Archive of SID

بررسی تولید مواد فعال زیستی از لحاظ بیولوژیک (Bioactive Compounds) در باکتری‌های ایزوله شده از آب‌های ساحلی دریاچه کاسپین

سامره جوانبخت یوسفی*[۱]، محمد فائزی قاسمی[۲]، نور امیر مظفری[۳]

۱* و۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۳- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی ایران، گروه میکروبشناسی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۱۸۳-۱۴۱۵۵

samerejavanbakht@yahoo.com

چکیده

هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی باکتری‌های قادر به تولید مواد فعال زیستی با خاصیت آنتی باکتریال از آب‌های ساحلی دریاچه کاسپین بوده است. در این بررسی ابتدا نمونه‌های آبی از آب‌های ساحلی دریاچه کاسپین در ۲۹ منطقه در خط ساحلی استان گیلان جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت. پس از کشت و خالص‌سازی باکتری‌ها، از نظرتولید مواد فعال زیستی با خاصیت آنتی باکتریال به روش Agar Well Diffusion در برابر ۱۰ سویه پاتوژن استاندارد مورد آزمایش قرار گرفتند. در مرحله بعدی باکتری‌هایی که توانایی تولید مواد فعال زیستی با خاصیت آنتی باکتریال را داشتند مورد شناسایی بیوشیمیایی بر اساس جداول استاندارد مندرج در کتاب Bergy´s Manual of Systematic Bacteriology قرار گرفتند. همچنین سکانس ژنی 16Sr RNA در موارد لازم انجام شد. فعالیت همولیتیکی این ترکیبات بررسی گردید و توانایی مهار رشد پاتوژن‌ها توسط این ترکیبات با ۹ آنتی‌بیوتیک متداول مقایسه شد. از مجموع ۱۰۸ باکتری جداسازی شده ۱۲ باکتری فعالیت آنتی‌باکتریال را حداقل در ۴ مورد از ۱۰ مورد پاتوژن بررسی شده نشان دادند. بر اساس شناسایی بیوشیمیایی بیشتر این باکتری‌ها از جنس‌های باسیلوس و سودوموناس گزارش شد. سکانس ژنی 16S rRNA در سه مورد انجام پذیرفت و نشان داد که سویه‌های فوق الذکر با ۱۰۰٪ قرابت ژنتیکی *Bcillus cereus*، ۹۹/۷٪ قرابت ژنتیکی *Exiguobacterium acetylicum* strain DSM 20416 و ۹۹/۷٪ قرابت ژنتیکی *Alcaligenes faecalis* می‌باشند. بیشترین فعالیت آنتی‌باکتریال در سویه *Pseudomonas aeroginosa* مشاهده گردید که در هر ۱۰ مورد پاتوژن بررسی شده مثبت بوده است و نسبت به ۹ آنتی بیوتیک بررسی شده فعالیت بیشتر و وسیع‌الطیف‌تری نشان داده است.

کلمات کلیدی: دریاچه کاسپین، مواد فعال زیستی، فعالیت آنتی‌باکتریال، سکانس ژنی 16Sr RNA.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

مواد فعال زیستی «Bioactive compouds» واژه‌ای است که معمولاً به متابولیت‌های ثانویه تولید شده به وسیله ارگانیسم‌ها تعلق می‌گیرد، که اغلب در رشد و زنده ماندن ارگانیسم‌ها ضروری نبوده و برخلاف متابولیت‌های اولیه و ماکروملکول‌های حیاتی، پایه و اساس پروسه‌های اولیه ارگانیسم زنده نبوده و دارای نقشی حیاتی نمی‌باشند. به طور کلی متابولیت‌های ثانویه در باکتری‌ها در نتیجه شرایط خاص همانند محدودیت منابع غذایی، در طی دورهٔ ایدیوفاز از زندگی ارگانیسم تولید می‌شوند و اغلب این ترکیبات از آن‌ها در شرایط خاص محیطی (همانند رقابت در اکوسیستم) حمایت می‌کند. متقاعدکننده‌ترین تئوری در زمینه تولید متابولیت‌های ثانویه به وسیله Zahner عنوان شد، وی متابولیت‌های ثانویه را ترکیبات تکاملی نامید، اگر یک متابولیت هیچ تأثیری در هیچ مرحله‌ای از تمایزات یک ارگانیسم (مورفوژنز، حرکت، تنظیم و...) نداشته باشد و به اهداف خاصی در ارگانیسم‌ها تولید شود متابولیت ثانویه نامیده می‌شود، بسیاری از این ترکیبات در گونه‌های خاصی از ارگانیسم‌ها دارای عملکرد Antifeedant، جاذب‌های جنسی، عوامل آنتی‌بیوتیکی و غیره هستند (۸ و۱۳).

