Archive of SID

مجله علمی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
زمستان1388، دوره یکم، شماره سوم، صفحه 8 - 1

ارزیابی اثرضد میکروبی باکتری جداشده از سطح پوست قورباغه درختی معمولی(*Hyla savignyi*) و شناسایی بیوشیمیائی و فیلوژنتیکی آن

هاوری علائی*[1]، غلامحسین ابراهیمی پور [1]، سید مرتضی مهرداد[2]، اعظم مرادی [1]، عبدالرزاق مرزبان [1]
1- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
2- گروه آلاینده های محیط زیست، پژوهشکده علوم محیطی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
نویسنده مسئول*: هاوری علائی، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی، تهران
hawry_alaee2006@yahoo.com

دریافت: 88/9/14 پذیرش:88/10/30

چکیده

زمینه و هدف: کاربرد وسیع آنتی‌بیوتیکها و مواد ضد میکروبی باعث ظهور عوامل بیماریزای مقاوم شده و شمار میکروارگانیسم های مقاوم به آنتی بیوتیک ها افزایش چشمگیری یافته است، که پیدایش میکروارگانیسم های مقاوم به آنتی بیوتیک های رایج امروزی یکی از مشکلات جدی میباشد. هدف ما در این مطالعه بررسی اثرات ضد میکروبی باکتری جدا شده از پوست قورباغه درختی معمولی(Hyla savignyi) و شناسایی بیوشیمیائی و فیلوژنتیکی آن میباشد.

روش بررسی: بعد ازنمونه برداری از پوست قورباغه در شرایط استریل و کشت باکتریها در محیط نوترینت براث، در مجموع چهار باکتری با خاصیت ضد میکروبی شناسایی، که یکی از آنها برای مطالعات بعدی انتخاب شد.

یافته ها: نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری های روی سطح پوست قورباغه دارای فعالیت ضد میکروبی میباشد. آنالیز فیلوژنتیکی این باکتری، با استفاده از قطعه 16srDNA شباهت آن را با باکتری های جنس باسیلوس نشان داد، که با انجام تست های بیوشیمیائی بیشترین شباهت را با *Bacillus subtilis* داشت. تولید ماده ضد میکروبی این باکتری از فاز لگاریتمی شروع، اما بیشترین آن در اواخر فاز لگاریتمی یا اوایل فاز سکون میباشد. ماده ضد میکروبی قطبی است و در طیف وسیعی از دما پایدار و دارای فعالیت ضد میکروبی میباشد. اما این ماده به تغییرات pH حساس میباشد.

نتیجه گیری: باتوجه اثرات چشمگیر ماده ضد میکروبی و مهار رشد میکروارگانیسم های استاندارد آزمایشگاهی، شناسایی ماده ضد میکروبی میتواند موثر واقع شود.

واژه های کلیدی: ماده ضد میکروبی، قورباغه Hyla savignyi ، خالص سازی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

