحه 52-45

بررسی فعالیت ضدمیکروبی ایزوله و سویه‌ی استاندارد *باسیلوس پومیلوس* علیه دو فیتوپاتوژن و سه پاتوژن انسانی و بهینه‌سازی شرایط تولید مواد ضدمیکروبی

المیرا پورباقی[1]، خسرو عیسی زاده[2]، معصومه انوری[3]، لیلا مدیری[4]

1- کارشناس ارشد، عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران
2- استادیار، مدیر گروه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران
3- استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، رشت، ایران
4- استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، لاهیجان، ایران

نویسنده مسؤول: المیرا پورباقی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران.
Elmira.pourbaghi@yahoo.com

دریافت: 91/4/8 پذیرش: 91/6/13

چکیده

زمینه و هدف: با توجّه به فعالیت آنتاگونیستی گونه‌ی *باسیلوس پومیلوس* علیه تعدادی از پاتوژن‌های گیاهی و فعالیت ضدمیکروبی این گونه علیه باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا، این تحقیق با هدف بررسی فعالیت ضدمیکروبی ایزوله و سویه ی استاندارد *باسیلوس پومیلوس* علیه دو فیتوپاتوژن *پکتوباکتریوم کاروتووروم* و *گزانتوموناس کامپستریس* و سه پاتوژن انسانی *کاندیدا آلبیکنز*، *باسیلوس سرئوس* و *سودوموناس آیروژنوزا* و بهینه‌سازی شرایط تولید ماده‌ی ضدمیکروبی انجام گرفت.

روش بررسی: برای جداسازی گونه‌ی *باسیلوس پومیلوس* از روش تهیه رقت در آگار، آزمایش‌های بیوشیمیایی و آزمایش حساسیت به آنتی‌بیوتیک استفاده شد. جهت بررسی اولیه‌ی فعالیت آنتاگونیستی، از روش انتشار در آگار از طریق دیسک و محیط تریپتیکیز سوی براث و جهت تولید ماده‌ی ضدمیکروبی از محیط ساختگی و روش انتشار در آگار از طریق چاهک استفاده شد. در ادامه، بهینه‌سازی شرایط تولید ماده‌ی ضدمیکروبی با تغییر فاکتورهایی مانند pH (6-9)، غلظت گلوکز (5-1%) و زمان انکوباسیون (0-72 ساعت) مورد سنجش قرار گرفت. داده‌ها با نرم افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: ایزوله و سویه‌ی استاندارد مورد بررسی فعالیت ضدمیکروبی بهتری علیه باکتری گرم مثبت پاتوژن انسانی در مقایسه با سایر میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش نشان دادند. بیشترین میزان تولید ترکیبات ضدمیکروبی در pH 7، 3% گلوکز و بعد از 48 ساعت انکوباسیون در $37^{\circ}C$ علیه میکروارگانیسم‌های هدف بدست آمد. همچنین بین تغییر pH و غلظت گلوکز محیط کشت تولیدی و زمان انکوباسیون در تولید بیشتر مواد ضدمیکروبی رابطه‌ی معنی‌دار مشاهده شد ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که نوع و ترکیبات محیط کشت مورد استفاده و تغییر فاکتورهای خارجی مانند pH و زمان انکوباسیون در تولید بیشتر ماده ی ضدمیکروبی باسیلوس پومیلوس مؤثرند.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی، باسیلوس پومیلوس، غربال‌گری

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

متابولیت‌های ثانویه‌ی ضدمیکروبی، ریزمولکول‌های تولید شده توسط ارگانیسم‌ها می‌باشند که اغلب در رشد و زنده ماندن ارگانیسم ضروری نیستند و برخلاف اکثر ماکرومولکول‌های متداول مثل پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و پلی‌ساکاریدهایی که پایه و اساس پروسه‌های اولیه‌ی ارگانیسم زنده‌اند، فقط در برخی از فعالیت‌های ثانویه ارگانیسم دخالت دارند. به‌طور کلی متابولیت‌های ثانویه ی در نتیجه‌ی شرایط خاص مانند محدودیت منابع غذایی، طی دوره‌ی ایدیوفاز زندگی ارگانیسم، به‌عنوان ساز و کار دفاعی، مولکول‌های تنظیمی، عوامل آنتی‌بیوتیکی و نظیر این‌ها تولید می‌شوند (1-3). متابولیت‌های ثانویه با اهداف گوناگونی جداسازی می‌شوند، که از آن جمله می‌توان به شناسایی یک ترکیب ناشناخته با فعالیت زیستی خاص و همچنین استفاده از این ترکیبات در زمینه‌های مختلف و تلاش برای سنتز مصنوعی این ترکیبات اشاره کرد (4و5).

پیدایش رو به رشد باکتری‌ها و قارچ‌های پاتوژن مقاوم به دارو یک مشکل جدی در سراسر جهان به حساب می‌آید. از این‌رو امروزه تحقیق و کشف عوامل ضدباکتریایی و ضدقارچی جدید و مؤثر مورد توجّه زیادی قرار گرفته است (6). فرآیند تولید مواد ضدمیکروبی معمولاً شامل غربال‌گری و جداسازی تعداد وسیعی از میکروارگانیسم‌ها، آزمایشات و تغییر و بهینه‌سازی شرایط تولید می‌باشد (7). میکروارگانیسم‌های جدا شده از خاک و سایر مکان‌های طبیعی، به‌عنوان منبع مفیدی از ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی به حساب می‌آیند (7و8).

