مجله دنیای میکروب‌ها
سال یازدهم شماره دوم (پیاپی ۳۵) تابستان ۱۳۹۷
صفحات ۱۵۴-۱۴۳

Original Article

# اثرات ضدبیوفیلمی و ضد باکتریایی سویه های تولید کننده باکتریوسین *اشریشیا کلی* و *باسیلوس سوبتلیس*

**محمدرضا سرجوقیان[۱]، شکیبا درویش علیپور آستانه[۲*]**

[۱]کارشناس ارشد، گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده بیوتکنولوژی، پردیس علوم و فناوری نوین، دانشگاه سمنان، [۲]استادیار، گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده بیوتکنولوژی، پردیس علوم و فناوری نوین، دانشگاه سمنان.

## چکیده

*سابقه و هدف:* شیوع عفونت، به همراه گسترش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، سبب شده است که ترکیبات پپتیدی تولید شده توسط باکتری‌ها (باکتریوسین‌ها) مورد توجه قرار گیرند. این مطالعه با هدف مقایسه اثر ضد میکروبی در باکتری‌های دارای توانایی تولید باکتریوسین انجام شد.

*مواد و روش ها:* فعالیت بازدارندگی باکتری‌های جدا شده از خاک نواحی مختلف سمنان (کلکسیون میکروبی دانشگاه سمنان DDBCC)، علیه باکتری‌های شاخص به روش انتشار در آگار بررسی گردید. سویه‌های منتخب با آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شدند. پس از تغلیظ باکتریوسین‌های منتخب با کمک غلظت اشباعی سولفات آمونیوم، اثرات تخریب بیوفیلم در هر باکتریوسین مطالعه و سپس به روش کروماتوگرافی لایه نازک تخلیص و فعالیت ضد میکروبی آنها بررسی شد.

*یافته ها:* نتایج تعیین توالی نشان داد که سویه‌های منتخب DDBCC38 و DDBCC51 دارای شباهت ۹۵ درصدی به *اشریشیا کلی* و سویه DDBCC46 شباهت ۹۶ درصدی به *باسیلوس سوبتلیس* بود. باکتریوسین های تغلیظ شده DDBCC51 و DDBCC38 رشد *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس آنتراسیس*، *کلبسیلا نمونیه* را پس از ۵۲ ساعت مهار کرده و بیوفیلم *سودوموناس ائروجینوسا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را به ترتیب ۱۲، ۴۰ درصد و ۱۹/۶، ۴۰ درصد تخریب کرد. در مقابل باکتریوسین سویه DDBCC46 در ۷۲ ساعت علیه *کلبسیلا نمونیه* و *سودوموناس ائروجینوسا* موثر بود. اما تاثیری بر تخریب بیوفیلم نشان نداد. تخلیص باکتریوسین DDBCC38 و DDBCC51، با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک، قطر هاله عدم رشد را علیه *کلبسیلا نمونیه* ۲ میلی‌متر افزایش داد. اما باکتریوسین DDBCC46 قطر هاله را ٤ میلی‌متر کاهش داد.

*نتیجه‌گیری:* با توجه به ویژگی های ضد بیوفیلمی و آنتاگونیسمی جدایه های مورد بررسی، انجام مطالعات تکمیلی به منظور بهینه سازی شرایط تولید و شناسایی مولکولی نوع باکتریوسین تولیدی پیشنهاد می گردد.

*واژگان کلیدی:* باکتریوسین، کروماتوگرافی لایه نازک، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس ائروجینوسا*، *کلبسیلا نمونیه*.

دریافت مقاله: مهر ماه ۹۶ پذیرش برای چاپ: آذر ماه ۹۶

## مقدمه

شناسایی مواد ضد میکروبی جدید، با توجه به تنوع بیماری‌های منتقله از طریق غذا و گسترش باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک، در صنایع غذایی، پزشکی، دامپزشکی ضروری است. متابولیت‌های میکروبی طیف وسیعی از عملکردهای زیستی، همچون فعالیت‌های ضد باکتری، ویروس و قارچ را شامل می‌شوند. بنابراین شناسایی و جدا کردن آنها دارای اهمیت می باشد (۱). آنتی‌بیوتیک های با دامنه اثر گسترده، مواد دفعی حاصل از متابولیسم میکروبی، لیزوزیم‌ها، انواع متعددی از اگزوتوکسین‌های پروتئینی و باکتریوسین‌ها، به عنوان ترکیبات فعال زیستی قلمداد می شوند (۲).

*) آدرس برای مکاتبه: سمنان، دانشگاه سمنان، دانشکده بیوتکنولوژی.
تلفن: ۰۲۳۳۱۵۳۳۱۹۷ پست الکترونیک: darvishalipour@semnan.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

در بین ترکیبات ضد میکروبی، باکتریوسین‌ها در هر دو زمینه علمی و تجاری مورد توجه هستند. باکتریوسین‌ها، پپتیدهایی بسیار متنوع با سمیت کمتر و خاصیت آبدوستی یا آبگریزی غشاء سلولی را هدف قرار می دهند. مکانیسم عملکرد آن ها بر روی سلول باکتریایی بسیار متفاوت است. برخی از آنها بیوستز پلیمرهای زیستی و یا فعالیت آنزیم‌ها را مهار می‌کنند. اما بیشتر آنها با ایجاد کانال‌های غشایی، پتانسیل انرژی سلول را مختل می‌کنند (۳).

باکتریوسین‌ها می‌توانند طیف فعالیت گسترده یا محدودی داشته باشند. باکتریوسین‌های با طیف فعالیت گسترده به دلیل قابلیت تجاری شدن گزینه بهتری برای جایگزینی آنتی بیوتیک‌ها هستند. از طرفی به دلیل مقاومت باکتری‌های فلور بدن به طیف وسیع آنتی بیوتیک، باکتریوسین‌هایی با طیف محدود مورد نیاز هستند (٤ و ٥).

در سال ۲۰۱٤ چوپرا (Chopra) و همکاران توانستند پپتید ضد میکروبی جدیدی را از *باسیلوس سونورنسیس* سویه MT93 (*Bacillus sonorensis* MT93) در یک محیط دریایی غربال کنند که در خانواده هتروسیکلوآنتراسین قرار دارد. آنها این باکتریوسین را سنورسین نامیدند. این ترکیب علیه طیف وسیعی از باکتری هایی گرم مثبت و گرم منفی فعالیت داشت (٦).

سالیوان (Sullivan) و همکاران در سال ۲۰۱٤ نشان دادند که تکنیک متاژنومی از جمله روش هایی است که می تواند در بررسی پتانسیل باکتریوسیژنیک میکروارگانیسم ها به کار رود. این محققین مشخص کردند که هومولوگ ژن های کد کننده باکتریوسین در یک محیط، بسیار متنوع است. بنابراین با شناسایی این کلاسترها در یک محیط می توان ظرفیت تولید باکتریوسین را پیشگویی کرد (۷).