دریاها با خط ساحلی ۳۱۲۰۰۰ کیلومتر (۱۹۳۰۰۰ مایل) و حجم ۱۳۷×۱۰^{۶} کیلومتر مکعب بزرگترین اکوسیستم زمین بشمار می‌روند، جداسازی مواد فعال زیستی از باکتری‌های آزاد جدا شده از آب‌های ساحلی تا اعماق دریاها و همچنین از باکتری‌های همزیست با اسفنج‌ها، جلبک‌ها و نرمتنان دریایی در دو دهه اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است. بررسی‌ها نشان داده که میکروارگانیسم‌های دریایی دارای پتانسیل بالایی در تولید مواد فعال زیستی هستند که می‌توانند برای مقاصد مختلفی مورد استفاده قرار گیرند. از آن جمله می‌توان به جداسازی ترکیبات دارویی اشاره کرد که تعدادی از این ترکیبات امروزه در مقیاس تجاری بکار می‌روند (۴).

اولین گزارش دربارهٔ تولید مواد فعال زیستی از باکتری‌های دریایی توسط Zobell و Rosenfeld در زمینه تولید آنتی‌بیوتیک‌ها صورت گرفت. بعد از آن گزارش‌های متعددی در این زمینه بدست آمده است. تا به امروز ۱۶۰۰۰ ترکیب زیستی از میکروارگانیسم‌های دریایی جداسازی شده است، از آن جمله می‌توان به ترکیبات آنتی‌باکتریال، آنتی‌ویرال و آنتی‌تومور اشاره کرد (۳و۹).

از نمونه‌های ترکیبات جدا شده از باکتری‌های دریایی که فعالیت آنتی‌باکتریال نشان داده‌اند می‌توان به ترکیب Ichtyotoxic جدا شده از *Pseudomonas piscicida* اشاره کرد، که فعالیت آنتاگونیسمی مشخصی را در برابر میکروارگانیسم‌های پاتوژن مختلفی نشان داده است. یک باکتریوم قرمز در منطقه Puerto Rico شناخته شده که از آن Vitamin B و مواد آنتی‌باکتریال متعددی جدا شده است. یک قارچ دریایی بنام *Cephalosporium acremonium* از دریا در نزدیکی منطقه باتلاقی در ساحل Sardina جدا شده است که تعداد زیادی ترکیبات آنتی‌باکتریال تولید می‌کند. جلبک‌های سبز، قرمز و قهوه‌ای از لحاظ فعالیت ضد قارچی و ضد باکتریایی مورد آنالیز واقع شده‌اند، از آن جمله *Symphyocladia gracilis* و *Rhodomela larix* ترکیباتی با فعالیت ضد جلبکی تولید می‌کنند که به نظر می‌رسد این ترکیبات

www.SID.ir

Archive of SID

نقش مهمی در تنظیمEpiphyteها و Endophyteها داشته باشند.

از ترکیبات آنتی تومور شناخته شده نیز می‌توان به Curacin A جداسازی شده از یک *Cyanobacterium* دریایی اشاره کرد (۱).

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: از ۲۹ منطقه ساحلی دریاچه کاسپین در خط ساحلی استان گیلان در فاصله ۱۰ تا ۱۵ کیلومتری از هم، نمونه‌ها از آب‌های سطحی در ۱۰ متری ساحل درون ظروف استریل جمع‌آوری گردید و به آزمایشگاه منتقل شد.

بررسی نمونه‌های آب دریا به منظور جداسازی باکتری‌های دریایی

نمونه‌ها به دو روش تلقیح مستقیم و تلقیح پس از سانتریفیوژ به محیط نوترینت براث (حاوی ٪۱۰ آب دریای استریل به منظور مشابه‌سازی محیط کشت با اکوسیستم طبیعی) تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت در۳۰ درجه سلسیوس درون انکوباتور شیکردار (به منظور هوادهی بیشتر) انکوبه گردیدند. سپس نمونه‌ها به محیط نوترینت آگار (حاوی ٪۱۰ آب دریای استریل) منتقل و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از دوره انکوباسیون کلنی‌ها بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و رنگ‌آمیزی گرم جداسازی و به محیط‌های جدید منتقل شدند، این کار به منظور خالص‌سازی بیشتر نمونه‌ها چندین بار تکرار گردید.

بررسی تولید مواد فعال زیستی با خاصیت آنتی‌باکتریال در باکتری‌های جداشده

به این منظور نمونه‌ها به روش Agar Well Diffusion Assay مورد بررسی قرار گرفتند.

