

## 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 Metabolites

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

## بررسی مولکولی و فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های جداسازی شده از دریای خزر

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

گروه میکروبی شناسی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: میکروارگانیسم‌های آبی 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 روش‌ها: نمونه‌ها در فصل پاییز و از غرب دریای خزر جمع‌آوری شدند، نمونه‌های جداسازی شده 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 پلیمرز انجام شد. سویه‌های جداسازی شده با استفاده از تکنیک مولکولی PCR sequencing ۱۶srDNA شناسایی و به عنوان سویه‌های جدید آبی در پایگاه بانک اطلاعات ژنی ثبت شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد سویه‌های دارای خاصیت ضد میکروبی اثر قابل توجهی 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 می‌باشند.

نتیجه‌گیری: می‌توان از توانایی این باکتری‌های آبی 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 پلیمرز، آنالیز توالی، باسیلوس

### تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۰۱

پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۱۳

انتشار آنلاین: ۱۳۹۴/۱۲/۲۱

### موضوع:

متابولیت‌های ضد میکروبی

IJMM 1395; 10(1): 16-23

### نویسنده مسئول:

سجاد هارون آبادی

گروه میکروبی شناسی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران

تلفن: ۰۹۱۲۵۲۷۵۰۵۳

### پست الکترونیک:

s.harounabadi@gmail.com

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

### مقدمه

۱۹۵۰ تاکنون تعداد زیادی از ترکیبات طبیعی با ساختارهای متنوع و فعالیت‌های خیره‌کننده از ارگانیسم‌های آبی کشف و جداسازی شده است (۴). تعداد ترکیبات جداسازی شده از باکتری‌های آبی 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 شناسایی شده‌اند که نابودی آن‌ها با آنتی‌بیوتیک‌های منفرد بسیار مشکل است. در نتیجه این امر شناسایی و کشف میکروارگانیسم‌های وحشی با توانایی تولید آنتی‌بیوتیک یا مواد ضد میکروبی امری ضروری می‌باشد (۶-۸). 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

اقیانوس‌ها و دریاها دارای تنوع وسیعی از جمعیت‌های میکروبی می‌باشند که بسیاری از آن‌ها تاکنون شناخته نشده‌اند (۱). حدود  $10^{29} \times 3/6$  میکروارگانیسم از لایه‌های مختلف محیط‌های آبی شامل: سطح، عمق و ... کشف و جداسازی شده است (۲). در مدت دو دهه گذشته تحقیقاتی در رابطه با باکتری‌های آبی، به ویژه در مورد پتانسیل این میکروارگانیسم‌ها جهت تولید متابولیت‌های ثانویه انجام شده است. دلیل منطقی برای تولید متابولیت‌های ثانویه از قبیل مواد ضد میکروبی در میان میکروبی‌ها 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

شامل: zwittermicin, cerexin (مشتق از باسیلوس سرئوس) mycobacillin, baci- (مشتق از باسیلوس پومیلوس) و 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 منفی‌ها فعالیت دارند (۲۰-۱۷). هدف اصلی این تحقیق شناسایی و جداسازی باکتری‌های آبی با اثر ممانعت‌کنندگی بر برخی سویه‌های شاخص پاتوژن (تهدیدکننده 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 آبی

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 پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس داخل گرمخانه قرار داده شدند (۲۱).

### بهینه‌سازی باکتری‌های آبی جهت تولید فراورده ضد میکروبی و تخلیص عصاره ضد میکروبی

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

گرم مثبت، هوازی یا بی‌هوازی اختیاری، میله‌ای شکل و دارای اسپور می‌باشند که به‌طور وسیعی در طبیعت پراکنده شده‌اند. باسیلوس‌ها 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 متابولیت‌هایی 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 باسیلوس‌ها مشتق می‌شوند شامل: آنزیم‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها، آمینواسیدها و حشره‌کش‌ها می‌باشند. پتانسیل باسیلوس‌ها جهت تولید آنتی‌بیوتیک بیشتر از ۵۰ سال است که مورد شناسایی قرار گرفته است. بسیاری از باکتریوسین‌ها و مواد ممانعت‌کننده 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). باسیلوس‌ها در زمینه‌های صنعتی به دلایل زیادی از جمله: رشد بالا در زمان کوتاه، توانایی تولید پروتئین‌های ترش‌کننده در محیط کشت خارج سلولی و نیز بی‌خطر بودن برای استفاده در صنایع دارویی و غذایی مورد توجه هستند (۱۴). باکتریوسین‌ها پلی‌پپتیدهایی 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 mycooides*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* از زیستگاه‌های آبی برای تولید متابولیت‌های ثانویه مورد تحقیق و مطالعه قرار گرفته‌اند. بعلاوه باکتریوسین تولید شده از گونه‌های باسیلوس و به‌طور منحصر به فرد از باسیلوس پومیلوس دارای خاصیت ممانعت‌کنندگی در برابر محدوده وسیعی از میکروارگانیسم‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشد (۱۵). باکتری‌های آبی از جنس باسیلوس به عنوان تولیدکننده متابولیت‌های ضد میکروبی به خوبی شناخته شده‌اند، نمونه‌های گزارش شده شامل: macrolactin F, Osuccinylmacrolactin F-7, Osuccinylmacrolactin A-7 از گونه باسیلوس می‌باشند (۱۶). تعداد آنتی‌بیوتیک‌های مشتق از باسیلوس‌ها 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