جانینگ (Junying) و همکاران در سال ۲۰۱۵ تولید باکتریوسین جدید CAMT2 را از *باسیلوس آمیلوفیکوس* گزارش کردند که از یک نمونه ماهی جدا شده بود (۸). ماتور (Mathur) و همکاران در سال ۲۰۱۵ زیر مجموعه ای از خانواده باکتریوسین را مورد مطالعه قرار دادند که ساکتی بیوتیک نامیده شد (۹).

حسن (Hassan) و همکاران در سال ۲۰۱۲ در شمال ایران مطالعه ای بر روی ژن های کد کننده باکتریوسین در ۱۸۷ سویه های انتروکوک بیمارستانی انجام دادند (۱۰). نتایج آنها نشان داد که ۲۰/۳ درصد سویه های غربال شده، باکتریوسیژنیک هستند و اکثر سویه ها توانایی تولید چندین باکتریوسین را دارند. به این دلیل فعالیت ضد باکتریایی بیشتری علیه بسیاری از باکتری ها نشان دادند. این باکتریوسین ها شامل اینترسین A، اینترلیزین A و اینترلیزین A/B L50 بود (۱۰).

باکتریوسین‌ها، بدون تاثیر منفی بر روی مواد غذایی به عنوان نگهدارنده غذایی (۱۱ و ۱۲) نیز کاربرد داشته و یا در بخش بالینی و دامپزشکی به صورت یک ترکیب ضد میکروبی به کار می‌روند (۱۳ و ١٤). اما از میان هزاران پپتید ضد میکروبی سنتزی و میلیون‌ها پپتید ضدمیکروبی طبیعی تعداد بسیار کمی از آنها کاربرد و استفاده بالینی یافته‌اند (۱۵).

تفاوت باکتریوسین‌ها با آنتی بیوتیک‌های معمول در طیف کشندگی محدود آن، است. باکتریوسین به وسیله ریبوزوم سنتز می‌شود. از ویژگی‌های بارز دیگر باکتریوسین‌ها قدرت زیاد مهارکنندگی (در حد پیکومول) است که آنها را بر آنتی‌بیوتیک ارجحیت می دهد (١٤).

اثرات نامطلوب نسل جدید آنتی بیوتیک‌ها در انسان و سمیت بالای آنها سبب شده که روش‌های جایگزین مورد بررسی قرارگیرد. باکتریوسین‌ها در مقایسه با آنتی بیوتیک‌ها و سایر ترکیبات ضد میکروبی در استفاده‌های درمانی قابلیت‌های خوبی دارند. نسبت به هدف اختصاصی تر عمل می کنند و درطبیعت گونه‌های مختلف تولید کننده باکتریوسین را می‌توان یافت.

از این رو، این مطالعه با هدف مقایسه اثر ضد میکروبی در باکتری‌های تولید کننده باکتریوسین انجام شد.

## مواد و روش ها

*الف) غربال‌گری سویه‌های تولید کننده باکتریوسین:* برای شناسایی سویه‌های تولید کننده باکتریوسین در این پژوهش، باکتری های غربال شده از نمونه‌های خاک شهر و حومه سمنان، که در کلکسیون میکروبی دانشگاه سمنان (DDBCC) نگهداری می‌شوند، برای سنجش فعالیت ضد میکروبی علیه *سودوموناس*

Archive of SID



www.SID.ir

*ئروجینوسا* (*P. aeruginosa*)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (*S. aureus*)، *استرپتوکوکوس پایوژنز* (*S. pyogenes*)، *استرپتوکوکوس فیکالیس* (*S. faecalis*)، *اشریشیا کلی* (*E. coli*) ، *باسیلوس سوبتلیس* (*B. subtilis*)، *پروتئوس ولگاریس* (*P. vulgaris*)، *سالمونلا* (*Salmonella* sp.) و *کلبسیلا نمونیه* (*K. pneumoniae*) مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند.

*ب) شناسایی بیوشیمیایی:* ویژگی‌ها و صفات بیوشیمیایی، سویه‌هایی که دارای فعالیت ضد میکروبی بیشتر است، مطابق دستورالعمل کتاب برگی (۱۶)، بررسی شدند. این آزمون‌های بیوشیمیایی شامل اکسیداز، کاتالاز، تجزیه سیترات، تجزیه نشاسته، حرکت، MR/VP و تولید اندول می شدند.

*ج) شناسایی مولکولی:* شناسایی مولکولی هر یک از سویه‌های منتخب با تکثیر ژن 16 *S rRNA* و به کمک آغازگرهای عمومی 27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' و 1492R: 5'-CGGTTACCTTGTTACTT-3' انجام گرفت (۱۷). واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر از بافر 10X، ۰/۲ میلی مولار از dNTPs ، ۱/۸ میلی مولار از $MgCl_2$، ۲/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۰/۲ میلی مولار)، ۱ واحد آنزیم Taq DNA پلی مراز و ۱ نانوگرم از DNA الگو انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (مدل Labcycler (SensoQuesT) ، کره جنوبی) در شرایط دمایی واسرشت شدن اولیه ٤ دقیقه در دمای ۹٤ °C، ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ °C، ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ °C به مدت ۵۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ °C به مدت ٤۵ ثانیه و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. محصولات PCR بر روی ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز شدند و در نهایت برای تعیین توالی به شرکت بیونیر کره جنوبی ارسال گردیدند.

*د) تأثیر زمان بر میزان تولید باکتریوسین:* برای این منظور سویه‌های تولیدکننده باکتریوسین در محیط برین هارت اینفیوژن براث (مرک، آلمان) کشت و در ۳۰°C گرمخانه‌گذاری شدند. سپس در زمان های انکوباسیون ٤۸، ۷۲ ساعت تا ٦ روز ۱۰ میلی‌لیتر از مایع روماند کشت در ۸۰۰۰ RPM به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس روماند با صافی ۰/٤۵ میکرون فیلتر و به منظور کنترل مجدداً کشت داده شد. در نهایت اثر ضد میکروبی مایع رویی هر سویه با روش انتشار در آگار مورد ارزیابی قرار گرفت تا زمان بهینه برای تولید باکتریوسین برای هر سویه مشخص گردد (۱۸).

*ه) آزمون بیوسورفکتانت:* با ۲ میلی‌لیتر روغن مایع، سطح آب با لایه نازک از روغن پوشانده شد. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی صاف شده مربوط به هر سویه در سطح آب پوشیده شده از روغن قرارگرفت (۱۹). در این آزمون از نمونه آب به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

*و) تغلیظ باکتریوسین با روش غلظت اشباعی آمونیوم سولفات:* هر یک از سویه‌های منتخب تولید کننده در محیط برین هارت اینفیوژن براث کشت و در شرایط بهینه گرمخانه‌گذاری شدند. در ادامه، کشت‌ها در شرایط ۸۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول روماند کشت پس از عبور از کاغذ ۰/٤۵ میکرون در غلظت‌های ۵۰ و ۷۰ درصد آمونیوم سولفات (مرک، آلمان) در دمای ٤ °C تغلیظ گردید (۲۰). پس از اتمام مدت زمان لازم، هر نمونه به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و رسوب حاصله در بافر تریس با pH ۷ حل گردید. برای حذف نمک از کیسه دیالیز ۳ کیلودالتون استفاده شد.