ابتدا چاهک‌ها به قطر ۵mm و ارتفاع ۴mm در پلیت‌های حاوی محیط مولر هینتون آگار ساخته شدند. به منظور بررسی تولید خارج سلولی متابولیت‌های ثانویه با خاصیت آنتی‌باکتریال، کشت براث ۴۸ ساعته تهیه شده از باکتری‌های ایزوله شده از آب‌های ساحلی دریاچه خزر به مدت ۲۰ دقیقه در ۶۰۰۰ rpm به منظور ته نشین کردن سلول‌ها سانتریفیوژ و سوپر ناتانت محیط کشت که حاوی ترکیبات مذکور می‌باشند برای تلقیح در چاهک‌ها جداسازی شدند.

به منظور تهیه سوسپانسیون باکتریایی از سویه‌های پاتوژن استاندارد، ۳ تا ۴ کلنی باکتری از کشت تازه سویه‌های پاتوژن به محیط نوترینت براث تلقیح و به مدت ۲۰-۳۰ دقیقه تا رسیدن کدورت به ۰/۵ مک فارلند در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. سویه‌های پاتوژن استاندارد مورد استفاده همگی از مرکز کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های عفونی کشور تهیه شدند، این سویه‌ها شامل:

Salmonella typhi PTCC1533
Shigella flexneri PTCC1234
Staphylococcus aureus PTCC1112
Pseudomonas aeroginosa PTCC1466
Escherichia coli PTCC1533
Shigella dysenteriae PTCC1188
Entrococcus fecalis PTCC 1239
Proteus vulgaris OX2 strain PTCC1312
Streptococcus pyrogenesis PTCC 1447
Bacillus cereus PTCC 1565

از محیط کشت پاتوژن‌ها توسط سواپ بر سطح پلیت‌های مولر هینتون آگار کشت داده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

سپس از سوپر ناتانت کشت نمونه‌های جدا شده به میزان ۲۰ تا ۳۰ میکرولیتر توسط سمپلر درون چاهک‌ها تزریق گردید، سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از دوره انکوباسیون پلیت‌ها بررسی گردید و هاله عدم رشد مشاهده شده در برخی پلیت‌ها بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌ها ایزوله شده از آب‌های ساحلی دریاچه خزر با توانایی تولید مواد آنتی‌باکتریال

به منظور شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌های ایزوله شده آن‌ها در چهار دسته باسیل‌های گرم مثبت، باسیل‌های گرم منفی، کوکسی‌های گرم مثبت و کوکسی گرم منفی بر اساس جداول استاندارد مندرج در کتاب Bergys Manual of Systematic Bacteriology مورد آزمایش قرار گرفتند.

بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ۱۰ سویه پاتوژن استاندارد به ۹ آنتی‌بیوتیک متداول به روش disc diffusion assay انجام پذیرفت، این امر به منظور مقایسه فعالیت بازدارندگی مشاهده شده در متابولیت‌های آنتی‌باکتریال تولید شده توسط باکتری ایزوله شده با برخی آنتی‌بیوتیک‌های رایج انجام شد. ابتدا از کشت براث سویه‌های پاتوژن در محیط مولر هینتون آگار توسط سوآپ پنبه‌ای کشت داده شد، سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی بر سطح محیط گذاشته شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند و پس از زمان انکوباسیون پلیت‌ها بررسی گردید و هاله‌های عدم رشد مشاهده شده اندازه‌گیری شد.

بررسی فعالیت همولیتیک ترکیبات ایزوله شده با خاصیت آنتی‌باکتریال

به این منظور ترکیبات ایزوله شده به روش agar diffusion technique مورد بررسی واقع شدند.

ابتدا کشت براث ۴۸ ساعته تهیه شده از باکتری‌ها به منظور ته نشین کردن سلول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید سپس به میزان یک میکرولیتر از سوپرناتانت جدا شده در سطح پلیت‌های حاوی محیط کشت بلاد آگار ریخته شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شدند. پس از زمان انکوباسیون پلیت‌ها بررسی گردید و مناطق همولیز در واحد میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

بررسی تعیین توالی ژن 16Sr RNA

به این منظور مراحل زیر انجام پذیرفت:

۱- استخراج DNA

۲- واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR

۳- الکتروفور محصول PCR

۴- خالص‌سازی محصول PCR

۵- تعیین توالی قطعات تکثیر شده ژن 16Sr RNA

DNA باکتری با استفاده از کیت (شرکت Qiagen) استخراج گردید

ابتدا چند کلنی از کشت تازه باکتری در محیط کشت LB broth تلقیح گردید و به مدت ۱۰ ساعت در ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شد، سپس ۱ میلی‌لیتر از کشت به یک میکروتیوپ منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰۰۰ دور به منظور ته نشین کردن سلول‌ها سانتریفیوژ گردید، سپس سوپر ناتانت رویی دور ریخته شد و به سلول‌های ته نشین شده، Lysis buffer، Proteinase K و SDS اضافه گردید و به مدت ۲