باسیلوس پومیلوس باکتری هوازی، گرم مثبت یا گرم متغیر، متحرک و میله‌ای کوچک می‌باشد که به‌صورت منفرد و جفت دیده می‌شود. مورفولوژی کلنی این گونه متغیر بوده، فاقد پیگمان‌اند و اغلب صاف و مات دیده می‌شوند. مطالعات متعددی در زمینه‌ی فعالیت ضدمیکروبی گونه‌ی *باسیلوس پومیلوس* توسط محققین انجام گرفته است که از آن جمله می‌توان به تولید *باکتریوسین پومیلیسین* 4 با فعالیت ضدباکتریایی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین و *انتروکوکوس فاکالیس* مقاوم به وانکومایسین (6و9) و همچنین فعالیت ضدقارچی این گونه علیه آفلاتوکسین اشاره نمود (10).

با توجّه به فعالیت آنتاگونیستی گونه‌ی *باسیلوس پومیلوس* علیه تعدادی از پاتوژن‌های گیاهی و فعالیت ضدمیکروبی این گونه علیه باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زای انسانی (11)، این تحقیق با هدف بررسی فعالیت ضدمیکروبی ایزوله و سویه‌ی استاندارد *باسیلوس پومیلوس* علیه دو فیتوپاتوژن *پکتوباکتریوم کاروتووروم* PTCC: 1657 و *گزانتوموناس کامپستریس* PTCC: 1473 و سه پاتوژن انسانی *کاندیدا آلبیکنز* PTCC: 5027، *باسیلوس سرئوس* PTCC: 1565 و *سودوموناس آئروژنوزا* PTCC: 1558و بهینه‌سازی شرایط تولید ماده ی ضدمیکروبی انجام گرفت.

روش بررسی

جهت جداسازی گونه‌ی *باسیلوس پومیلوس* نمونه‌های خاک از مناطق مختلف زراعی و جنگلی شهرستان لاهیجان در شرایط استریل از عمق 5 الی 10 سانتی‌متری جمع‌آوری گردید و به آزمایشگاه جهت جداسازی و شناسایی گونه‌ی مورد نظر انتقال داده شد. نمونه‌های خاک با الک‌هایی با قطر منافذ 2 میلی‌متر الک شدند و یک گرم از هر نمونه خاک در 99 میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل گردید تا به‌صورت سوسپانسیون درآید (رقت 10^{-2}). به منظور از بین رفتن قارچ‌ها و باقی ماندن باسیل‌های اسپوردار، ارلن مایر حاوی رقت 10^{-2} به مدت20 دقیقه در دمای $80^{\circ}C$ در بن ماری گذاشته شد. سپس با استفاده از روش تهیه رقت در آگار از نمونه‌های بن ماری شده تا 10^{-7} رقت تهیه شد و در روی محیط مغذی نوترینت آگار حاوی 7% NaCl در $30^{\circ}C$ به مدت 48 ساعت در گرمخانه قرار داده شد. بعد از اتمام دوره‌ی انکوباسیون، از پلیت‌های مشکوک به کلنی‌های باسیل لام تهیه شد و توسط رنگ‌آمیزی گرم و مالاشیت گرین، باسیل های گرم مثبت اسپوردار شناسایی شدند. در ادامه جهت خالص سازی گونه‌ی مورد نظر، کلنی باسیلوس‌های گرم مثبت اسپوردار روی محیط کشت تریپتیکیز سوی آگار کشت داده شدند. جهت تشخیص قطعی گونه‌ی مورد نظر، از آزمایش‌های بیوشیمیایی افتراقی شامل هیدرولیز نشاسته و وگس پروسکوئر و آزمایش‌های بیوشیمیایی تأییدی مانند تخمیر قند، احیای نیترات، اوره‌آز، مصرف سیترات، اکسیداسیون فرمانتاسیون، تحمل نمک و آزمایش حساسیت به آنتی‌بیوتیک استفاده شد (12). در این تحقیق تمام مواد شیمیایی و محیط کشت های مورد استفاده، از شرکت مرک آلمان و میکروارگانیسم‌های استاندارد مورد آزمایش از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شدند: *باسیلوس پومیلوس* PTCC: 1319، *سودوموناس آئروژنوزا* PTCC:1558، *باسیلوس سرئوس*

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

PTCC: 1565، *کاندیدا آلبیکنز* PTCC: 5027، *گزانتوموناس کامپستریس* PTCC:1473، پکتوباکتریوم *کاروتووروم* زیر گونه کاروتووروم PTCC:1657 . این تحقیق در طی بهار و تابستان 1390 انجام گرفته است.