*ز) تأثیر باکتریوسین بر تخریب بیوفیلم باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس و سودوموناس ائروجینوسا:* تاثیر باکتریوسین بر میزان تخریب بیوفیلم به روش میکروتیتر مطالعه شد. در این روش، ابتدا ۱۰ میکرولیتر از کشت ۲ ساعت باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس ائروجینوسا* به ۲٤۰ میکرولیتر محیط کشت مایع BHI حاوی ۱ درصد گلوکز اضافه شد و سپس به مدت ۷ روز در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری گردید. پس از سپری شدن دوره انکوباسیون محتویات داخل چاهک خارج و پس از چند بار شستشو با بافر تریس (۱۰ میلی مولار)، ۲۵۰ میکرولیتر باکتریوسین تغلیظ شده از هر سویه منتخب به صورت جداگانه به هر چاهک اضافه شد و ۳ ساعت در دمای ۳۰ °C

Archive of SID



www.SID.ir

گرمخانه‌گذاری گردید. در ادامه ماده ضد میکروبی از داخل چاهک خارج و با بافر تریس چندین بار شستشو داده شد. سپس به هر چاهک ۲۵۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله ۲ درصد به مدت ۵ دقیقه اضافه شد. پس از شستشوی هر چاهک با بافر تریس، پس از ۳۰ دقیقه با اضافه کردن ۲۵۰ میکرولیتر استیک اسید گلاسیال، با کمک دستگاه قرائت کننده الایزا میزان جذب نوری هر چاهک در طول موج ۴۹۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمونه کنترل مثبت، چاهک بدون باکتریوسین می‌باشد. درصد تخریب بیوفیلم با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (۲۱).

درصد مهار = $(\text{Control OD}_{492}-\text{Treated OD}_{492})/\text{Control OD}_{492}\times 100$

*ح) ارزیابی فعالیت باکتریوسین به روش حداقل غلظت مهارکننده-بازدارنده:* در یک میکروپلیت ۹۶ خانه، ۱۵۰ میکرولیتر محیط کشت BHI استریل اضافه شد. سپس با افزودن ۱۵۰ میکرولیتر نمونه باکتریوسین تغلیظ شده به اولین چاهک، سری رقت‌های ۱/۲ از باکتریوسین تغلیظ شده در هر چاهک تهیه گردید. در ادامه ۵ میکرولیتر از باکتری شاخص *کلبسیلا نمونیه* با کدورتی معادل نیم مک فارلند ($1/5\times10^{8}$ CFU/ml) به چاهک‌ها تلقیح شد. در هر ردیف یک چاهک به عنوان کنترل مثبت (محیط کشت حاوی باکتریوسین تغلیظ شده) و یک چاهک به عنوان کنترل منفی (محیط کشت حاوی باکتری شاخص) است. پس از ثبت میزان کدورت اولیه توسط قرائت کننده الایزا در طول موج ۶۲۰ نانومتر، پلیت‌ها در دمای ۳۰ °C به مدت ۱۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. حداقل غلظت مهارکننده و بازدارنده از رابطه زیر محاسبه گردید. در این رابطه n شماره آخرین چاهکی است که با بالاترین رقت سبب مهار باکتری شاخص شده است (۲۲).

$$AU/ml= 2^{n} \times 1000/300$$

*ط) تخلیص باکتریوسین با کروماتوگرافی لایه نازک (TLC):* با کمک لوله موئین از باکتریوسین تغلیظ شده سویه های منتخب بر روی کاغذ TLC (مرک، آلمان) بارگذاری و کاغذ در ظرف حاوی حلال بوتانول، استیک اسید و آب (۴۰:۱۰:۲۰) قرار گرفت. پس از رسیدن حلال به انتهای کاغذ آن را از محلول خارج کرده و پس از خشک شدن کاغذ، با لامپ UV محل لکه‌ها علامت‌گذاری شد. همچنین با استفاده از محلول ناین هیدرین لکه‌ها ظاهر گردید. موقعیت هر لکه (میزان Rf) محاسبه و با هم مقایسه گردید (۲۳ و ۲۴). در ادامه هر یک از لکه‌های مورد نظر از روی کاغذ تراشیده و با حل کردن در ۲۰۰ میکرولیتر بافر تریس ۱۰ میلی مولار pH ۷، میزان فعالیت باکتریوسایدی آن ها علیه باکتری شاخص به روش انتشار مورد ارزیابی قرار گرفت.

*ی) بررسی وزن مولکولی باکتریوسین با روش الکتروفورز SDS-PAGE:* تعیین وزن مولکولی باکتریوسین تخلیص شده، با کمک الکتروفورز بر روی ژل SDS-PAGE ۱۵ درصد انجام گرفت. در ژل ۱۵ درصد آکریل‌آمید ۱۰۰ میکرولیتر باکتریوسین تغلیظ شده با ۲۰ میکرولیتر سمپل بافر 5X مخلوط گردید. پس از حرارت دادن آن در دمای جوش به مدت ۵ دقیقه به داخل چاهک بر روی ژل انتقال داده شد. الکتروفورز با جریان ۲۵ میلی‌آمپر انجام گرفت. در نهایت ژل با رنگ کوماسی بلو R250 رنگ آمیزی شد (۲۵).

## یافته‌ها

*الف) تأثیر زمان بر تولید باکتریوسین:* با انجام آزمون‌های غربال‌گری، سه سویه DDBCC38، DDBCC46 و DDBCC51 به عنوان سویه های منتخب شناسایی شدند. سویه‌های DDBCC51 و DDBCC38 در ۴۸ ساعت و در مورد سویه DDBCC46، ۷۲ ساعت پس از رشد بهترین تاثیر ضد میکروبی را علیه سویه های شاخص دارا بود (جدول ۱). در مورد اختصاصی بودن و تاثیر ضد میکروبی هر باکتریوسین سویه DDBCC46 علیه *کلبسیلا نمونیه* و *سودوموناس ائروجینوسا*، سویه‌های DDBCC51, DDBCC38 علیه *باسیلوس سرئوس* (*B. cerues*) و *باسیلوس آنتراسیس* (*B. anthracis*) با قطر متوسط هاله برابر ۱۳ میلی متر تاثیر ضد باکتریایی نشان داد.