جانوران نیز همچون گیاهان در برابر هجوم میکروارگانیسم های پاتوژن با تولید و ترشح پپتید های ضد میکروبی از خود دفاع میکنند. پپتید های ضد میکروبی یکی از اجزای دفاعی ضروری بر علیه پاتوژن های مهاجم میباشد. دوزیستان دارای منبع غنی از ترکیبات ضد میکروبی در غدد پوستیشان با اثرات چشمگیر می باشد که بسیار شبیه نوروپپتید ها و هورمون ها در پستانداران است و به عنوان یکی از اجزای اصلی سیستم دفاعی آنان میباشند(1). بدن مرطوب این قورباغه محل مناسبی برای رشد قارچها و باکتریها است. ولی مواد مترشحه از پوست آنها تا حد زیادی از رشد چنین میکروارگانیسم‌هایی جلوگیری می‌کند(2و3). در ایران تاکنون در مورد جداسازی باکتری های دارای خاصیت ضد میکروبی از پوست قورباغه درختی گزارش نشده است. اولین پپتیدهایی با فعالیت ضدمیکروبی در پوست قورباغه چنگال‌دار آفریقایی *Xenopus laevis* بوده است. بیش از 200 پپتید از پوست قورباغه‌هایی که متعلق به خانواده‌های مختلف هستند، جداسازی شده‌اند که بخاطر مکانیسم غیراختصاصیشان، پاتوژن‌ها نسبت به آنها در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های معمولی کمتر مقاوم می‌شوند(3). پپتیدهای خانواده Hylidae دارای مارپیچ α با خاصیت آمفی‌پاتیک می‌باشند. شامل درماسپتین‌های B (34-28 آمینواسید)، S- فیلوکسین (19 آمینواسید) و درماتوکسین (32 آمینواسید) که از هیلا آمریکای جنوبی و نواحی گرمسیری آمریکای شمالی ایزوله شدند (1). پپتیدهای شامل گاگواین‌ها (37-24 آمینواسید)، بروینین 1 (24-17 آمینواسید) و بروینین2 (34-30 آمینواسید)، راناتورین 1 (25 آمینواسید) و راناتورین 2 (33 آمینواسید)، رانالکسین‌ها(20آمینواسید)، اسکولنتین 1 (46 آمینواسید) و اسکولنتین2 (37 آمینواسید) و روگوزین‌ها (37-33 آمینواسید) که از گونه‌های خانواده رانا اروپایی، آسیایی و آمریکای شمالی ایزوله شده‌اند (3). زیر خانواده پپتیدی دیگر از پپتیدهای بسیار کوچک به نام تمپورین‌ها (13-10 آمینواسید) که فاقد حلقه C ترمینال می‌باشند از رانا آمریکای شمالی و اروپایی ایزوله شده‌اند که بر علیه باکتری های استاندارد گرم مثبت، گرم منفی و نیز مخمر کاندیدا آلبیکانس موثر است (1و3). درماتوکسین بیشتر بر علیه باکتری های گرم مثبت نسبت به گرم منفی تاثیر دارد (1). درماسپتین باعث اثر بر روی غشا باکتری های گرم مثبت، گرم منفی، قارچ ها ومخمر ها اثر باکتریوسایدی را اعمال می کند.

روش بررسی

نمونه برداری و جداسازی باکتری: دو نمونه از قورباغه از برکه های شهرستان لردگان استان چهارمحال و بختیاری انتخاب شد به آزمایشگاه منتقل شدند. در شرایط استریل، بعد از شستن پوست آنها با آب مقطر با استفاده از لوپ از قسمت-های مختلف پوست (تمام سطح بدن) نمونه‌برداری انجام گرفت و به محیط‌های نوترینت براث تلقیح شد. بعد از انکوبه کردن باکتریها به مدت 24 ساعت در محیط کشت نوترینت براث برای بدست آوردن کلنی‌های تک از روش رقت‌سازی سریال استفاده شد. بدین منظور 10 لوله که حاوی 4/5 میلی-لیتر سرم فیزیولوژی (0/8% نمک) بود برداشته، از محیط کشت نوترینت براث با استفاده از سمپلر، 500µl از محیط نوترینت براث حاوی نمونه برداشته و به درون لوله شماره یک ریخته، از لوله یک 500 میکرولیتر به درون لوله شماره دو ریخته، به همین ترتیب ادامه داده (رقت‌سازی از 10^{-1} تا 10^{-10})، در مرحله بعد 100 میکرو لیتر از هر لوله با رقت مشخص برداشته و در مرکز هر پلیت حاوی محیط نوترینت آگار ریخته، آن را با استفاده از لوله شیشه‌ای دریگالسکی پخش کرده، پس از 24 ساعت تمام کلنی‌هایی که از لحاظ ظاهری متفاوت بودند را به صورت جداگانه به محیط کشت نوترینت براث تلقیح شدند که در نهایت موفق به جداسازی 4 باکتری دارای فعالیت ضد میکروبی شدیم. که در این مطالعه تنها روی یکی از باکتریها بررسی های بیشتر انجام شد (4).

شناسائی باکتری: به منظور شناسایی دقیق باکتری ، از روشهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیلوژنتیکی استفاده گشت.

واکنش زنجیره ای پلیمراز: عمل PCR با استفاده از پرایمر های(´3-AGAGTTTGATCCTGGCTC- 5') forward و(´3-GCCTAAGGAGGT GATCCA- 5´) Reverse انجام شد. برنامه دمائی برای تکثیر آن دمای 94ºC برای مدت 5دقیقه (واسرشت شدن ابتدایی)، مرحله تکثیر شامل الف-واسرشت شدن: دمای 94 ºC به مدت 40 ثانیه ب- اتصال پرایمرها: دمای55°C به مدت 40 ثانیه ج- طویل شدن: دمای 72 °C به مدت یک دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی که در دمای72 ºC به مدت 10 دقیقه اعمال شد.