بررسی اولیه‌ی فعالیت آنتاگونیستی ایزوله و سویه‌ی استاندارد باسیلوس پومیلوس علیه پاتوژن‌ها: جهت بررسی اولیه‌ی فعالیت ضدمیکروبی ایزوله و سویه‌ی استاندارد *باسیلوس پومیلوس* علیه دو فیتوپاتوژن و پاتوژن‌های انسانی مورد بررسی از محیط کشت تریپتیکیز سوی براث و روش انتشار در آگار از طریق دیسک استفاده گردید. به این منظور، از میکروارگانیسم های استاندارد و ایزوله‌ی خالص *باسیلوس پومیلوس* سوسپانسیون با کدورت معادل لوله نیم مک فارلند تهیه شد و با سوآب استریل از میکروارگانیسم‌های پاتوژن استاندارد، کشت سفره ای روی محیط تریپتیکیز سوی آگار انجام گرفت. در ادامه، دیسک های بلانک به میزان 80 میکرولیتر با سوسپانسیون نیم مک فارلند ایزوله و سویه ی استاندارد گونه‌ی مورد بررسی تلقیح شدند و پلیت ها به مدت 48 ساعت در دمای 37°C در گرمخانه قرار داده شدند و فعالیت آنتاگونیستی ایزوله و سویه ی استاندارد *باسیلوس پومیلوس* بر اساس وجود یا عدم وجود هاله‌ی عدم رشد علیه میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. هر آزمایش سه بار تکرار شد و میانگین قطر هاله‌ی مهاری (با احتساب قطر دیسک) محاسبه گردید.

استفاده از محیط ساختگی جهت تولید ترکیبات ضدمیکروبی: پس از بررسی اولیه‌ی فعالیت آنتاگونیستی، بررسی بیشتر جهت تولید ترکیبات ضدمیکروبی توسط ایزوله و سویه‌ی استاندارد باسیلوس پومیلوس توسط روش انتشار در آگار از طریق چاهک و با استفاده از محیط ساختگی صورت گرفت. بدین منظور ابتداء ایزوله و سویه‌ی استاندارد *باسیلوس پومیلوس* به‌طور جداگانه در محیط کشت تریپتیکیز سوی براث (به‌عنوان محیط پیش‌کشت) در 30°C در انکوباتور شیکردار با دور 120 rpm به مدت 48 ساعت در گرمخانه قرار داده شد. در ادامه، حدود 100 میلی‌لیتر از محیط کشت ساختگی درون ارلن مایر 250 میلی‌لیتری استریل شد و 10% از محیط پیش کشت به ارلن مایر اضافه گردید و در 30°C توسط شیکر با دور 120 rpm به مدت 24 ساعت در گرمخانه قرار داده شد. سپس جهت بدست آوردن سوپرناتانت فاقد سلولی سانتریفوژ شد و توسط فیلترهای 0/2 میکرومتری استریل گردید. در ادامه از کشت‌های 24 ساعته میکروارگانیسم‌های استاندارد مورد آزمایش، سوسپانسیون نیم مک فارلند تهیه شد و با استفاده از سوآب استریل در سطح محیط کشت تریپتیکیز سوی آگار کشت داده شد. سپس چاهک‌هایی با قطر 4×6 میلی‌متر در محیط کشت ایجاد شد و حدود 80 میکرولیتر از سوپرناتانت تهیه شده، به‌داخل چاهک‌ها اضافه گردید. سپس پلیت‌ها به مدت 24 ساعت در 37 °C در گرمخانه قرار داده شدند و خواص ضدمیکروبی با اندازه‌گیری قطر هاله‌ی مهاری بر حسب میلی متر تعیین شد. هر آزمایش سه بار تکرار شد و میانگین قطر هاله‌ی مهاری (با احتساب قطر چاهک) محاسبه گردید.

بهینه‌سازی شرایط تولید ترکیبات ضدمیکروبی: پارامترهایی مانند pH اولیه (6-9) و غلظت گلوکز محیط کشت تولیدی (1-5%) و دوره‌ی انکوباسیون (72 -0 ساعت) جهت تولید حداکثر مواد ضدمیکروبی توسط سویه‌ی استاندارد و ایزوله‌ی باسیلوس پومیلوس مورد سنجش قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS و جدول آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده شد. سطح معنی‌داری آزمون 0/05 در نظر گرفته شد.

جدول1. مقادیر و مواد تشکیل دهنده محیط کشت ساختگی (بر حسب گرم در لیتر)

مواد تشکیل دهنده	مقادیر (g/L)	مواد تشکیل دهنده	مقادیر (g/L)
L-glutamic acid	5	$CaCl.2H_2O$	0/015
NaCl	0/01	$MgSO_4.7H_2O$	0/2
$FeSO_4.7H_2O$	0/01	$MnSO_4.H_2O$	0/01
$FeSO_4.7H_2O$	0/5	Glucose	10
KH_2PO_4	0/01	pH	۷

یافته ها

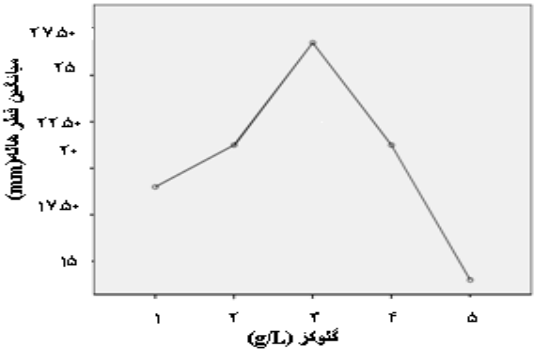
از بین 16 مکان مختلف نمونه‌برداری از خاک‌های زراعی و جنگلی شهرستان لاهیجان و 40 نمونه باسیل گرم مثبت اسپوردار جدا شده از این مناطق، یک ایزوله از گونه‌ی *باسیلوس پومیلوس* بر اساس آزمایش‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و آزمایش حساسیت به آنتی‌بیوتیک از خاک جنگلی شیطان کوه