*ب) شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی سویه های منتخب:*

Archive of SID



www.SID.ir

جدول ۱: نتایج بررسی زمان تولید باکتریوسین به روش انتشار در آگار در زمان‌های ٤٨ و ٧٢ ساعت.

| شماره سویه | زمان (ساعت) | *کلبسیلا پنومونیه* | *سودوموناس آئروجنوسا* | *باسیلوس سرئوس* | *باسیلوس سوبتلیس* | *باسیلوس آنتراسیس* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **DDBCC46** | ٧٢ | ٢٥ mm | ١٨ mm | – | – | – |
| **DDBCC51** | ٤٨ | – | – | ١٢ mm | – | ١٤ mm |
| **DDBCC38** | ٧٢ | – | – | ١٢ mm | – | ١٤ mm |
| **DDBCC46** | ٤٨ | – | – | – | – | – |
| **DDBCC51** | ٧٢ | – | – | ١٠ mm | – | – |
| **DDBCC 38** | ٤٨ | – | – | ١٢ mm | ١٤ mm | ١٢ mm |

در شناسایی مورفولوژی مشخص گردید که سویه DDBCC46، یک باکتری میله ای، گرم مثبت، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی و سویه‌های DDBCC38 و DDBCC51 میله ای، گرم منفی، اکسیداز منفی هستند. نتایج تعیین توالی در شناسایی مولکولی ژن *16SrRNA*، با کمک هم ردیفی در پایگاه NCBI نشان داد که سویه DDBCC38 و DDBCC51 دارای شباهت ٩٥ درصدی به باکتری *اشریشیاکلی* و سویه DDBCC46 دارای شباهت ٩٦ درصدی به *باسیلوس سوبتلیس* است.

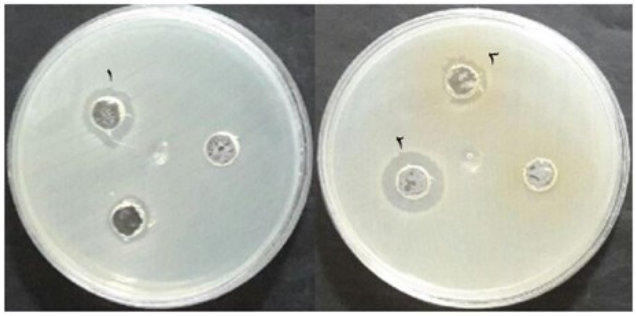
ج) *آزمون بررسی بیوسورفکتانت:* نتایج مطالعه نشان داد که ماده ضد میکروبی تولید شده توسط هر یک از این سه سویه، بیوسورفکتانت نیستند. زیرا در سطح آب پوشیده شده از روغن و در سطح روغن شناور بوده و قابلیت حل شدن در چربی را نداشتند.

د) *تغلیظ باکتریوسین:* تغلیظ باکتریوسین در دو غلظت ٥٠ و ٧٠ درصد به روش آمونیوم سولفات انجام گرفت. نتایج نشان داد که غلظت اشباع ٧٠ درصد باکتریوسین سویه DDBCC38 و غلظت ٥٠ درصد سویه DDBCC51 علیه باکتری شاخص *کلبسیلا نمونیه* قطر هاله عدم رشدی برابر ١٥ میلی‌متر دارد. بنابراین با ٣ میلی‌متر افزایش قطر نسبت به مایع رویی دارای عملکردی بهتری بود. در حالی که باکتریوسین DDBCC46 در هر دو غلظت ٥٠ و ٧٠ درصد سولفات آمونیوم علیه باکتری شاخص *کلبسیلا نمونیه* فعالیت باکتریوسایدی نشان داد. در غلظت ٧٠ درصد، عملکرد ضد باکتریایی آن با قطر ١٩ میلی متر تقریباً مشابه مایع روماند و در غلظت ٥٠ درصد میزان فعالیت آن با قطر ١٥ میلی‌متر کمتر از مایع روماند به دست آمد (شکل ١).

ه) *نتایج بررسی MIC/MBC:* نتایج بررسی فعالیت باکتریوسین سویه‌های DDBCC51، DDBCC46 و DDBCC38 به روش حداقل غلظت مهار کننده و حداقل غلظت بازدارنده نشان داد که فعالیت بازدارندگی سویه های DDBCC46 و DDBCC51 علیه *کلبسیلا نمونیه* به ترتیب ٥٣ Au/ml و ٦/٦ Au/ml بود. اما باکتریوسین تولید شده توسط سویه DDBCC38 علیه *کلبسیلا نمونیه* فعالیت مهار کنندگی رشد داشت.

و) *تأثیر باکتریوسین سویه‌های منتخب بر روی تخریب بیوفیلم:* باکتریوسین تغلیظ شده سویه DDBCC38 بیوفیلم حاصل از رشد ٧ روزه باکتری‌های *سودوموناس ائروجینوسا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را به ترتیب ١٢ و ٤٠ درصد و سویه DDBCC51 به ترتیب ١٩/٦ و ٤٠ درصد تخریب کرد. در مقابل باکتریوسین تولید شده از سویه DDBCC46 تاثیری بر تخریب بیوفیلم نداشت.

ز) *بررسی وزن مولکولی با SDS-PAGE:* مایع روماند کشت و باکتریوسین تغلیظ شده از سویه‌های منتخب بر روی ژل آکریل آمید ١٥٪ بررسی شد (شکل ٢). در چاهک شماره ١ و ٤ وزن مولکولی مایع رویی کشت سویه DDBCC46، در محدوده ٢٥

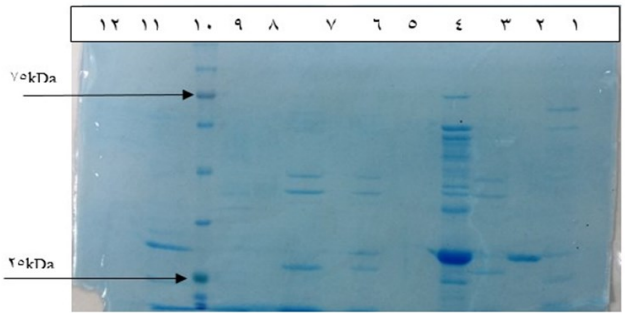



شکل ١: بررسی نمونه های تغلیظ شده علیه باکتری شاخص *کلبسیلا نمونیه*. ١) سویه DDBCC51، ٢) سویه DDBCC46، ٣) سویه DDBCC38.

Archive of SID



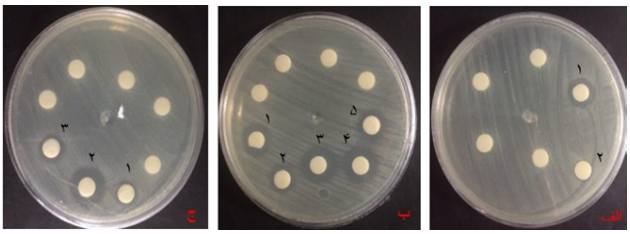
www.SID.ir




شکل ۲: تعیین وزن مولکولی سویه‌های‌منتخب به کمک SDS-PAGE. چاهک ۱) باکتریوسین تغلیظ شده DDBCC46 در غلظت اشباع ۵۰ ٪ سولفات آمونیوم، چاهک ۲) باکتریوسین DDBCC51 در غلظت اشباع ۵۰٪، چاهک ٤) باکتریوسین تغلیظ شده DDBCC46 در غلظت اشباع ۷۰٪، چاهک ۵) مایع رویی DDBCC51، چاهک ۷) باکتریوسین تغلیظ شده DDBCC38 در غلظت اشباع ۵۰٪، چاهک ۸) باکتریوسین تغلیظ شده DDBCC51 درغلظت ۷۰٪، چاهک ۹) باکتریوسین تغلیظ شده DDBCC38 در غلظت اشباع ۷۰٪، چاهک ۱۰) مارکر پروتئینی، چاهک های ۱۱ و ۱۲) به ترتیب مایع رویی کشت DDBCC38 و DDBCC46.