www.SID.ir

Archive of SID

ساعت در ۵۶ درجه سلسیوس انکوبه شد سپس نمونه به میکروتیوپ‌های فیلتردار کیت منتقل و بر اساس دستورالعمل کیت توسط wash buffer1 و wash buffer2 شستشو داده شد (به این منظور پس از افزودن بافرها میکروتیوپ به مدت ۱ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید و در هر بار collection tube تعویض گردید). در انتها توسط Elution buffer شستشو (سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱ دقیقه) DNA وارد فاز آبی شد و در collection tube وارد گردید و به عنوان DNA استخراج شده مورد PCR واقع شد. برای انجام واکنش PCR طبق جدول ۱ مواد در یک میکروتیوپ افزوده شد.

جدول ۱: مواد مورد استفاده جهت انجام واکنش PCR در هر میکروتیوپ

Volume (µl)	Reagents
۱۰	10X incubation buffer
۲۰	dNTPs (1mM)
۱	27f primer (0.5µg/ µl)
۱	1541rprimer (0.5µg/ µl)
٦٦/٦	H20
۱	Extracted DNA
۹۹/٦	Total Volume

تمام مواد از شرکت سینا ژن خریداری شد.

پرایمرهای مورد استفاده عبارت بودند از:

27f: 5'- GAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'
1541r: 5'- AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'

برنامه اجرا شده برای تکثیر قطعه مورد نظر DNA به شرح زیر بوده است:

۱. ۹۲ درجه سلسیوس ۱ دقیقه(Denaturation)
۲. ۵۲ درجه سلسیوس ۱ دقیقه(Annealing)
۳. ۷۲ درجه سلسیوس ۱ دقیقه(Elongation) برای ۳۰ سیکل
۴. در پایان ۱۰ دقیقه، ۷۲ درجه سلسیوس به منظور Final Elongation.

الکتروفورز محصول PCR

۱. آماده سازی ژل آگارز(پودر آگارز+ TAE بافر)
۲. افزودن اتیدیوم برماید
۳. آماده سازی قالب ژل و افزودن ژل درون قالب
۴. انتقال ژل به تانک حاوی TAE بافر پس از بستن ژل
۵. مخلوط کردن محصول PCR با Loading buffer و انتقال به چاهک درون ژل
۶. اتصال قطب ها و تنظیم ولتاژ

خالص‌سازی محصول PCR با کمک کیت Qiaquick PCR Purification انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

تعیین توالی قطعات تکثیر شده ژن 16Sr RNA

محصولات خالص واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای زیر و از هر دو طرف با روش اتومات سنجر بر اساس روش دی‌دئوکسی‌نوکلئوتیدهای فلورسانت تعیین توالی شدند (Genetic Analyzer 313XL, ABI, America)

16R339: 5’- ACTGCTGCCTCCCGTAGGAG -3’

16F358: 5’- CTCCTACGGGAGGCAGCAGT -3’

704f: 5’- GTAGCGGTGAAATGCGTAGA- 3'

نتایج

جداسازی باکتری‌ها با توانایی تولید مواد آنتی‌باکتریال

از ۲۹ نمونه آب بررسی شده ۱۰۸ باکتری بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و رنگ‌آمیزی گرم جداسازی شد که مورد بررسی agar well diffusion assay به منظور سنجش توانایی تولید مواد فعال زیستی با خاصیت آنتی‌باکتریال قرار گرفت، در این بررسی ۱۲ باکتری با توانایی تولید ترکیبات آنتی‌باکتریال شناسایی شد که حداقل در ۴ مورد از ۱۰ مورد پاتوژن بررسی شده باعث مهار رشد پاتوژن‌ها شده است (جدول ۲)(شکل ۱).

شکل ۱: نمونه‌هایی از ترکیبات ایزوله شده با توانایی مهار رشد پاتوژن‌ها از تولیدات خارج سلولی باکتری‌های تحت بررسی

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: فعالیت آنتی‌باکتریال مشاهده شده در ترکیبات ایزوله شده از باکتری‌های جدا شده از آب‌های ساحلی دریاچه کاسپین