شناسایی شد. نتایج حاصل از بررسی اولیه‌ی فعالیت آنتاگونیستی با روش انتشار در آگار از طریق دیسک و محیط تریپتیکیز سوی براث نشان داد که سویه‌ی استاندارد و ایزوله‌ی *باسیلوس پومیلوس* دارای فعالیت ضدمیکروبی بهتری به‌ترتیب علیه باکتری پاتوژن انسانی *باسیلوس سرئوس* PTCC:1565 (15 و 17 میلی‌متر) نسبت به *سودوموناس آئروژنوزا* PTCC:1558 (10 و 12 میلی‌متر)، *کاندیدا آلبیکنز* PTCC: 5027 (10 و 12 میلی‌متر) و دو فیتوپاتوژن *گزانتوموناس کامپستریس* PTCC:1473 (8 و 10 میلی‌متر) و *پکتوباکتریوم کاروتووروم* PTCC:1657 (10و 10 میلی‌متر) می‌باشد. همچنین نتایج نشان داد که ایزوله و سویه‌ی استاندارد *باسیلوس پومیلوس* فعالیت آنتاگونیستی بهتری نسبت به باکتری گرم مثبت *باسیلوس سرئوس* در مقایسه با باکتری گرم منفی *سودوموناس آئروژنوزا* دارد. همچنین استفاده از محیط ساختگی جهت تولید ترکیبات ضدمیکروبی منجر به افزایش قطر هاله‌ی عدم رشد ایجاد شده توسط ایزوله و سویه‌ی استاندارد *باسیلوس پومیلوس* علیه هر پنج میکروارگانیسم استاندارد پاتوژن مورد بررسی شد. از سوی دیگر، تغییر پارامترهایی مانند pH و غلظت گلوکز محیط کشت تولیدی و زمان انکوباسیون در میزان تولید ماده‌ی ضدمیکروبی مؤثر بود، به‌طوری که حداکثر ترکیبات ضدمیکروبی تولید شده توسط ایزوله و سویه‌ی استاندارد *باسیلوس پومیلوس* در pH 7، 3% گلوکز و بعد از 48 ساعت انکوباسیون در $37\ ^{\circ}C$ علیه هر 5 سویه‌ی میکروبی مورد آزمایش مشاهده شد. نتایج تغییر pH محیط ساختگی نشان داد که افزایش pH محیط کشت در محدوده‌ی قلیایی باعث کاهش تولید ماده‌ی ضدمیکروبی و به عبارتی باعث کاهش اندازه‌ی قطر هاله‌ی عدم رشد می‌شود. از سوی دیگر، گلوکز به عنوان منبع کربن در افزایش تولید ماده‌ی ضدمیکروبی نقش داشت. امّا افزایش غلظت گلوکز تا حد 5% اثر منفی در میزان تولید ماده‌ی ضدمیکروبی ایزوله و سویه ی استاندارد *باسیلوس پومیلوس* داشت و منجر به کاهش اندازه‌ی قطر هاله‌ی عدم رشد آنها علیه هر 5 سویه‌ی میکروبی شد. همچنین نتایج نشان داد که افزایش دوره‌ی انکوباسیون بعد از 48 ساعت باعث کاهش قطر هاله‌ی عدم رشد ایزوله و سویه‌ی استاندارد می‌شود. از سوی دیگر، تأثیر غلظت گلوکز در میزان تولید ماده‌ی ضدمیکروبی توسط ایزوله و سویه‌ی استاندارد *باسیلوس پومیلوس* بیشتر از دو فاکتور دیگر یعنی pH و زمان انکوباسیون بود.

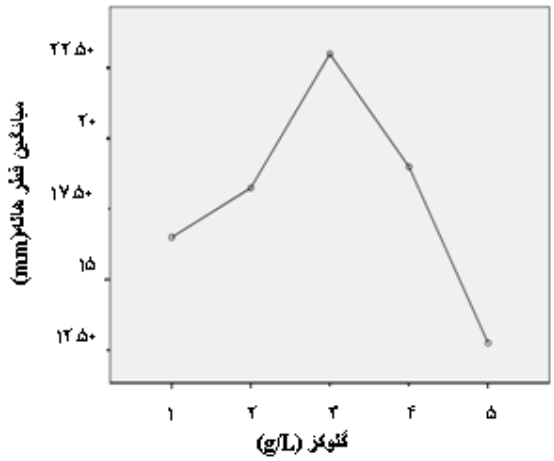
نتایج آماری تاثیر غلظت گلوکز محیط کشت ساختگی بر میزان تولید مواد ضدمیکروبی: نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که تغییر فاکتورهای خارجی مورد بررسی، در میزان تولید ماده‌ی ضدمیکروبی ایزوله و سویه‌ی استاندارد *باسیلوس پومیلوس* تأثیرگذار است. بر اساس آزمون آماری دانت، بین غلظت 3% و 5% و همچنین بین غلظت 4% و 5% گلوکز محیط کشت ساختگی در میزان تولید ماده‌ی ضدمیکروبی ایزوله‌ی بومی *باسیلوس پومیلوس* اختلاف معنی‌دار مشاهده شد.