خالص استخراج گردید. استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت High pure PCR Product محصول شرکت

www.SID.ir

Archive of SID

Roche آلمان انجام شد. و به منظور تعیین غلظت DNA و نیز بررسی میزان خلوص آن، جذب DNA در دو طول موج 260 و 280 نانومتر اندازه گیری شد.

بعد از انجام PCR و الکتروفورز روی ژل، محصولات PCR ازروی ژل بازیابی شده و قطعات تکثیر شده و خالص شده با استفاده از یک DNA Sequencer و به روش اتوماتیک (SEQLAB,Germany) براساس ChainTermination Method روش سنگر(5)، توسط شرکت تکاپوزیست و با روش تمام اتوماتیک تعیین توالی شد. برای تعیین میزان قرابت با باکتریهای دیگر کاوش‌هایی در بانک‌های اطلاعاتی EMBL/GenBank (6)، انجام شد و با استفاده از BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) جستجوهای همولوژی به عمل آمد.

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی: برای بررسی و سنجش فعالیت ضد میکروبی با روش دیسک دیفیوژن، باکتری ها در انکوباتور30°C در محیط کشت نوترینت براث 24-48 ساعت و 72-144 ساعت در محیط کشت سنتتیک انکوبه شدند. سپس سلولها را با استفاده از سانتریفیوژ g ×10000 به مدت 20 دقیقه رسوب داده، و به مقدار 2ml از مایع روئی (سوپرناتانت) حاصله بر روی کاغذهای بلانک با قطر 6.6 میلی‌متر ریخته و آنها را گذاشته تا خشک شوند. سپس ازمیکروارگانیسم های استاندارد (جدول3)، 0.5 مک فارلند(10^8cell/ml ×1) تهیه کرده با استفاده از سواپ آنها را به روش کشت چمنی بر روی مولر هینتون آگارکشت داده، و دیسک حاوی ماده ضد میکروبی را بر روی آن قرار داده و به مدت 24 ساعت انکوبه شدند و آنگاه هاله عدم رشد اندازه گیری شد (7).

استخراج و خالص سازی: جهت استخراج و خالص سازی نسبی ونیز تعیین قطبیت ماده ضد میکروبی از حلال های آلی کلروفرم، اتیل استات، استفاده شد که ابتدا بیوماس سلولی با سانتریفیوژ رسوب داده و مایع روئی آن چندین بار با حلال های آلی شستشو داده شد و در نهایت از دو فاز آبی و فاز حلال تست آنتی بیوگرام انجام شد (8).

تعیین قطبی یا غیر قطبی بودن ماده ضد میکروبی: برای تست قطبی و غیرقطبی بودن ماده ضد میکروبی به مایع روئی حاصل از سانتریفوژ، به میزان 1/4 حجمی، چندین بار (10-12 بار) کلروفرم اضافه شد و هر بار بعد از هم زدن، فاز کلروفرمی جدا شد و سپس از لایه کلروفرمی و لایه آبی به روش دیسک دیفیوژن تست ضد میکروبی بر روی میکروارگانیسم های اندیکاتور صورت پذیرفت (7).

اثر دما و pH بر روی فعالیت ضد میکروبی: اثر دما و pH بر روی فعالیت ضد میکروبی به این صورت انجام شد که در 6 لوله آزمایش درپیچدار به حجم مساوی (2 میلی‌لیتر) مایع روئی حاوی ماده ضدمیکروبی ریخته، سپس در 6 دمای مختلف 40، 50، 60، 70، 80 و 100 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 ساعت و از طرفی دیگر در7 لوله آزمایش درپیچدار دیگر به حجم مساوی (2 میلی‌لیتر) مایع روئی حاوی ماده ضدمیکروبی ریخته، و به ترتیب در pH 4، 5، 6، 7، 8، 9، 10 به مدت دو ساعت قرار داده شد پس از دو ساعت pH محیط-ها را مجدداً بر روی 7 تنظیم کرده و درنهایت تست ضد میکروبی انجام گرفت و هاله عدم رشد اندازه گیری شد (9).

یافته ها:

مشخصات باکتری تولید کننده ماده ضد میکروبی : خصوصیات ظاهری کلنی از لحاظ رنگ، فرم و اندازه بر روی محیط مولر هینتون آگار و تست های بیوشیمیائی انجام شد که نتایج آن در جدول 1 آمده است.

تکثیر قطعه 16S rDNA و مشاهده باند بر روی آگارز 1% : نتیجه تکثیر یک قطعه دارای 1600 جفت نوکلئوتید بود در شکل -1 نشان داده شده است.