Bacillus cereus	Streptococcus pyrogensis	Proteus Vulgarisox$_2$ strain	Entrococcus fecalis	Shigella dysentriae	Escherichia coli	Pseudomonas aeroginosa	Staphylococcus	Shigella flexneri	Salmonella typhi	Standard pathogen strains / Isolated com pounds
-	-	۷	۱۴	۱۱	۱۰	-	۹	-	۱۰	V/۱
-	-	۸	۸	۱۴	۹	-	۱۰	-	-	V/۲
۹	۹	۷	۱۲	۹	۸	۸	۱۸	۱۳	۲۲	AA/۳
-	-	۹	۱۲	۸	۹	-	۸	۸	۹	A/۴
-	+	-	۹	۱۴	۱۳	-	۱۰	۱۰	۸	A/۵
-	۹	-	-	۱۵	۹	-	۱۶	۱۴	۱۰	A/۶
-	-	-	۱۱	۹	۱۱	-	۱۲	-	-	A/۷
-	-	-	-	-	۹	-	۹	۲۱	۱۰	A/۸
-	-	-	-	-	۹	-	۱۱	۱۵	۱۳	A/۹
+	-	-	۸	۱۰	۹	-	۹	-	-	G/۱۰
۹	۱۸	۹	۱۱	۱۳	۱۵	۱۳	۱۶	۱۴	۱۹	I/۱۱
۷	۱۳	۸	۱۴	۱۴	۱۷	۱۳	۹	۱۲	۲۱	I/۱۲

جدول۳: نتایج بررسی فعالیت همولیتیک ترکیبات جدا شده از ۱۲ باکتری ایزوله شده از دریاچه خزر

با توانایی تولید مواد آنتی باکتریال

Hemolytic activity	Compounds No.	Hemolytic activity	Compounds No.
_	A/۷	-	V/۱
_	A/۸	-	V/۲
_	A/۹	۱۳	AA/۳
۹	G/۱۰	۹	A/٤
۱۱	I/۱۱	۸	A/٥
۱۲	I/۱۲	-	A/٦

♦ اعداد نمایانگر منطقه همولیز بر حسب میلی‌متر می‌باشد

نتایج فعالیت آنتی‌باکتریال ۹ آنتی بیوتیک رایج بر علیه ۱۰ سویه پاتوژن استاندارد مورد استفاده در این تحقیق

در جدول ۴ فعالیت آنتی‌باکتریال ۹ آنتی بیوتیک متداول بر علیه ۱۰ سویه پاتوژن استاندارد که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفته بودند توسط روش disk diffusion assay صورت گرفت و هاله‌های عدم رشد همانند قبل بر واحد میلی‌متر اندازه‌گیری شد (جدول ۴).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴: بررسی توانایی مهار رشد ده سویه پاتوژن تحت بررسی توسط ۹ آنتی بیوتیک متداول

S.typhi	B.cereus	P.vulgaris	S.pyogenes	E.fecalis	S.dysentria	P.aero ginosa	S.flexneri	S.aureus	E.coli	pathogen strains / Antibiotics
۲۱	۲۱	۱۶	۲۳	۱۶	۱۰	_	_	۱۹	۱۶	Gentamycin GM 10
۱۵	۱۸	_	۲۱	۱۸	۱۳	_	۱۳	_	۱۶	Nitrofurantoin FM 300
۱۵	۸	_	۹	۱۲	۱٤	_	_	۱۳	۱۰	Vancomycin V30
_	۱۷	۱۲	۲۱	۱۹	۱۳	_	_	۲٦	۸	Cephalexin CN 30
_	٦	_	۲۳	_	_	_	_	۳۲	_	Rifampicin RA5
_	۳۲	۳	۲۸	۲۱	_	_	_	۲۰	_	Trimethroprim sulfamethoxazo 1 SXT
۱٦	۲۳	۱۱	۱۷	۲۰	۱٤	_	۱٦	_	۱٦	Tetracycline TE30
۲۰	۱۸	_	۱۳	۲۰	۱۸	_	۱۳	_	۲۳	Erythromycin E15
۱۸	۱۹	۲٤	۱۲	۲۰	۱۹	_	۱۷	_	۱۸	Nalidixic acid NA30

جدول ۵: نتایج تست‌های بیوشیمیایی انجام شده در باسیل‌های گرم مثبت

G/۱۰	A/۷	A/۵	A/۴	V/۲	V/۱	Characteristics
+	+	-	-	+	+	Cell diameter >1.0 µ
-	-	-	-	-	-	Spore round
-	-	-	-	-	-	Sporangium swollen
-	-	-	-	-	-	Parasporal crystals
+	+	+	+	+	+	Catalase
+	+	-	-	+	+	Anaerobic growth
-	+	+	+	+	+	Voges- Proskauer
+ -	+ -	- -	- -	+ -	+ -	pH in V-P broth < 6 > 7
+ - - -	+ - - -	+ + + +	+ + + +	+ - - -	+ - - -	Acid from D- Glucose L- Arabinose D-Xylose D-Mannitol
+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	Hydrolysis of Casein Gelatin Starch
-	+	+	+	+	+	Utilization of Citrate

www.SID.ir

Archive of SID

ادامه جدول ۵						
+	+	+	+	+	+	Nitrate reduced to nitrite
-	-	-	-	-	-	Indole
+	+	-	-	+	+	Hemolysis
+	+	+	+	+	+	Growth at pH 6.8
+	+	+	+	+	+	Growth at pH 5.7
+	+	+	+	+	+	Motility (SIM)
-	+	-	-	+	+	Egg-yolk Lecithinase
+	-	-	-	-	-	Deamination of Phenylalanine
+ + - -	+ + - -	+ + + (+)	+ + + (+)	+ + - -	+ + - -	Growth in NaCl 2% 5% 7% 10%
- - + + +	- - + + +	- - + + +	- - + + +	- - + + -	- - + + -	Growth at 5°C 10°C 30°C 40°C 50°C