همچنین نتایج نشان داد که میزان تولید ماده‌ی ضدمیکروبی در غلظت 3% گلوکز بیشتر از سایر غلظت‌ها بود (نمودار1). در میزان تولید ماده‌ی ضدمیکروبی سویه‌ی استاندارد *باسیلوس پومیلوس* آزمون آماری توکی نشان داد که بین غلظت 1% و 2% گلوکز تفاوت معنی‌دار وجود نداشت اما بین غلظت 1% و 3% گلوکز تفاوت معنی‌دار دیده شد. همچنین با توجّه به نمودار شماره 2، تولید ماده‌ی ضدمیکروبی در غلظت 3% گلوکز بیشتر از سایر غلظت‌ها بود.

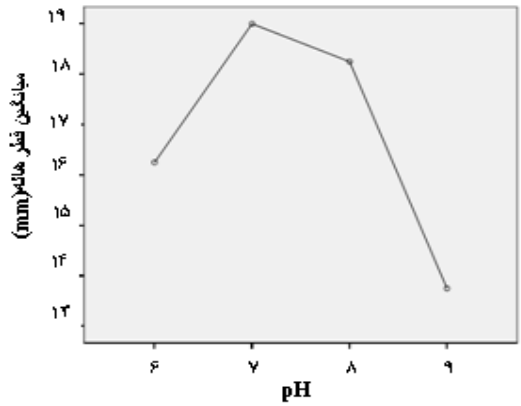
نتایج آماری تأثیر pH محیط کشت ساختگی بر میزان تولید مواد ضدمیکروبی: نتایج آزمون توکی در مورد تأثیر pH در میزان تولید ماده‌ی ضدمیکروبی ایزوله‌ی *باسیلوس پومیلوس* نشان داد که بین pH 7 و 9 و pH 8 و 9 اختلاف معنی‌دار مشاهده شد اما بین pH 6 و 7 و pH 6 و 8 اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ($P > 0/05$). نتایج آزمون دانت در مورد تأثیر pH در میزان تولید ماده‌ی ضدمیکروبی سویه‌ی استاندارد *باسیلوس پومیلوس* نشان داد که فقط بین pH 6 و 7 اختلاف معنی‌دار وجود دارد. همچنین نتایج نشان داد که به ترتیب در pH 6 و 9 کمترین تولید و در pH 7 و 8 بیشترین تولید ماده‌ی ضدمیکروبی مشاهده شد (نمودار 3و 4).



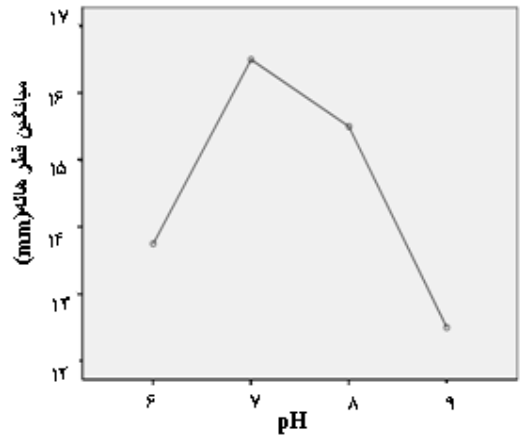
نمودار1. حداکثر تولید ترکیبات ضدمیکروبی توسط ایزوله‌ی باسیلوس پومیلوس در غلظت‌های مختلف گلوکز



نمودار2. حداکثر تولید ترکیبات ضدمیکروبی توسط سویه‌ی استاندارد *باسیلوس پومیلوس* در غلظت‌های مختلف گلوکز

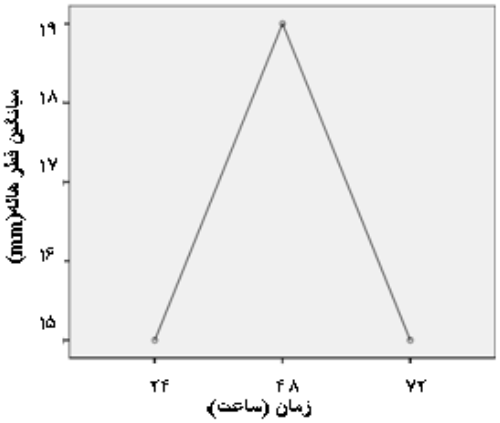


نمودار3. حداکثر تولید ترکیبات ضدمیکروبی توسط ایزوله‌ی *باسیلوس پومیلوس* در pHهای مختلف



نمودار4. حداکثر تولید ترکیبات ضد میکروبی توسط سویه‌ی استاندارد *باسیلوس پومیلوس* در pHهای مختلف

نتایج آماری تأثیر دوره‌ی انکوباسیون بر میزان تولید مواد ضدمیکروبی: بر اساس آزمون توکی بین زمان‌های 24 و 48 ساعت و 48 و 72 ساعت تفاوت معنی‌دار در میزان تولید ماده‌ی ضدمیکروبی ایزوله و سویه‌ی استاندارد *باسیلوس پومیلوس* مشاهده گشت امّا بین زمان‌های 24 و 72 ساعت تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین نمودار 5 نشان داد که بیشترین میزان تولید ماده‌ی ضدمیکروبی بعد از 48 ساعت انکوباسیون بدست آمد.