تا ۷۰ کیلو دالتون دارای چندین باند بود. اما در محدوده وزنی ۳۰ کیلو دالتون غلظت بیشتری از باند پروتئینی مشاهده شد. باکتریوسین DDBCC51 در چاهک شماره ۲، وزن مولکولی حدود ۳۰ کیلو دالتون داشت. در صورتی که باکتریوسین DDBCC38 (چاهک شماره ۱۱) وزن مولکولی آن بیش از ۳۰ کیلو دالتون بود.

*ح) تخلیص باکتریوسین‌های تغلیظ شده با کروماتوگرافی لایه نازک:* باکتریوسین تغلیظ شده سویه‌های DDBCC51 DDBCC38 و DDBCC46 به روش کروماتوگرافی لایه نازک مورد بررسی قرار گرفت. میزان Rf برای۳ لکه مشاهده شده از باکتریوسین سویه DDBCC38 به ترتیب برابر ۰/۵، ۰/۳ و ۰/۲ سانتی متر، سویه DDBCC46 به ترتیب ۰/۵ و ۰/۲ سانتی متر و برای باکتریوسین سویه DDBCC51 برابر ۰/۵ و ۰/۳ سانتی متر بود. با توجه به اینکه هر نمونه باکتریوسین تقریباً دارای چندین لکه بر روی کاغذ TLC بود. بررسی فعالیت ضدمیکروبی هریک از لکه‌ها با روش انتشار در آگار در شکل ۳ نشان داده شده است. باکتریوسین‌های تغلیظ شده DBCC38، DDBCC51 برخلاف مایع روماند کشت، رشد *کلبسیلا نمونیه*



شکل ۳: بررسی باکتریوسین خالص شده از لکه‌های TLC به روش انتشار از دیسک علیه باکتری شاخص *کلبسیلا نمونیه*. الف) ۱: باکتریوسین سویه DDBCC51، ۲: باکتریوسین سویه DDBCC46، ب) ۱: سویه DDBCC51، ۲: باکتریوسین DDBCC51، ۳) باکتریوسین سویه DDBCC46، ٤ باکتریوسین سویه DDBCC46، ج) هر ۳ لکه مربوط به باکتریوسین DDBCC38 است.

را محدود کرد (شکل ۳). باکتریوسین DDBCC38 تغلیظ شده ۷۰ درصد بر روی کاغذ TLC قطر هاله عدم رشد برابر با ۱۵، ۱۰ و ۹ میلی متر را به وجود آورد. تغلیظ ۵۰٪ این باکتریوسین نیز دارای ۳ لکه بود که تنها یک لکه آن علیه باکتری *کلبسیلا نمونیه* قطر هاله برابر۱٤ میلی متر ایجاد کرد. هر دو لکه باکتریوسین سویه DDBCC46 بر روی کاغذ TLC، اثر ضدمیکروبی با قطر هاله ۱۵ میلی متر علیه *کلبسیلا نمونیه* نشان دادند. باکتریوسین تغلیظ شده ۵۰٪ سویه DDBCC51 دارای قطر هاله برابر با ۱۵ و ۱۲ میلی متر بود.

*ط) مقایسه فعالیت باکتریوسین تغلیظ شده هر یک از سویه‌های مورد مطالعه به روش TLC و سولفات آمونیم:* تخلیص باکتریوسین تغلیظ شده در غلظت ۵۰ و ۷۰ با کمک کروماتوگرافی لایه نازک نشان داد که باکتریوسین تولید شده سویه‌های DDBCC38 و DDBCC51 پس از تخلیص قطر هاله عدم رشد آن علیه *کلبسیلا نمونیه* ۲ میلی متر افزایش می‌یابد. باکتریوسین حاصل از سویه DDBCC46 پس از تخلیص با کمک کروماتوگرافی لایه نازک ٤ میلی‌متر قطر هاله را علیه *کلبسیلا نمونیه* کاهش داد (نمودار ۱).

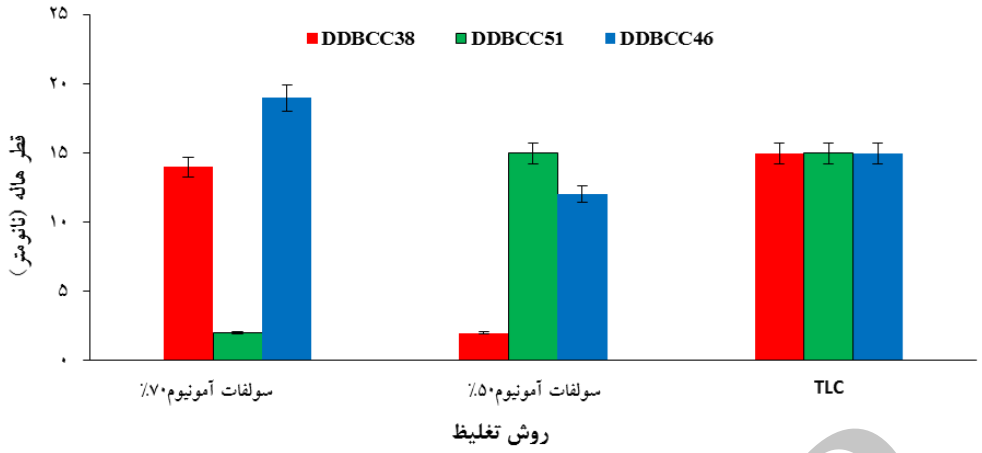
## بحث

افزایش پاتوژن‌های مقاوم به آنتی بیوتیک و عدم توانایی در ساخت آنتی بیوتیک های جدید، دلایلی هستند که باکتریوسین را به عنوان یک جایگزین مناسب آنتی‌بیوتیک مطرح می کند.

Archive of SID



www.SID.ir




نمودار ۱: تغلیظ باکتریوسین با کمک کروماتوگرافی لایه نازک در مقایسه با باکتریوسین تغلیظ شده سویه های منتخب با روش آمونیوم سولفات.