نتایج آنالیز فیلوژنتیکی توالی:

توالی قطعه 16S rDNA حاصل از PCR ، بعد از ویرایش توالی نوکلئوتیدی بدست آمده 1449 نوکلئوتید بود که این توالی به کمک نرم افزار Blast در NCBI مورد بررسی قرار گرفت، که نتایج آنالیز فیلوژنتیکی آن شباهت باکتری مورد مطالعه ما را با پنج باکتری مختلف از جنس باسیلوس نشان داد، که با انجام تست های بیوشیمیائی شباهت این باکتری با باسیلوس سوبتیلیس بیشتر بود.

نتایج ارزیابی فعالیت ضد میکروبی (تست تعیین حساسیت) با استفاده از روش دیسک دیفیوژن:

ماده ضد میکروبی حاصل از این باکتری وسیع الطیف میباشد به طوری که پس از انجام نمونه‌برداری و کشت در محیط نوترینت براث به مدت 24-48 ساعت در دمای 30 درجه سانتی‌گراد، تست آنتی‌بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن با استفاده از سوپرناتانت حاصل بر روی میکروارگانیسم‌های استاندارد انجام شد که نتایج آن در جدول 2 آمده است. اثر

www.SID.ir

Archive of SID

این ماده بر روی باسیلوس سوبتیلیس، مخمر کاندیدا آلبیکانس، قارچ آسپرژیلوس نایجر و نیز باکتری اشریشیاکلی متفاوت میباشد. در واقع میتوان گفت اثر آن بر روی کاندیداآلبیکانس و نیز باسیلوس سوبتیلیس از بقیه بیشتر بود. به عنوان مثال اثرات ماده ضد میکروبی بر روی اشریشیاکلی در زیر آمده است (شکل2). همچنین در این شکل ارتباط بین رشد باکتری و تولید ماده ضد میکروبی (هاله عدم رشد) نشان داده شده است.

اثر دما بر روی فعالیت ماده ضد میکروبی:

به منظور پایداری و فعالیت ماده ضدمیکروبی در برابر دما، درجه حرارتهای 100-50 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 ساعت انجام شدکه نشان داد که افزایش دما میتواند تاحدودی روی فعالیت ماده ضد میکروبی تاثیر بگذارد که با اندازه گیری هاله عدم رشد میتوان به این نتیجه رسید (شکل3 –الف).

اثر pH بر روی فعالیت ماده ضد میکروبی:

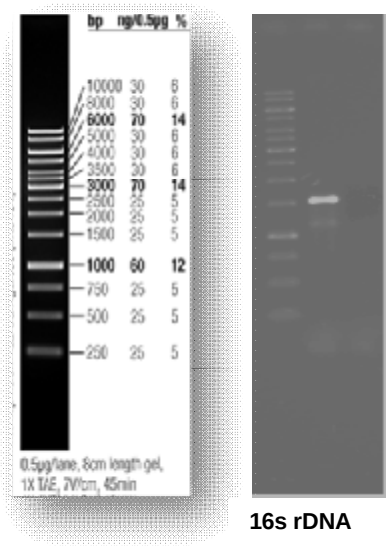
پایداری و فعالیت ماده ضد میکروبی در pH های مختلف نشان داد که در pH های اسیدی وقلیائی فعالیت ضد میکروبی از بین می رود (تست ماده ضد میکروبی روی باکتری های استاندارد هاله عدم رشد مشاهده نشد) و تنها در pH=7 ونیز pH= 8 فعالیت ضد میکروبی (ایجاد هاله عدم رشد روی باکتری های استاندارد) وجود دارد (شکل3– ب).

جدول شماره 1- تست های بیوشیمیائی و مورفولوژیکی باکتری با فعالیت ضد میکروبی

مورفولوژی کلنی بر روی پلیت مولر هینتون آگار	بزرگ،لزج،آبدار،چسپنده،صاف وشیری رنگ	هیدرولیز نشاسته	مثبت(+)
شکل میکروسکوپی	باسیل	متیل رد(MR)	مثبت(+)
رنگ آمیزی گرم	مثبت(+)	وکس پروسکوئر(VP)	منفی(-)
رشد در شرایط بی هوازی	منفی(-)	رشد در محیط مانیتول سالت آگار	مثبت(+)
حرکت	مثبت(+)	همولیز خون گوسفند	مثبت(+)
کاتالاز	مثبت(+)	نیتریفیکاسیون	منفی(-)
اکسیداز	منفی(-)	دنیتریفیکاسیون	منفی(-)
تولید H2S	منفی(-)	فرمانتاسیون گلوکز	مثبت(+)
تولید اندول	مثبت(+)	فرمانتاسیون لاکتوز	منفی(-)
اسپور	مثبت(+)	فرمانتاسیون ساکارز	منفی(-)
کپسول	مثبت(+)	رشد در غلظتهای مختلف نمک(3.5%.4.5%.6%)	مثبت(+)