نمودار5. حداکثر تولید ترکیبات ضدمیکروبی توسط ایزوله و سویه‌ی استاندارد *باسیلوس پومیلوس* در زمان‌های مختلف انکوباسیون

بحث

با توجّه به اهمیت و نقش باکتری‌های جنس باسیلوس در تولید متابولیت‌های طبیعی دارای فعالیت آنتاگونیستی، علیه بسیاری از باکتری‌ها و قارچ‌های پاتوژن، دانشمندان به برنامه‌های غربال‌گری این میکروارگانیسم‌ها به عنوان عوامل بیولوژیک تولید کننده‌ی ترکیبات آنتی‌بیوتیکی در درمان یا پیشگیری از عفونت‌های گیاهی و انسانی توجّه زیادی کرده‌اند (8).

در این مطالعه از محیط تریپتیکیز سوی براث و ساختگی جهت بررسی فعالیت آنتاگونیستی و تولید ترکیبات ضدمیکروبی استفاده شد که ایزوله و سویه‌ی استاندارد باسیلوس پومیلوس با استفاده از محیط ساختگی و روش انتشار در آگار از طریق چاهک، فعالیت ضدمیکروبی بهتری علیه سویه‌های میکروبی مورد آزمایش از خود نشان دادند. از آنجا که تفاوت این دو محیط در ترکیبات و عناصر موجود در آنها می‌باشد. بنابراین، این عوامل می‌توانند در میزان تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی ایزوله و سویه‌ی استاندارد مورد بررسی و در نتیجه در میزان

فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها نقش داشته باشند. در بررسی فعالیت آنتاگونیستی، ایزوله و سویه‌ی استاندارد *باسیلوس پومیلوس* درجه‌ی نسبتا خوبی از فعالیت ضدمیکروبی علیه باکتری گرم مثبت *باسیلوس سرئوس* و توانایی ضعیف‌تری را در مهار رشد سایر میکروارگانیسم‌های هدف نشان دادند. فعالیت ضدمیکروبی به‌دست آمده در این مطالعه توسط سویه‌ی استاندارد و ایزوله‌ی *باسیلوس پومیلوس* و با استفاده از محیط ساختگی به ترتیب علیه باسیلوس سرئوس 18 و 21 میلی‌متر، *سودوموناس آئروژنوزا* 14 و 14 میلی‌متر و *کاندیدا آلبیکنز* 13 و 15 میلی‌متر بود.

در مطالعه‌ای Aunpad و همکاران (2007) ایزوله‌ای از *باسیلوس پومیلوس* با فعالیت ضدمیکروبی ضعیف‌تری علیه *باسیلوس سرئوس* (کمتر از 10 میلی‌متر) گزارش کردند (6). در مطالعه‌ای دیگر توسط Ouoba و همکاران (2006) ایزوله‌ای از *باسیلوس پومیلوس* فعالیت ضدمیکروبی بهتری علیه *باسیلوس سرئوس* (13-15 میلی‌متر) نشان داد (13). همچنین مطالعه‌ی Berrue و همکاران (2009) نشان داد که ایزوله‌ای از *باسیلوس پومیلوس* دارای فعالیت آنتاگونیستی علیه *سودوموناس آئروژنوزا* (13 میلی‌متر) و فعالیت ضدقارچی علیه مخمر *کاندیدا آلبیکنز* (14 میلی‌متر) می‌باشد (8).

در مطالعه‌ی حاضر، در بررسی اثر غلظت گلوکز محیط کشت تولیدی در میزان تولید ماده‌ی ضدمیکروبی، حداکثر تولید ماده‌ی ضدمیکروبی به ترتیب توسط سوپرناتانت فاقد سلولی ایزوله و سویه‌ی استاندارد *باسیلوس پومیلوس* علیه هر پنج میکروارگانیسم مورد آزمایش در غلظت 3% گلوکز به‌دست آمد. Aunmuhammad و همکاران (2009) حداکثر فعالیت مهاری توسط ایزوله‌ای از باسیلوس را علیه‌ی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *میکروکوکوس لوتئوس* در غلظت 2% گلوکز مشاهده کردند (7). گلوکز و سایر کربوهیدرات‌ها در سنتز آنتی‌بیوتیک‌ها مداخله می‌کنند و این اثر منبع کربن وابسته به مصرف سریع منبع کربن در دسترس و مقدم می‌باشد. در طول چند سال گذشته، پیشنهادات مهمی گزارش شده است که نشان‌گر جنبه‌های ضروری تنظیم منبع کربن در تولید آنتی‌بیوتیک در سطوح مولکولی و بیوشیمیایی است (14).