در این پژوهش فعالیت ضد میکروبی جدایه‌های تولیدکننده باکتریوسین از بانک میکروبی دانشگاه سمنان، روی گستره محدودی از باکتری های بیماریزای گرم مثبت و گرم منفی *باسیلوس سوبتلیس*، *باسیلوس آنتراسیس*، *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باکتری‌های گرم منفی از قبیل سودوموناس ائروجینوسا*، *اشریشیا کلی*، *کلبسیلا نمونیه* و *سالمونلا تیفی موریوم* به روش انتشار در آگار مورد بررسی قرار گرفت.

شناسایی مولکولی سویه‌های منتخب نشان داد که سویه‌های DDBCC38 و DDBCC51 شباهت ۹۵ درصدی به باکتری *اشریشیا کلی* و سویه DDBCC46 شباهت ۹۶ درصدی به *باسیلوس سوبتلیس* دارد. در برخی از خصوصیت بیولوژی، باکتریوسین DDBCC38 و DDBCC51 از هم متفاوت هستند. بنابراین نمی توانند جدایه‌های یکسانی باشند.

نتایج این مطالعه نشان داد که در بین باکتری های شاخص گرم منفی، باکتریوسین تولید شده از سویه‌های منتخب، علیه *کلبسیلا نمونیه* و *سودوموناس ائروجینوسا* فعالیت ضد میکروبی دارد. بنابراین این پژوهش، با گزارش مربوط به عدم فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین‌ها در برابر باکتری های گرم منفی، مشابهت ندارد (۲۶ و ۲۷).

بررسی‌های مختلفی بر روی اثر مهاری برخی از باکتریوسین‌ها بر روی باکتری های گرم منفی انجام گرفته است. از این میان می توان به باکتریوسین *پانی باسیلوس پلی‌میکسا* سویه NRRLB30509 که رشد *کمپیلوباکتر ژژونی* را مهار می کند (۲۸) و یا سویه JB05-1-1 که موجب مهار رشد *اشریشیا کلی* RR1 و *سودوموناس فلورسنس* R73 می شود (۲۹)، اشاره کرد.

امانداً (Amanda) و همکاران در سال ۲۰۰٤ با بررسی ۸٦ سویه با روش انتشار از دیسک نشان دادند که ٦۸/٦ درصد سویه‌های غربال شده، حداقل علیه یکی از سویه‌های شاخص (بیشتر باکتری های گرم مثبت شامل *باسیلوس سرئوس* و *لیستریا مونوسایتوژنز*) اثر مهاری دارند (۳۰).

شلار (Shelar) و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که باکتریوسین جدا شده از *باسیلوس آتروفیوس* سویه JS-2 (*B. atrophaeus*) توانایی مهار رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی از جمله *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس مگاتریوم* (*B. megaterium*)، *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* (*B. licheniformis*)، *اشریشیا کلی*، *سالمونلا تیفی موریوم* (*S. typhimoruim*) و *آسپرژیلوس نایجر* (*A. niger*) را دارد (۳۱).

در مطالعه حاضر، نتایج تولید ترکیب ضد میکروبی در محدوده زمانی ۱۲ ساعت تا ٦ روز نشان داد که بیشترین تولید باکتریوسین سویه DDBCC46 در ٤۸ ساعت، DDBCC38 و DDBCC51 ۷۲ ساعت، پس از کشت باکتری است. گادبن (Ghadbane) و همکاران نیز در سال ۲۰۱۳ بیشترین تولید باکتریوسین از *باسیلوس کلوسی* سویه GM17 (*B. clausii*) را

Archive of SID



www.SID.ir

در دمای ۳۰ درجه، ۷۲ ساعت پس از انکوباسیون به همراه تکانه گزارش کردند (۱۸).

مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ توسط سواپنیل (Swapnali) و همکاران بر روی *باسیلوس آتروفیوس* JS-2 انجام گرفت، دمای تولید باکتریوسین را ٤٠ درجه سلسیوس بدون تکانه گزارش نمود (۳۱). تغلیظ باکتریوسین در این پژوهش، با کمک آمونیوم سولفات انجام گرفت. باکتریوسین تغلیظ شده سویه DDBCC38 در غلظت اشباع ۷۰ درصد و سویه DDBCC51 در غلظت ۵۰ درصد با ۳ میلی‌متر افزایش قطر نسبت به مایع روماند دارای عملکردی بهتری علیه باکتری *کلبسیلا نمونیه* بود. در حالی که سویه DDBCC46 در هر دو غلظت ۵۰ و ۷۰ درصد سولفات آمونیوم علیه باکتری *کلبسیلا نمونیه* دارای فعالیت باکتریوسایدی بود. اما در غلظت ۷۰ درصد، عملکرد ضد باکتریایی آن با قطر برابر ۱۹ میلی متر تقریباً مشابه مایع روماند بود. آمونیوم سولفات در غلظت بالا بار سطحی بیشتری را جذب می کند. در نتیجه کنش پروتئین/پروتئین بیشتر از کنش پروتئین با حلال می شود. البته در روش ترسیب با آمونیوم سولفات باید توجه داشت که در یک مولاریته معین، قدرت یونی املاح دو ظرفیتی بیشتر از یک ظرفیتی است. به طور کلی هر چه غلظت نمک بیشتر شود قابلیت حل پروتئین در محلول به دلیل افزایش قدرت یونی، کمتر می‌گردد.

در سال ۲۰۱۵ گینگ وان (Xing Wan) و همکاران تغلیظ لکوسین B (باکتریوسین جدا شده از *لوکونوستوک کارنوسوم* (*L. carnosum*) که به دسته باکتریوسین‌های کلاس IId تعلق دارد را با آمونیوم سولفات ٤٠ درصد انجام دادند (۳۲). آهین (Ahern) و همکاران در سال ۲۰۰۳ توریسین ٤۳۷ یک باکتریوسین جدا شده از *باسیلوس تورنجینسیس* (*B. thuringiensis*) را در غلظت اشباعی آمونیوم سولفات ۸۰ درصد تخلیص کردند (۳۳). کامون (Kamoun) و همکاران در سال ۲۰۰۵ توانستند باکتریوسین F4 تولیدی توسط *باسیلوس تورنجینسیس* را در ۵۰ درصد سولفات آمونیوم رسوب دهند (۳٤).

یکی از مشکلات جدی در مراکز درمانی، ایجاد مقاومت در برابر طیفی از آنتی بیوتیک‌ها به دلیل تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های *سودوموناس ائروجینوسا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* است. در این پژوهش، باکتریوسین‌های تغلیظ شده DDBCC51، DDBCC38، بیوفیلم ۷ روز *سودوموناس ائروجینوسا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را در مدت ٤ ساعت تخریب نمود. اگرچه بیوفیلم پس از ۲٤ ساعت تشکیل می‌شود اما بافت سستی دارد. در حالی که این بیوفیلم مقاومت بیشتری نسبت به عوامل محیطی داشته و تخریب این ساختار در بیوفیلم بسیار حائز اهمیت است.