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 هیتون آگار (مرک-آلمان) بودند کشت سفره‌ای داده شدند. سپس عصاره خام ماده ضد میکروبی تهیه شده به مقدار ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر 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 داده شده 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 به وسیله تکنیک مولکولی ۱۶srDNA PCR sequencing شناسایی شدند.

### واکنش زنجیری پلیمرز

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 پلیمرز 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 می کند (۲۲). پس از انجام واکنش زنجیری پلیمرز مقدار ۵ میکرولیتر از محصول واکنش زنجیری پلیمرز بر روی ژل آگارز ۱ درصد به همراه اندازه نشانگر ۱۰۰-۱۰۰۰ الکتروفورز گردید و باندهای اختصاصی مشاهده شد. ۴۵ میکرولیتر از محصول نهایی واکنش زنجیری پلیمرز 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 نرم افزار کروماتس مشاهده و کیفیت تعیین توالی از روی پیک‌های ترسیمی بررسی شد. با استفاده از نرم افزار بلاست در پایگاه اینترنتی بانک اطلاعات ژنی توالی‌های همسان مشخص و درصد تشابه آن‌ها بررسی گردید.

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 میلی لیتر اتیل استات انجام شد. در مجموع ۳۰۰ میلی لیتر اتیل استات برای استخراج عصاره ضد میکروبی برای هر نمونه استفاده شد. در نهایت تحت دمای ۳۷ درجه سلسیوس حلال خارج و عصاره خام میکروبی به دست آمد (۲۱).

### ارزیابی و سنجش فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های آبی

در مرحله سنجش فعالیت ضد میکروبی به سویه‌های مرجع خاصی برای بررسی اثر ضد میکروبی باکتری‌های آبی بر روی آن‌ها نیاز بود. این سویه‌های مرجع شامل باسیلوس سوبتیلیس (PTCC ۱۳۹۹ ATCC ۲۵۹۲۲)، اشریشیا کلی (DSM ۱۷۲۰)، استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC ۱۴۳۱ ATCC ۲۵۹۲۳) و سودوموناس اثرورژینوزا (PTCC ۱۴۳۰ ATCC ۲۷۸۵۳) بودند که از بانک میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی کشور تهیه شدند.

### سنجش فعالیت ضد میکروبی با دور روش مختلف

#### آنتاگونیسم میکروبی

در این روش باکتری‌های آبی به صورت زنده جهت بررسی اثر ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفتند. در ابتدا پلیت به دو نیمه مساوی تقسیم شد. در یک نیمه پلیت، باکتری آبی مورد نظر به صورت انبوه کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در داخل گرمخانه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شد تا به اندازه‌ی 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 به صورت عمود بر کشت قبلی از پایین به بالا به نیمه بالای پلیت که باکتری آبی قبلاً در آن ناحیه به صورت انبوه کشت داده شده بود متصل گردید.

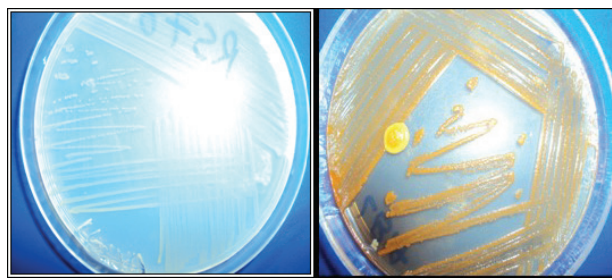
سپس پلیت های کشت داده شده (حاوی باکتری آبی و سویه‌های مرجع متصل شده به آن) به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. محیط کشت مورد استفاده در این روش مولر هیتون آگار (مرک-آلمان) بود که با آب دریا ساخته شده بود (استفاده از آب دریا به دلیل وجود املاح لازم برای رشد باکتری‌های آبی است). این روش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

#### بررسی هاله ممانعت از رشد با روش دیسک گذاری

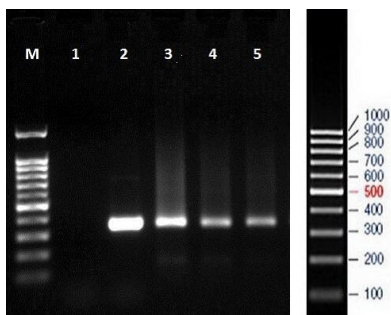
در این روش سنجش فعالیت ماده ضد میکروبی بر اساس انتشار