همچنین اثر pH با تغییر میزان pH اولیه محیط ساختگی، در تولید حداکثر ماده‌ی ضدمیکروبی بررسی شد (6و7)، که حداکثر هاله‌ی عدم رشد ایجاد شده به ترتیب توسط سوپرناتانت فاقد سلولی ایزوله و سویه‌ی استاندارد *باسیلوس پومیلوس* علیه میکروارگانیسم‌های هدف در pH 7 مشاهده شد و به تدریج کاهش فعالیت با افزایش pH محیط کشت و حداقل فعالیت در pH 9 مشاهده گردید(8و9). در بررسی Mendo و همکاران (2004) تولید ماده‌ی ضدمیکروبی در محدوده‌ی pH 7-8 محیط کشت توسط ایزوله‌ای از جنس باسیلوس گزارش شد (15). در مطالعه‌ای که Aunmuhammad و همکاران (2009) انجام دادند، حداکثر تولید ماده‌ی ضدمیکروبی توسط ایزوله‌ای از باسیلوس در pH 5 علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد (7). تغییر pH می‌تواند به علت مصرف گلوکز زیاد در فاز اولیه‌ی رشد باشد که خود منجر به تولید و تجمع اسیدهای آلی و کاهش pH محیط کشت می‌شود. همچنین افزایش pH می‌تواند در ارتباط با تولید آمونیاک باشد، بنابراین، تغییرات pH در میزان تولید مواد ضدمیکروبی مؤثر است. از سوی دیگر، تغییرات pH خارجی در فرآیندهای سلولی بسیاری مانند تنظیم بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه اثر می‌گذارد و گلوکز نیز به عنوان یک منبع کربن بسیارخوب در رشد باکتری‌ها و همچنین سنتز بسیاری از متابولیت‌های ثانویه دخالت دارد (9و14).

مطالعه Haavik و همکاران (1974) با مطالعه‌ی حاضر همخوانی دارد، نتایج مطالعه آن‌ها نیز نشان داد که تولید ماده‌ی ضدمیکروبی وابسته به pH است و اثر مهاری گلوکز در تولید ماده‌ی ضدمیکروبی، به علت تجمع اسیدهای آلی و به دنبال آن اسیدی‌شدن محیط کشت باکتری می‌باشد (16).

در مطالعه‌ی حاضر تولید ماده‌ی ضدمیکروبی در دوره‌های زمانی مختلف مانند 24، 48 و 72 ساعت نیز بررسی شد که حداکثر هاله‌ی عدم رشد ایجاد شده توسط سوپرناتانت فاقد سلولی ایزوله و سویه‌ی استاندارد مورد نظر بعد از 48 ساعت انکوباسیون علیه پاتوژن‌های مورد آزمایش به‌دست آمد. Bushra و همکاران (2007) نشان دادند که بهترین فعالیت ضدمیکروبی بعد از 24 ساعت انکوباسیون توسط *باسیلوس پومیلوس* علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *میکروکوکوس لوتئوس* به‌دست آمد درحالی‌که بعد از 48 ساعت انکوباسیون، افزایش فعالیت فقط علیه *میکروکوکوس لوتئوس* مشاهده گردید (17). مطالعه‌ی حاضر نیز نتیجه‌ی مشابهی را نشان داد به گونه‌ای که حداکثر تولید مواد ضدمیکروبی در طول 72ـ48 ساعت انکوباسیون به عنوان فاز رشد سریع برای گونه‌ی *باسیلوس پومیلوس* مشاهده شد.

مطالعات در زمینه‌ی تولید آنتی‌بیوتیک نشان می‌دهد که تولید آنتی‌بیوتیک با افزایش سلول‌های باکتری تولید کننده‌ی آن، افزایش می‌یابد. بنابراین، یافتن محیط کشت مناسب جهت

رشد باکتری‌ها در میزان تولید متابولیت‌های ثانویه و مواد ضدمیکروبی توسط آن‌ها مؤثر است (9و18). از این رو، تغییر و مصرف ترکیباتی مانند اسیدآمینه (به عنوان منبع نیتروژن)، قند (به عنوان منبع کربن) و تولید اسیدهای آلی تأثیر زیادی بر میزان تولید متابولیت‌های ثانویه توسط میکروارگانیسم‌ها دارد (9، 14و18). همچنین عناصر کمیاب مانند فسفر، سولفور، فلز منیزیم، روی، آهن و مس به‌صورت نمک‌های محلول در رشد بیشتر میکروارگانیسم تولید کننده‌ی آنتی‌بیوتیک مؤثر هستند (14). این یافته‌ها با نتایج به‌دست آمده در این تحقیق برابری می‌کند.

نتایج این مطالعه و مطالعات دیگر (14و16) نشان دادند که سنتز ماده‌ی ضدمیکروبی می‌تواند توسط تغییر نوع و غلظت مواد تشکیل دهنده‌ی محیط کشت تولیدی و تغییر عوامل خارجی مانند pH و گلوکز محیط کشت و زمان انکوباسیون تحت تأثیر قرار گیرد(9و18).

در مطالعه‌ی حاضر ایزوله و سویه‌ی استاندارد مورد بررسی، فعالیت ضدمیکروبی بهتری نسبت به باکتری گرم مثبت نشان دادند. در مطالعه‌ی Berrue و همکاران (2009) ایزوله‌ای از باسیلوس پومیلوس نسبت به باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* فعالیت ضدمیکروبی بهتری در مقایسه با باکتری گرم منفی *سودوموناس آئروژنوزا* نشان داد (8). همچنین Ouoba و همکاران (2006) بیان کردند که ایزوله‌ای از *باسیلوس پومیلوس* فعالیت ضدمیکروبی بهتری نسبت به باکتری گرم مثبت *باسیلوس سرئوس* در مقایسه با دو باکتری گرم منفی *اشریشیاکلی* و *سالمونلا تیفی موریوم* دارد (13).