مطالعه المسکوری (Al-Mathkhury) و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی تخریب بیوفیلم تشکیل شده توسط *سودوموناس ائروجینوسا* در سوند ادراری نشان داد که باکتریوسین خالص شده از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (*L. acidophilus*)، ۳۰ درصد بیوفیلم را تخریب می کند (۳۵). چوپرا (Chopra) و همکاران نیز در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که ۵۰ µg/ml سونورنسیس MT93 در مدت ٤ ساعت می تواند بیوفیلم حاصل از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را تخریب کند (٦).

در این پژوهش، تخلیص باکتریوسین تغلیظ شده با کمک کروماتوگرافی لایه نازک نشان داد که با تخلیص باکتریوسین DDBCC38 و DDBCC51، ۲ میلی‌متر قطر هاله رشد علیه *کلبسیلا نمونیه* افزایش داشت. اما در باکتریوسین سویه DDBCC46 پس از تخلیص با کمک کروماتوگرافی لایه نازک ٤ میلی متر قطر هاله عدم رشد کاهش یافت. بنابراین، به ترکیبات ضد باکتریایی دیگری که به وسیله این باکتری تولید می‌شود، مرتبط است. به طوری که وجود چندین لکه در کاغذ کروماتوگرافی این مساله را تایید می کند.

گوپتا (Gupta) در سال ۲۰۱۷ مایع روماند کشت ٤ سویه *باسیلوس* که خاصیت ضد میکروبی داشتند را با کمک کروماتوگرافی لایه نازک تخلیص نمود (۳٦). بیواس (Biswas) نیز در سال ۲۰۱٦ لنتی بیوتیک تخلیص شده از *لاکتوباسیلوس* را با این روش مجدداً تخلیص کرد. لنتی بیوتیک تخلیص شده علیه پاتوژن های روده‌ای تاثیر بیشتری نشان داد (۲٤).

Archive of SID



www.SID.ir

## نتیجه‌گیری

در این پژوهش باکتری های *اشریشیا کلی* و *باسیلوس سوبتلیس* از بین سویه های بانک میکروبی دانشگاه سمنان توانایی تولید باکتریوسین را داشتند. بیشترین تولید این سویه‌ها، در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت در ۷ pH به صورت اختصاصی علیه *کلبسیلا نمونیه*، *باسیلوس سوبتلیس* و *باسیلوس آنتراسیس* نشان داده شد.

باکتریوسین تغلیظ شده *باسیلوس سوبتلیس* با آمونیوم سولفات (در غلظت ۷۰ درصد) و *اشریشیاکلی* (در غلظت ۵۰ درصد) علیه *کلبسیلا نمونیه* عملکرد بهتری داشت. همچنین باکتریوسین حاصل، قادر به تخریب بیوفیلم تشکیل شده توسط *سودوموناس ائروجینوسا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بود.

تخلیص باکتریوسین تغلیظ شده در غلظت ۵۰ و ۷۰ با کمک کروماتوگرافی لایه نازک، موجب افزایش قطر هاله عدم رشد *کلبسیلا نمونیه* و کاهش قطر هاله عدم رشد *باسیلوس سوبتلیس* گردید. با توجه به پتانسیل ضد بیوفیلمی و ضد میکروبی سویه های مورد بررسی، انجام مطالعات تکمیلی به منظور بهینه سازی شرایط تولید و شناسایی مولکولی نوع باکتریوسین تولیدی پیشنهاد می گردد.

## تشکر و قدردانی

این مقاله مرتبط با نتایج حاصل از طرح پژوهشی شماره ۲۶۶/۹۴/۳۴۶۷ بود که توسط دانشگاه سمنان هزینه شده است. نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه سمنان کمال امتنان را دارند.

## References


1. Prieto ML, O'Sullivan L, Tan SP, McLoughlin P, Hughes H, O'Connor PM, Cotter PD, Lawlor PG, Gardiner GE. Assessment of the bacteriocinogenic potential of marine bacteria reveals lichenicidin production by seaweed-derived *Bacillus* spp. Mar Drugs. 2012; 10(10): 2280-2299.
2. Riley MA, Wertz JE. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. Annu Annual Rev Microbial. 2002; 56(1): 117-137.
3. O'Connor PM, Ross RP, Hill C, Cotter PD. Antimicrobial antagonists against food pathogens: A bacteriocin perspective. Curr Opin Food Sci. 2015; 2: 51-57.
4. Oscariz JC, Lasa I, Pisabarro AG. Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. FEMS Microbiol Lett. 1999; 178.
5. Maróti G, Kereszt A, Kondorosi E, Mergaert P. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. Res Microbiol. 2011; 162(4): 363-374.
6. Chopra L, Singh G, Jena KK, Sahoo DK. Sonorensin: A new bacteriocin with potential of an anti-biofilm agent and a food biopreservative. Sci Rep. 2015; 5: 13412.
7. O'Sullivan O, Hill C, Ross P, Cotter P. Bacteriocin Mining in Metagenomes. Encyclopedia of metagenomics: Springer; 2015. p: 54-60.
8. An J, Zhu W, Liu Y, Zhang X, Sun L, Hong P, Wang Y, Xu C, Xu D, Liu H. Purification and characterization of a novel bacteriocin CAMT2 produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from marine fish *Epinephelus areolatus*. Food Control. 2015; 51: 278-282.
9. Mathur H, C Rea M, D Cotter P, Hill C, Paul Ross R. The sactibiotic subclass of bacteriocins: an update. Curr Protein Pept Sci. 2015; 16(6): 549-558.


Archive of SID



www.SID.ir

**10.** Hassan M, Diep DB, Javadzadeh Y, Dastmalchi S, Nes IF, Sharifi Y, Yari S, Farajnia S, Lotfipour F. Prevalence of bacteriocin activities and bacteriocin-encoding genes in *Enterococcal* clinical isolates in Iran. Can J Microbiol. 2012; 58(4): 359-368.

**11.** Gálvez A, López RL, Pulido RP, Burgos MJG. Application of lactic acid bacteria and their bacteriocins for food biopreservation. Food Biopreservation: Springer, 2014; p: 15-22.

**12.** Kęska P, Stadnik J, Zielińska D, Kołożyn-Krajewska D. Potential of bacteriocins from lab to improve microbial quality of dry-cured and fermented meat products. Acta Sci Pol Technol Aliment. 2017; 16(2): 119-126.

**13.** Prieto ML, O'Sullivan L, Tan SP, McLoughlin P, Hughes H, Gutierrez M, Lane JA, Hickey RM, Lawlor PG, Gardiner GE. In vitro assessment of marine *Bacillus* for use as livestock probiotics. Mari Drugs. 2014; 12(5): 2422-2445.

**14.** Balciunas EM, Martinez FAC, Todorov SD, de Melo Franco BDG, Converti A, de Souza Oliveira RP. Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. Food Control. 2013; 32(1): 134-142.

**15.** Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins- a viable alternative to antibiotics? Nat Rev Microbiol. 2013; 11(2): 95-105.

**16.** Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H, Whitman W. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes: Springer Science & Business Media; 2011.