جدول ۶: نتایج تست‌های بیوشیمیایی انجام شده در باسیل‌های گرم منفی

I/۱۲	I/۱۱	AA/۳	Test
+	+	+	Catalase
+	+	+	Oxidase
-	+	+	Growth on McConkey agar
Alk/Alk	Alk/Alk	Alk/Alk	KIA
Oxidative	Oxidative	Oxidative	OF
-	-	-	SH2 (lead actate)
+	+	+	Indole
+	+	+	Motility
+	+	+	Argenine dihydrolase
+	+	+	Pyocyanin production
+	+	+	Pyoverdin production
+	+	+	Gelatine hydrolysis
-	-	-	Growth at 4°C
+	+	+	Growth at 41°C
-	-	-	Starch hydrolysis
+	+	+	Denitrification

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۷: نتایج تست‌های بیوشیمیایی انجام شده در کوکسی‌های گرم مثبت

۰۹	۰۸	Result / Test
+	+	Oxidase
+	+	Catalase
Inert (-/-)	Inert (-/-)	OF
-	-	Nitrate reduction
-/+	-/+	MR/VP
+	+	Motility
+	+	ONPG
-	-	SH2 (SIM)
-	-	Indole (SIM)
		Grwoth at
–	–	$^{\circ}C$ ۵
+	+	$^{\circ}C$ ۱۰
+	+	$^{\circ}C$ ۲۰
+	+	$^{\circ}C$ ۳۰
+	+	$^{\circ}C$ ۳۷
+	+	$^{\circ}C$ ٤۵
–	–	$^{\circ}C$ ۵۰
+	+	Anaerobic growth
+	+	DNase
+	+	Gelatin hydrolysis
+	+	Starch hydrolysis
+	+	Gelatin hydrolysis
+	+	Casein hydrolysis
-	-	Urea hydrolysis
-	-	Citrate
		Growth in NaCl
+	+	٪۲
+ (48h)	+ (48h)	٪۵
–	–	٪۱۰

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۸: نتایج تست‌های بیوشیمیایی در کوکسی گرم منفی

Result	Test	Result	Test
-	Esculine hydrolysis	+	Catalase
-	Mannitol (OF)	+	Oxidase
-	Sucrose (OF)	+	Growth on Mc Conkey agar
+	Citrate	Alk/Nc	KIA
+	$^{\circ}C$ Growth at 42	Inert (-/-)	OF
-/-	MR/VP	-	SH2 (SIM)
		-	Indole (SIM)
		+	Motility
		-	Argenine dihydrolase
		-	Gelatin hydrolysis (28$^{\circ}C$)
		-	Gelatin hydrolysis (37$^{\circ}C$)
		-	Nitrate reduced to nitrite
		-	Urea hydrolysis

جدول ۹: نتایج شناسایی باکتری‌های تولید کننده مواد آنتی‌باکتریال، ایزوله شده از آب‌های ساحلی دریاچه کاسپین

Recognized Strain or Jenus	Bacteria NO.
Bacillus cereus	V/۱
Bacillus cereus	V/۲
Pseudomonas aeroginosa	AA/۳
Bacillus subtilis	A/٤
Bacillus subtilis	A/٥
*Alcaligenes faecalis**	A/٦
Bacillus cereus	A/۷
Exiguobacterium acetylicum Strain DSM 20416*	A/۸
Exiguobacterium acetylicum Strain DSM 20416*	A/۹
*Bacillus cereus**	G/۱۰
Pseudomonas aeroginosa	I/۱۱
Pseudomonas aeroginosa	I/۱۲

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج تعیین توالی ژن 16Sr RNA در باکتری G/10:

پس از استخراج ژنوم، مراحل PCR و خالص‌سازی محصول PCR، در الکتروفورز محصول تنها یک باند دیده شد که در مقایسه با مارکر حاوی حدود ۱۵۰۰ نوکلئوتید باز بوده است.

پس از انجام تعیین توالی محصول خالص شده، نتایج سکانس به شرح زیر بوده است مقایسه توالی بدست آمده در نمونه A/6 با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی موجود در Genbank از نرم‌افزار Blast استفاده شد. این مقایسه نشان داد که میزان مشابهت بین توالی ژن 16S rRNA مربوطه و باکتری *Alcaligenes faecalis* ۹۹۷٪ می‌باشد.