www.SID.ir

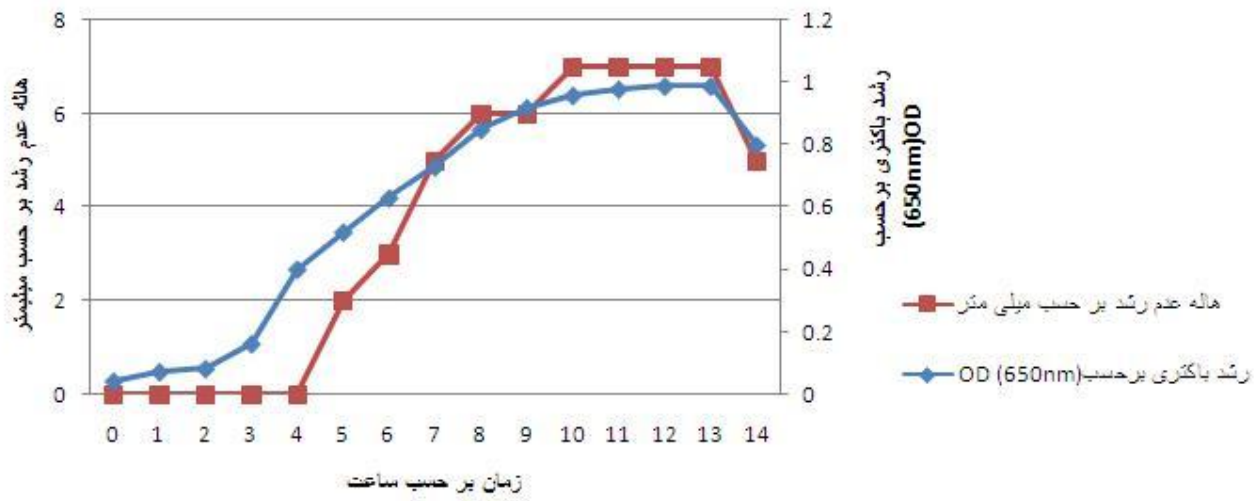
Archive of SID



16s rDNA

M: ladder mix
S: 1600bp DNA fragment
N: negative control

شکل 1- (باند قطعه 16S rDNA حاصل از PCR)



شکل2 - نمودار ارتباط رشد باکتری با تولید ماده ضد میکروبی (هاله عدم رشد) بر روی اشریشیاکلی

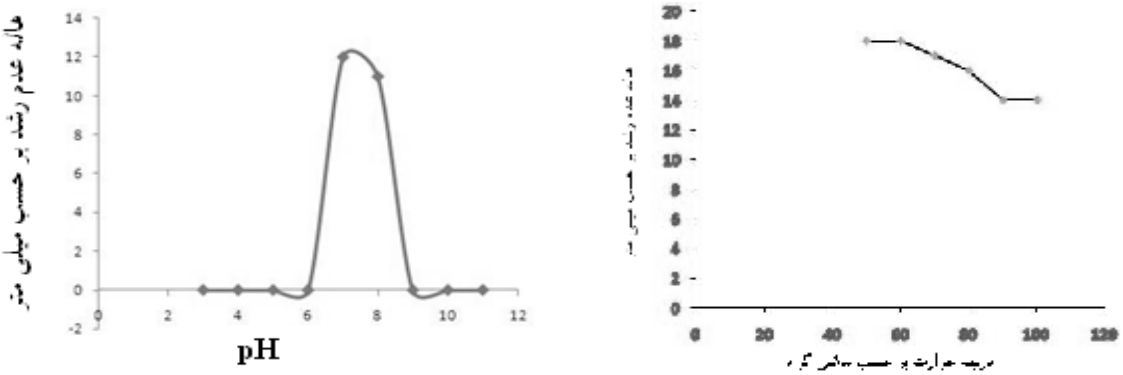
www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره 2- اثر ماده ضد میکروبی تولید شده توسط باکتری ISB1 بر روی میکروارگانیسمهای اندیکاتور با استفاده از روش دیسک دیفیوژن بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار در دمای 30°C به مدت 24 ساعت