**17.** Pevsner J. Analysis of genomic DNA with the UCSC genome browser. Bioinformatics for DNA sequence analysis. Methods Mol Biol. 2009; 537: 277-301.

**18.** Mouloud G, Daoud H, Bassem J, Atef IL, Hani B. New bacteriocin from *Bacillus clausii* strainGM17: purification, characterization, and biological activity. Appl Biochem Biotechnol. 2013; 171(8): 2186-2200.

**19.** Bodour AA, Miller-Maier RM. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. J Microbiol Method. 1998; 32(3): 273-280.

**20.** Dunder H. Characterization and purification of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. cremoris: Middle East Technical University; 2006.

**21.** Bakkiyaraj D, Sivasankar C, Pandian SK. Inhibition of quorum sensing regulated biofilm formation in *Serratia marcescens* causing nosocomial infections. Bioorg. Med Chem Lett. 2012; 22(9): 3089-3094.

**22.** Daba H, Pandian S, Gosselin J, Simard R, Huang J, Lacroix C. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. Appl Environ Microbiol. 1991; 57(12): 3450-3455.

**23.** Selvendran M, Babu M. Studies on novel bacteriocin like inhibitory substance (BLIS) from microalgal symbiotic *Vibrio* spp MMB2 and its activity against aquatic bacterial pathogens. J Appl Pharm Sci. 2013; 3(2): 169.

Archive of SID



www.SID.ir

**24.** Biswas A, Banerjee R. A lab originated bacteriocin and its partial purification and demonstration of antimicrobial activity. Int J Curr Microbiol App Sci. 2016; 5(3): 728-737.

**25.** Cherif A, Ouzari H, Daffonchio D, Cherif H, Ben Slama K, Hassen A, Jaoua S, Boudabous A. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1. 7, a new strain isolated from soil. Lett Appl Microbiol. 2001; 32(4): 243-247.

**26.** He Z, Kisla D, Zhang L, Yuan C, Green-Church KB, Yousef AE. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. Appl Environ Microbiol. 2007; 73(1): 168-178.

**27.** Hammami I, Rhouma A, Jaouadi B, Rebai A, Nesme X. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. Lett Appl Microbiol. 2009; 48(2): 253-260.

**28.** Stern NJ, Svetoch EA, Eruslanov BV, Kovalev YN, Volodina LI, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Levchuk VP. *Paenibacillus polymyxa* purified bacteriocin to control *Campylobacter jejuni* in chickens. J Food Prot. 2005; 68(7): 1450-1453.

**29.** Naghmouchi K, Paterson L, Forster B, McAllister T, Ohene-Adjei S, Drider D, Teather R, Baah J. *Paenibacillus polymyxa* JB05-01-1 and its perspectives for food conservation and medical applications. Arch Microbiol. 2011; 193(3): 169-177.

**30.** Motta AS, Cladera-Olivera F, Brandelli A. Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon basin. Braz J Microbiol. 2004; 35(4): 307-310.

**31.** Shelar SS, Warang SS, Mane SP, Sutar RL, Ghosh JS. Characterization of bacteriocin produced by *Bacillus atrophaeus* strain JS-2. Int J Biol Chem. 2012; 6: 10-16.

**32.** Wan X, Li R, Saris PE, Takala TM. Genetic characterisation and heterologous expression of leucocin C, a class IIa bacteriocin from *Leuconostoc carnosum* 4010. Appl Microbiol Biotechnol. 2013; 97(8): 3509-3518.

**33.** Ahern M, Verschueren S, Sinderen D. Isolation and characterisation of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. FEMS Microbiol Lett. 2003; 220(1): 127-131.

**34.** Kamoun F, Mejdoub H, Aouissaoui H, Reinbolt J, Hammami A, Jaoua S. Purification, amino acid sequence and characterization of Bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. J Appl Microbiol. 2005; 98(4): 881-888.

**35.** Al-Mathkhury HJF, Ali AS, Ghafil JA. Antagonistic effect of bacteriocin against urinary catheter associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. N Am J Med Sci . 2011; 3(8): 367.

**36.** Gupta MK, Gauri S, Shrivastava A. Assessment of animicrobial potential of *Bacillus cereus* isolated from extreme environmental condition. J Microbiol Biotechnol Res. 2017; 3(2): 58-63.

Archive of SID



www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 11, No. 2, June 2018

Original Article

# Anti-biofilm and anti-bacterial effects of bacteriocin-producing strains of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*

**Mohammad Reza Sarjoughian[1], Shakiba Darvish Alipour Astaneh[2]**

[1]M.Sc., Faculty of New Science and Technology, Department of Biotechnology, Semnan University, Semnan, Iran.
[2]Assistant Professor, Faculty of New Science and Technology, Department of Biotechnology, Semnan University, Semnan, Iran.

## Abstract

*Background & Objectives*: The prevalence of infection, along with the spread of antibiotic-resistant bacteria has caused the antibacterial peptide, bacteriocins, to be considered. The purpose of this study was to compare the antibacterial effect of bacteriocin-producing bacteria.

*Materials & Methods:* The inhibitory activity of bacteria isolated from different regions of Semnan soil, Dasht Desert (Semnan University Bacterial Culture Collection; DDBCC) was studied against the indicators by agar diffusion method. Candidate strains were identified by biochemical and molecular tests. Concentrating the selected bacteriocins by ammonium sulfate saturation, the effects of biofilm destruction were studied. Then, using a thin layer chromatography the selected bacteriocins were purified and their antimicrobial activity was confirmed.

*Results:* The 16s rRNA sequencing results showed 98% similarity of DDBCC38 and DDBCC51 isolates to *E. coli* and 96% similarity of the DDBCC46 isolate to *Bacillus subtilis*. Concentrated DDBCC51 and DDBCC38 bacteriocins inhibited the growth of Bacillus cereus, *Bacillus anthracis*, and *Klebsiella pneumonia* after 52 hours. *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms were destructed by DDBCC51 and DDBCC38 bacteriocins 12.0% and 40.0%, and 19.6% and 40%, respectively. In contrast, concentrated DDBCC46 bacteriocin was effective on *K. pneumonia* and *P. aeruginosa* in 72 hours but had no effect on biofilm destruction. The purification of DDBCC38 and DDBCC51 bacteriocins by thin layer chromatography resulted in 2 mm increasing of inhibition zone diameter against *K. pneumoniae*. However, purified DDBCC46 bacteriocin reduced it by 4 mm.

*Conclusion:* Considering the anti-biofilm and antagonistic properties of the respective isolates, further studies for optimization of the production conditions and molecular identification of the produced bacteriocin are proposed.

*Keywords:* Bacteriocin, Thin-layer chromatography, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae.*

**Correspondence to**: Shakiba Darvish Alipour Astaneh

Tel: +98 2331533197

E-mail: darvishalipour@semnan.ac.ir

Journal of Microbial World 2018, 11(2): 143-154.



Archive of SID

www.SID.ir