مقایسه توالی بدست آمده در نمونه A/8 با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی موجود در Genbank از نرم‌افزار Blast استفاده شد. این مقایسه نشان داد که میزان مشابهت بین توالی ژن 16S rRNA مربوطه و باکتری *Exiguobacterium acetylicum* strain DSM 2016 ۹۹۷٪ می‌باشد.

پس از انجام تعیین توالی محصول خالص شده، نتایج سکانس شامل ۱۴۹۵ نوکلئوتید گزارش شد. به منظور مقایسه توالی بدست آمده با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی موجود در Genbank از نرم‌افزار Blast استفاده شد. این مقایسه نشان داد که میزان مشابهت بین توالی ژن 16S rRNA مربوط به سویه ۱۰ و باکتری *Bacillus cereus* ۱۰۰٪ می‌باشد.

بحث

در این تحقیق به منظور یافتن ترکیبات آنتی‌باکتریال، باکتری‌های ایزوله شده از آب‌های ساحلی دریاچه خزر مورد بررسی قرار گرفتند، دریاچه خزر به عنوان بزرگترین دریاچه جهان ریزشگاه رودخانه‌های متعددی می‌باشد و بیش از ۳۵۰ رودخانه کوچک و بزرگ تنها از خاک ایران به این دریاچه می‌ریزند، به عبارتی این سواحل مناطقی هستند که آب شیرین و آب شور با یکدیگر مخلوط می‌گردند و یک شوری حد واسط حاصل می‌گردد که اکوسیستم مناسبی برای رشد انواع مختلفی میکروارگانیسم‌ها می‌باشد.

Manmadhan و همکاران (۶)، ۱۶۰ باکتری ایزوله شده از سطوح ۹ سویه جلبک قهوه‌ای که از سواحل جزیره Awaji در ژاپن جدا کردند را مورد بررسی قرار دادند. ۱۰ سویه با توانایی تولید مواد آنتی‌باکتریال جداسازی نمودند که این باکتری‌ها قرابت ژنتیکی زیادی به جنس Bacillus داشتند و از جمله سویه‌های شناسایی شده *B.cereus*، *B.Clausii*، *B.pumilus*، *B.subtilis* بوده‌اند.

همچنین Nuzhat Ahmed و همکاران (۷) پتانسیل تولید مواد زیستی با خاصیت آنتی‌باکتریال را در باکتری‌های آزاد جدا شده از دریای عرب در سواحل پاکستان بررسی کردند و در ۶ سویه فعالیت آنتی‌باکتریال را بر علیه باکتری‌های کلینیکال گزارش کردند. سکانس ژنی 16Sr RNA نشان داد که این باکتری‌ها از سویه‌هایی از *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Bervibacterium* می‌باشند.

علاوه بر آن باکتری‌هایی از آب‌های دریایی، رسوبات، نرمتنان و جلبک‌ها در مناطق مختلفی از سواحل دریای چین جداسازی گردیدند و فعالیت آنتی میکروبیال این باکتری‌ها نشان داد، از ۳۴۱ باکتری ایزوله شده ۴۱ سویه حداقل بر علیه یک سویه پاتوژن

www.SID.ir

Archive of SID

انسانی فعالیت ضد میکروبی دارند. مطالعات تاکسونومیک نشان داد که این باکتری‌ها به جنس‌های *Alteromonas* (۲۰ سویه)، *Pseudomonas* (۱۰ سویه)، *Bacillus* (۸ سویه) و *Flavobacterium* (۴ سویه) تعلق دارند.

در این بررسی بیشترین فعالیت آنتی‌باکتریال در سویه *Pseudomonas aeroginosa* مشاهده شد، که باعث مهار رشد هر ۱۰ مورد پاتوژن تحت بررسی گردید. همچنین در مقایسه با ۹ آنتی‌بیوتیک تست شده در مهار پاتوژن‌های انسانی نیز فعالیت بهتر و گسترده‌تری را نشان داده است (۵).

در سال‌های اخیر توجه زیادی به جنس‌های سودوموناس در زمینه تولید مواد فعال زیستی صورت گرفته است از آن جمله می‌توان به جداسازی متابولیت‌های ثانویه از قبیل Sidrophores، antibiotics ، compounds HCN، enzymes و phytohormons از جنس *Pseudomonads* توسط Isnansetyo و Kamei در سال ۲۰۰۹ اشاره کرد (۴).