سویه های میکروبی اندیکاتور	هاله عدم رشد	سویه های میکروبی اندیکاتو	هاله عدم رشد
باسیلوس سوبتیلیس ATCC 465	++	**کاندیدا آلبیکنس ATCC 10231**	++
استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923	+	**آسپرژیلوس نایجر**	++
اشریشیاکلی ATCC 25922	+		
سودوموناس آئروجینوزا ATCC 85327	+		

(++) هاله عدم رشد قوی (≥ 10 mm)، هاله عدم رشد ضعیف (≤ 10 mm)



ب) الف)

شکل 3 - نمودار هاله عدم رشد بر حسب دما (الف) و pH (ب) (جهت ارزیابی فعالیت ماده ضد میکروبی)

بحث:

سنتز متابولیت های ثانویه و به خصوص آنتی بیوتیکها توسط میکروارگانیسم ها دارای اهمیت اقتصادی و علمی فراوانی است. توانایی ما در تولید این ترکیبات، در بیشتر موارد توسط فرآیند تخمیر تاثیر شگرفی را بر روی زمینه های پزشکی گذاشته است (10). ثابت شده است که گونه های مختلف باسیلوس قادر به تولید ماده خارج سلولی با فعالیت ضد میکروبی می باشند. که بسیاری از آنها به عنوان نگه دارنده در صنایع غذایی و نیز بر علیه پاتوژن ها کاربرد دارند (11). بررسی مشخصات باکتری ایزوله شده نشان داد که این باکتری با باسیلوس سوبتیلیس شباهت زیادی دارد. باکتری جدا شده در این پژوهش از پوست قورباغه، فعالیت ضد میکروبی آن در اوایل فاز لگاریتمی شروع و در اواخر فاز لگاریتمی یا اوایل فاز سکون به حداکثر می رسد. ماده ضد میکروبی قطبی و وسیع الطیف می باشد. بررسی ها نشان داد که دمای بهینه و pH برای داشتن حداکثر فعالیت ضد میکروبی به ترتیب 30°C و pH= 7 می باشد . از آنجائی که یکی از مهمترین اجزا محیط کشت برای رشد باکتری و تولید ماده ضد میکروبی منبع کربن می باشد (12 و 13). لذا منابع کربن مختلف همچون استات سدیم ، نشاسته، تری سیترات سدیم، ملاس و گلوکز تست شد و نشان داد سدیم استات منبع مناسبی برای رشد باکتری و تولید بیشترین ماده ضد میکروبی می باشد. از دیگر ویژگیهای این ماده ضد میکروبی تاثیر آن بر روی باکتری های بیماریزا همچون استافیلوکوکوس اوره ئوس و سودوموناس آئروژینوزا و پایداری آن در دماهای بالا و حساس به تغییرات pH می باشد. با توجه به واکنش مثبت ماده روی کاغذ TLC به نین هیدرین و نیز مشاهده باند پروتئینی با استفاده از الکتروفورز عمودی (SDS-PAGE) احتمالا این ماده مولکولهای کوچک پپتیدی متشکل از چند

www.SID.ir

Archive of SID

اسید آمینه باشد (14). نتایج این پژوهش نشان داد که ماده ضد میکروبی قطبی می باشد چرا که نتیجه شستشوی مایع روئی با حلالهای آلی (کلروفرم، اتیل استات) بعد از چندین مرتبه و انجام دیسک گذاری از فاز آبی و آلی نشان داد که تنها در فاز آبی هاله عدم رشد مشاهده شد و فاز کلروفرمی هاله عدم رشد مشاهده نشد.