تفاوت در حساسیت باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نسبت به متابولیت‌های مختلف، می‌تواند به تفاوت در پوشش و جنس لایه‌های این میکروارگانیسم‌ها مرتبط باشد. باکتری‌های گرم منفی دارای یک غشای خارجی با ساختار لیپوپلی‌ساکاریدی هستند که باعث ناتراوایی و نفوذناپذیری آن‌ها می‌شود اما پوشش باکتری‌های گرم مثبت به‌علت نداشتن این غشای خارجی، نمی‌تواند یک مانع مؤثر جهت نفوذپذیری متابولیت‌ها باشد (8و13).

نتیجه گیری

نتایج نشان داد که نوع و ترکیبات محیط کشت مورد استفاده و تغییر عوامل خارجی مانند pH و زمان انکوباسیون در تولید بیشتر ماده‌ی ضدمیکروبی *باسیلوس پومیلوس* مؤثرند. همچنین نتایج نشان داد که گونه‌ی *باسیلوس پومیلوس* می‌تواند یک انتخاب مناسب و بالقوه جهت تولید ترکیبات ضدباکتریایی علیه پاتوژن‌های انسانی مورد آزمایش باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات کارشناس محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، سرکار خانم اندیش که نهایت همکاری را با ما داشتند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌کنیم.

References

1. Esikova TZ, Temirov YV, Sokolov SL, Alakhov YB. *Secondary antimicrobial metabolites produced by thermophilic Bacillus spp. strains VK2 and VK21*. Appl Biochem Microbiol. 2002; 38:226-231.
2. Demain AL, Aharonowitz Y, Martin JF. *Metabolite control of secondary biosynthetic pathways.* In: Vining LC, ed. Biochemistry and genetic regulation of commercially important antibiotics. Addison-Wesley, London: 2000, 49-67.
3. Nithya CH, Aravindraja CH, Pandian, ShK. *Bacillus pumilus of Palk Bay origin inhibits quorum-sensing-mediated virulence factors in Gram-negative bacteria.* Res Microbiol. 2010; 293, 296-303.
4. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Antimicrobial drugs, microbiology an introduction*, 20th chapter. The Benjamin/Cummings publishing company, Inc. 1995, 491-514.
5. Katz E, Demain AL. *The peptide antibiotics of Bacillus: chemistry, biogenesis, and possible functions*. Bacteriol Rev. 1977; 41, 449–474.
6. Aunpad R, Na-Bangchang K. *Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria Bacillus pumilus strain WAPB4*. Curr Microbiol. 2007; 55:308-313.
7. Aunmuhammad S, Ahmad S, Hameed A. *Antibiotic production by thermophilic Bacillus SAT-4*. Pak J Pharm Sci. 2009; 22:339-345.
8. Berrue F, Ibrahim A, Boland P, Kerr RG. *Newly isolated marine Bacillus pumilus (SP21): A source of novel lipoamides and other antimicrobial agents.* Pure Appl Chem. 2009; 81:1027–1031.
9. Hasan F, Khan S, Alishah A, Hameed A. *Production of antibacterial compounds by free and immobilized Bacillus pumilus SAF1*. Pak J Bot. 2009; 41:1499-1510.
10. Cho KM, Math RK, Hong SY, Mandanna DK, et al. *Iturin produced by Bacillus pumilus HY1 from Korean soybean sauce (kanjang) inhibits growth of aflatoxin producing fungi*. J Food Control. 2009; 402,404-406.
11. Bottone EJ, Peluso RW. *Production by Bacillus pumilus (MSH) of an antifungal compound that is active against Mucoraceae and Aspergillus species: Preliminary report*. J Med Microbiol. 2003; 52:69–74.

12. Bergey DH, Holt JG. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th. Williams & Wilkins publishers, Baltimore; 1994; 58-101.
13. Ouoba LII, Diawara B, Jespersen L, Jakobsen M. *Antimicrobial activity of Bacillus subtilis and Bacillus pumilus during the fermentation of African locust bean (Parkia biglobosa) for Soumbala production*. J Appl Microbiol. 2006; 963–970.
14. Awais M, Pervez A, Qayyum S, Saleem M. *Effects of glucose, incubation period and pH on the production of peptide antibiotics by Bacillus pumilus*. Afri J Microbiol Res. 2008; 2:114-119.
15. Mendo S, Faustino NA, Sarmento AC, Amado F, Moir AJ. *Purification and characterization of a new peptide antibiotic produced by thermotolerant Bacillus licheniformis strain*. Biotechnol Lett. 2004; 26:115-119.
16. Haavik HI. *Studies on the formation of bacitracin by Bacillus licheniformis: Role of catabolite repression and organic acids*. J Gen Microbiol. 1974; 84:321-326.
17. Bushra J, Hasan F, Hameed A, Ahmed S. *Isolation of Bacillus subtilis MH-4 from soil and its potential of polypeptidic antibiotic production*. Pak J Pharm Sci. 2007; 20:26-31.
18. Gesheva V, Ivanova V, Gesheva R. *Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by Streptomyces hygroscopicus*. Microbiol Reds. 2005; 160:243-248.