Charryulu و همکاران (۳) فعالیت ضد میکروبی متابولیت‌های ثانویه را در *Pseudomonas sp.* جدا شده از مناطق ساحلی Chennai در هند مورد بررسی قرار دادند و فعالیت آنتی‌میکروبیال وسیع‌الطیفی بر علیه پاتوژن‌های گرم مثبت و گرم منفی گزارش کردند (۳).

همان‌گونه که در بخش نتایج عنوان شد، در این تحقیق ۶ مورد از ۱۲ مورد فعالیت آنتی‌باکتریال گزارش شده متعلق به سویه‌های *Bacillus cereus* و *Bacills subtilis* بوده‌اند.

بررسی تولید مواد فعال زیستی در *Bacillus cereus* در زمینه تولید مواد دارویی آنتی باکتریال در چندین کار تحقیقاتی صورت گرفته که اغلب با موفقیت همراه بوده است.

Bacillus cereus UW85 دو آنتی بیوتیک تولید می‌کند که توانایی مهار بیماری در گیاهان را دارد که این ترکیبات توسط Silo-Suh و همکاران در سال ۱۹۹۴ شناخته شد (۱۰).

Tabennaو همکاران (۱۲) از سوپر ناتانت کشت *Bacillus subtilis* ایزوله شده از خاک ترکیبی را جداسازی نمودند که دارای فعالیت ضد میکروبی وسیعی برعلیه پاتوژن‌های انسانی و همچنین فعالیت ضد قارچی بر علیه قارچ‌های بیماریزای گیاهان بوده است.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مدیر گروه محترم کارشناسی ارشد میکروبیولوژی جناب آقای دکتر مهدی آسمار و همکاری‌های صمیمانه سرکار خانم کتایون داستان کارشناس ارشد آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان کمال تشکر و سپاسگزاری را داریم.

منابع

1. Bhakuni, D.S. and Rawat, D.S., 2005. Bioactive Marine Natural Products. Co-published by Springer, pp 1-37.
2. Burgess, J.G.; Jordan, E.M. and Bergu, M., 1999. Mearns – Spragg, A. and Boyd, K. G., Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. Journal of. Biotechnol, pp: 27 – 32.

www.SID.ir

Archive of SID

3. Charyulu, E.M.; Sekaran, G.; Rajakumar, G.S. and Gnanamani, A., 2009. Antimicrobial activity of secondary metabolite from marine asolate, *Pseudomonas sp*. against Gram positive and negative bacteria including MRSA. Indian Journal of Expermental Biologi VOL. 47,pp 964-968.
4. Isnansetyo, A., and Kamei, Y., 2009. Bioactive substances produced by marine isolates of *Pseudomonas*. J. Industrial Microbiologi and Biotechnologi.VOL.36. pp 1239-1248.
5. Karna, R.O. and Agus, S. 2003. Screening of Secondany metabolite – producing bacteria associated with corals using 16S rDNA – based approach, Journal of coastal Development Vol 1, NO.1, pp 11-19.
6. Manmahdan, K., Hideak, S., Soumya, H., Shinji, Y. and Shinichi, N. 2003. Antibacterial activities of Marine epibiotic bacteria isolated from brown algae of japan, PP.5-12.
7. Nuzhat, A., Bushra, U., Sana, A., Phil, M., Vigar, A., 2008. Antibacterial activity of marine bacteria from Arabian Sea of Pakistan. TheInternet Journal of Microbiology ISSN: 1937-8289, pp 4-9.
8. Richard, J.P. and Cannell., 1998. How to Approach the Isolation of a Natural Product. In: Cannell R.J.P., Ed., Natural Products Isolation. Totowa, Humana Press, New Jersy, pp. 1-14.
9. Rosenfeld, W.D. and Zobell, C.E., 1947. Antibiotic production by marine microorganisms. Journal of .Bacteriol, (154),pp 393 – 398.
10. Silo Suh, L.; Lethbridge, B.; Raffel, S.J.; He, H.; Clardy, J. and Handelsman, J., 1994. Appl. Environ. Microbiol 60: 2023-2030.
11. Surajit, D., Lyla. P.S. and Ajmalkhan. S., 2006. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. Journal of Current Science , VOL. 90 , No.10, pp10-57.
12. Tabbena, O., Slimena, I,B., Bouabdallah, F., Mangoni, M., Urdaci, M. and Limam, F., 2008.Production of Anti-Methicillin-Resistant *Staphylococcus* Activity from Bacillus subtilis sp. Strain B18 Newly Isolated from Soil. J. Applied Biochemistry and Biotechnology. VOL. 157, pp 407-419.
13. Zahner, H.; Drautz, H. and Weber, W., 1982. Novel approaches to metabolite Screening, In Bioactive Secondary Metabolites. Search and Discovery (Bu'Lock, J.D., Nisbet, L.J., Winstanley, DJ. Esd.), Academic, London, pp 51-70.

www.SID.ir