بر اساس مقایسه انجام شده خصوصیات ماده ضد میکروبی این مطالعه با دیگر آنتی بیوتیکهای که توسط باکتری های جنس باسیلوس تولید میشود، نشان میدهد که این ماده نمیتواند باکتریوسین باشد چرا که محصول ما وسیع الطیف است طبق گفته آبادا و همکاران در سال 2008 مبنی بر اینکه ماده ضد میکروبی تولید شده، علاوه بر تاثیر بر روی باکتری های گرم منفی و گرم مثبت، بر روی قارچ نیز اثر ضد میکروبی داشته باشد از نوع آنتی بیوتیکهای وسیع الطیف است (4). باکتریوسین از پپتید های مترشحه از جنس باسیلوس می باشد اما این پپتید وسع الطیف نیست، و از طرفی بر روی یاکتری اشریشیاکلی، سودوموناس و استافیلوکوکوس بی تاثیر میباشد. آنتی بیوتیکهای پپتیدی به طور معمول وزن آنها بین 3000-2000 دالتون میباشد. و تعداد اندکی از آنها توسط آنزیم های از منبع میکروبی و نیز آنزیم های از منابع دیگر هیدرولیز میشوند. آنتی بیوتیکهای پپتیدی ممکن است دارای مشتقات آمینواسیدهای غیر معمول و نیز دارای اسیدهای چرب، پیریمیدین، قندهای آمینه، اسیدهای هیدروکسی و آمین ها باشد (15). بعضی از خصوصیات ماده ضد میکروبی این بررسی شبیه پپتید ضد قارچی تولید شده توسط سویه ای از باسیلوس سوبتیلیس می باشد، ازجمله محدوده جذب ماده در دستگاه UV-SPECTRUM بین 250-300 نانومتر میباشد و این از مشخصه های جذب پیوند های پپتیدی است. و نیز آنالیز طیف IR (Infra Red) پیک های مربوط، پیوند های پپتیدی را نشان میدهد. اما پپتید ضد قارچی در طیف وسیعی از pH دارای فعالیت ضد میکروبی است در صورتی که ماده این مطالعه در pH های اسیدی و قلیائی فعالیتش از بین می رود. و نیز ماده استخراج شده با متانول در نتایج ما هاله عدم رشد نشان داد در صورتیکه پپتید ضد قارچی هاله عدم رشد نشان نداد (16). در ضمن خصوصیات باکتری تولید کننده پپتید ضد قارچی (وجود اسپور، رشد در غلظت بالای نمک (تا7%) در محیط کشت نوترینت براث و تست متیل رد مثبت و وکس پروسکوئر منفی) از شباهت های قابل توجه با باکتری این مطالعه بود(16). Korenblum و همکارانش در سال 2005، پپتید های مترشحه از سه باکتری جنس باسیلوس بررسی کردند که نتایج نشان داد که این سه ماده تا دمای 100 درجه سانتیگراد و نیز در محدوده وسیعی از pH دارای فعالیت ضد میکروبی هستند اما ماده مورد بررسی در این مطالعه با وجود پایداری در دماهای مختلف، به تغییرات pH حساس می باشد (17). طبق گفته Balbna و همکارانش این ماده نمی تواند باسیتراسین باشد چرا که منحصرا بر روی باکتری های گرم مثبت عمل می کند از طرفی محصول این بررسی وسیع الطیف می باشد(18). همچنین، باسیتراسین به pH های قلیائی حساس و در pH های اسیدی ونیز به فرم آلدئید مقاوم می باشد و فعالیت ضد میکروبی آن از بین نمیرود (18). BLS (bacteriocin –like substance) که یک نوع پپتید مترشحه از باکتریهای جنس باسیلوس میباشد، تا دمای بالا 100 درجه سانتیگراد و نیز به pH بین3-10مقاوم میباشد. اما فعالیت آن در حضور آنزیم های پروتئاز از بین میرود و نیز از سویه های استاندارد تست شده در این تحقیق، BLS تنها بر روی باسیلوس سوبتیلیس تاثیر دارد (19). باسیلین یک آنتی بیوتیک پپتیدی جدا شده از باسیلوس سوبتیلیس می باشد که در pH= 2 دارای فعالیت ضد میکروبی است واحتمال اینکه ماده ما باسیلین باشد رد می شود (20). به نظر می رسد ماده این بررسی با سوبتیلیزین که یک لیپوپپتید مترشحه از باسیلوس سوبتیلیس می باشد نیز متفاوت باشد چرا که سوبتیلیزین بر روی میکروارگانیسم های استاندارد همچون اشریشیاکلی، باسیلوس سوبتیلیس، سودوموناس آئروژینوزا بدون تاثیر می باشد (21). در مورد درماتوکسین و درماسپتین پپتید های ضد میکروبی جدا شده از خانواده هیلا میتوان گفت وجه تشابه درماسپپتین با پپتید این مطالعه در این است که هر دو وسیع الطیف می باشند و بر علیه قارچها، مخمر، باکتری های گرم مثبت و گرم منفی موثر می باشد. ونیز اینکه هر دو ساختار پپتیدی دارند (3و1).