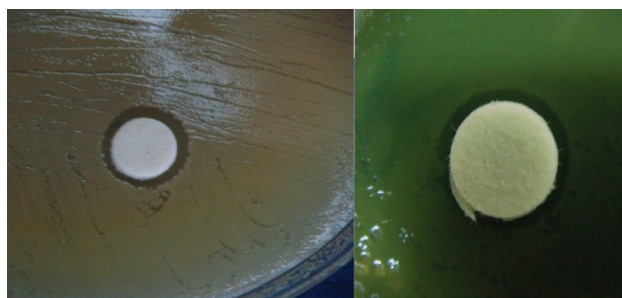
شکل ۲: اثر ممانعت کنندگی در روش کشت متقاطع خطی



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



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



شکل ۳: هاله ممانعت از رشد در روش دیسک گذاری

## یافته ها

### جداسازی سویه ها

دارای رنگ دانه بودند که به رنگ های مختلف قرمز، سبز، نارنجی و زرد مشاهده شدند (شکل شماره ۱).

۱۶۲ پرگنه مختلف باکتریایی جدا شد. اکثر سویه های جداشده

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

نام سویه	استافیلوکوکوس اورئوس	سودوموناس اثرورژینوزا	باسیلوس سوبتیلیس	اشریشیاکلی
RS۲۸	+	-	+	-
RS۵۴	+	-	-	-
RS۵۶	+	-	+	-
RS۸۲	+	-	-	-
کنترل	+	-	+	-

جدول ۲: نتایج بررسی فعالیت ضد میکروبی از طریق دیسک گذاری و سنجش هاله ممانعت از رشد (بدون هاله ممانعت به صورت (+)، هاله ممانعت بین ۳-۵ میلی متر به صورت (+)، هاله ممانعت بین ۵-۳ میلی متر به صورت (++) و هاله ممانعت بیشتر از ۵ میلی متر به صورت (+++) مشخص شد.)

نام سویه	استافیلوکوکوس اورئوس	سودوموناس اثرورژینوزا	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 اتروژینوزا و اشیریشیاکلی در هیچ‌یک از موارد مهار نشدند (جدول شماره ۱). استریپتومایسس 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 بررسی 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 اشیریشیاکلی به‌طور کامل مقاوم بود و سودوموناس اتروژینوزا 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 ۱۶S rDNA PCR sequencing تکثیر و بر روی ژل آگارز نمایان شدند و در نهایت 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 جدا شده با روش آنتاگونیسم میکروبی مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که باکتری‌های جدا شده با اثر ضد میکروبی در اکثر موارد علیه گرم مثبت‌ها مؤثر بودند، ولی اثر آن‌ها بر روی گرم منفی‌ها بسیار ضعیف بود، بطوریکه اشیریشیاکلی و سودوموناس اتروژینوزا 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 اتروژینوزا مشاهده شد

و اشیریشیاکلی بسیار مقاوم بود. در مورد نتایج این دو روش می‌توان گفت: در این دو روش اثر مهار بر روی گرم مثبت‌ها بوده است و گرم منفی‌ها به مقدار بسیار کمی مهار شده‌اند. 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 ارگانسیم‌های متنوعی مورد سنجش قرارگرفت و مشخص شد که بهترین فعالیت در برابر گرم مثبت‌هایی همچون استافیلوکوکوس اورئوس و میکروکوکوس لوتئوس بود، در این تحقیق فعالیت علیه سودوموناس اتروژینوزا 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 جدا شده اثر ممانعت‌کنندگی بسیار ناچیزی در برابر سودوموناس اتروژینوزا و اشیریشیاکلی 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 ممانعت‌کنندگی بر روی باسیلوس سوبتیلیس داشتند، ۲۲ سویه (۵۲٪) اثر مهار بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس داشتند و تنها ۴ سویه (۹٪) اثر ممانعت‌کنندگی بر اشیریشیاکلی داشت. نکته جالب در این تحقیق این بود که تنها ۴ سویه اثر ممانعت‌کنندگی بر روی اشیریشیاکلی داشت (۲۱). در تحقیقی که انجام شد و دیگر مطالعات ذکر شده این امر به وضوح دیده شد که بیشترین اثر ممانعت‌کنندگی 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 لپیدو 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

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 آبی 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 نمایم.

### تعارض منافع

بین نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

### Reference

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Orsod M, Joseph M, Huyop F. Characterization of Exopolysaccharides produced by *Bacillus cereus* and *Brachy bacterium* sp. Isolated from Asian Sea Bass (*Lates* calcarifer). *Mal J Microbiol*. 2012; 8(3):170-174.
- Perez C, Suarez C, Castro GR. Antimicrobial activity determined in strains of *Bacillus circulans* cluster. *Folia Microbiol*. 1993;38 (1):25-28.
- 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.
- Nastro RA, Costanzo A D, Gesuele R, Trifuoggi M, Inglese M, Guida M. Influence of temperature on the production of antibiotic molecules in *Bacillus amyloliquifaciens* strain HNA3. AMéndez-Vilas (Ed). 2011;1307-1310.
- 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.
- 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.