نتیجه گیری

نتایج مطالعه نشان می دهدکه ماده یافت شده از پوست قورباغه با مواد ضد میکروبی باکتری های جنس باسیلوس شباهت خیلی زیادی ندارد، به عنوان مثال خراب شدن در pH اسیدی و قلیائی و اثرات آن بر روی میکروارگانیسم های متفاوت همچون باکتری های گرم مثبت، گرم منفی، مخمر ها و قارچها. باتوجه به اثرات آنتاگونیستی ماده ضد میکروبی حاصل از این باکتری بر علیه باکتری های گرم مثبت، گرم

www.SID.ir

Archive of SID

منفی، قارچ ها و مخمرها، مطالعه بیشتر روی این باکتری و شناسایی ماده ضد میکروبی آن می تواند مفید واقع شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از آقایان مهندس خسرو ملا جعفری و مهندس جواد فخاری اعضا محترم هیئت علمی دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی قدر دانی میگردد

Refrences

1- Amiche M, Aurelia AS, Wroblewski H, Nicolas P. *Isolation of dermatoxin from frog skin, an antibacterial peptide encoded by a novel member of a dermaseptin genes family*. Eur. J. Biochem. 2000; 267: 4583-4592.

2- Sardari S, Amin GH, Sekhon A, Micetich RG, Daneshtalab M. *Antifungal activity of Diplotaenia damavandica*. Pharmacy and Pharmacology Communication.2000;6:455-458.

3- Douglas WC, Louise AR, Reinert L, Cynthia C, Michael J, Tyler RA. *Population trends associated with skin peptide defenses against chytridiomycosis in Australian frogs.* Oecologia. 2005;1:1-10.

4- Abada EAE. *Isolation and characterization of a antimicrobial compound from Bacillus coagulans. Animal cells an systems*. 2008;12(1): 41-46.

5- Sanger F, Nicklen S, Coulson AK. *DNA sequencing with chain terminating inhibitors.* Proc. Natl. Acad. Sci. 1977;74: 5463-5467.

6- Boman HG. *Peptides antibiotics and their role in innate immunity* Annu. Rev. Immunol. 1995;13:16-62.

7- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turk M. *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol.* 1966; 45: 493-496.

8- Augustine SK, Bhavsar SP, Kapadnis BP. *A non-polyene antifungal antibiotic from Streptomyces albidoflavus* PU 23. *J Biosci.* 2005;30(2): 201–211.

9- Saadoun I, Muhana A. *Optimal production conditions, extraction, partial purification and characterization of inhibitory compound(s) produced by Streptomyces Ds-104 isolate against multi-drug resistant Candida albicans. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. 2008; 2 (2): 402-420.

10- Rokem JS, Lantz AE, Nielsen J. *Systems biology of antibiotic production by microorganisms*. 2007;24(6): 1262-87.

11- Wang J, Fung DYC. *Alkalin- fermented foods*: A review with emphasis on pidan fermentation.critical Review in Microbiology.1996; 22:101-138.

12- Rios JL, Recio MC, Villar A. *Screening methods of natural products with antimicrobial activity*. 1988; 23(2-3): 127-49.

13- El-Tayeb OM, Hussein MMM, Salama AA, El-Sedawy HF. *Optimization of industrial production of rifamycin B by Amycolatopsis mediterranei. IV. Production in the fermentor. AJB.* 2004; 3(9): 432-440.

14- Iglewski WJ. *production of antibiotic by organism from human feces.* Antimicrob. Agent chemother.11:1084-1086.

15- Iglewski WJ, Gerhardet NB. *Identification of an antibiotic-producing bacterium from the human intestinal tract and characterization of its antimicrobial product*. American society for microbiology.1977; 13(1): 81-89

16- Ajay K, Pragati S, Shirvastava JS. *Production of peptide antifungal antibiotics and biocontrol activity of Bacillus subtilis.* Indian journal of Experimental Biology. 2009; (47): 57-62.

17-Korenblum E. *Production of antimicrobial substances by bacillus subtilis LFE-1, B.firmus H_2O-1 and B.lichniformis Isolated from an oil reservoir in Brazil. journal of applied microbiology.* 2005;98:667-675.

18- Balbina A J, Herbert A, Frank LM. *Bacitracin: A new antibiotic produced by a member of the B. Subtilis group.*Science.1945; 102:376-377.

19- Mário LT. Florencia CO, Juliana DS, Adriano B. *Purification and Characterization of a peptide from Bacillus lichniformis showing dual antimicrobial and emulsifying activity*. Food Research International. 2009; 42:63-68.

20- Jackson WFH. *Bacillin, A New antibiotic substance from a soil isolate of Bacillus subtilis* .1964;51(3):363-369.

21- Demain AL, Fang A. *The natural function of secondary metabolites*. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2000;69:1-3.

www.SID.ir