فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
شماره پیاپی ۱۰، جلد ۳، شماره ۳، تابستان ۸۹، صفحه ۳۱ تا صفحه ۳۹

بررسی فعالیت ترکیبات ضد میکروبی سویه‌های باسیلوس بومی ایران، جدا شده از مرغداری‌های اراک

پروانه جعفری[۱]، مریم تاج آبادی ابراهیمی[۲]، شیما رضایی عراقی[۳]

۱- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک. **Parvaneh.jafari@gmail.com**
۲- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی.
۳- کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان.

تاریخ دریافت: ۸۹/٤/۲ تاریخ پذیرش: ۸۹/٦/۱۵

چکیده

هدف از این پژوهش بررسی جداسازی، شناسایی، بررسی فعالیت ضدمیکروبی و تعیین AU باسیلوس‌های جدا شده از مرغداری‌های اراک به‌منظور انتخاب سویه‌های دارای پتانسیل پروبیوتیک بومی است. شناسایی و ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی، با سه روش دولایه، انتشار چاهک و انتشار دیسک علیه باکتری‌های بیماری‌زا اشریشیاکلی انجام و در نهایت سینتیک رشد و AU برترین سویه‌ها از نظر فعالیت ضدمیکروبی تعیین گردید. فعالیت ضدمیکروبی ٤۰ سویه مختلف باسیلوس جداسازی شده از ۱۰ نمونه ارسالی به آزمایشگاه در روش دولایه منجر به انتخاب ۱۵ سویه با حداکثر هاله عدم رشد) بالای ۲۰ میلی متر شد. بررسی هاله عدم رشد این ۱۵ سویه با دو روش انتشار چاهک و دیسک منجر به انتخاب سویه‌های D_2a, A_9a (*B. subtilis, B. pasteurii*) با حداکثر هاله عدم رشد گردید. AU اندازه‌گیری شده برای دو سویه A_9a و D_2a به ترتیب برابر Au/میلی لیتر ٦٤۰۰ و Au/میلی لیتر ۱۲۸۰۰ بود.

کلید واژه: باسیلوس، آنتاگونیسم، روش دولایه، انتشار دیسک و انتشار چاهک

مقدمه

باکتریوسین‌ها ترکیبات ساخته شده ریبوزومی‌هستند که توسط باکتری‌ها، به منظور ممانعت از رشد سایر باکتری‌ها تولید می‌شوند. این ترکیبات از نظر نحوه سنتز، عملکرد و طیف اثر با آنتی‌بیوتیک‌ها تفاوت دارند. باکتریوسین‌ها معمولا روی تنها باکتری‌هایی که ارتباط نزدیک با نژاد تولید کننده آن‌ها دارند، موثر می‌باشند. دارا بودن طیف اثر محدود، مزیت باکتریوسین‌ها است، چرا که از آن‌ها می‌توان به عنوان «داروهای هدف» در مقابل بعضی عوامل بیماری‌زای خاص استفاده نمود، بدون این که فلور طبیعی آسیب ببینند. از این رو باکتریوسین‌ها می‌توانند تا حدودی استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها را محدود و در نتیجه گسترش مقاومت آنتی بیوتیک در باکتری‌های بیماری‌زا را کوچک نموده است(۹،۱۱). باکتریوسین‌های تولید شده توسط باکتری‌های به سه گروه اصلی لانتی‌بیوتیک‌ها، پپتیدهای کوچک با ثبات در مقابل حرارت و پروتئین‌های بزرگ ناپایدار در برابر حرارت تقسیم می‌شوند. گروه‌های اول و دوم به علت فراوانی و استفاده تجاری، طبقات عمده و اصلی باکتریوسین‌ها هستند. نگرانی‌های موجود در ارتباط با گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، افزایش آگاهی مصرف کنندگان درباره خطرات ناشی از استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی، موجب علاقه‌مندی روزافزونی به منظور استفاده از باکتریوسین‌ها به عنوان نگهدارنده

زیستی(Biopreservative) در مواد غذایی پدید آید(۲،۶،۱۱).باسیلوس‌ها باکتری‌های میله‌ای شکل و هوازی می‌باشند که توانایی تولید اسپور داشته و کاربرد بسیار زیادی در بیوتکنولوژی دارند. این باکتری‌ها به واسطه تولید ترکیبات ضد میکروبی بسیار مورد توجه می‌باشند. از این باکتری‌ها در مرغ‌داری‌ها به عنوان پروبیوتیک طیور استفاده می‌شود. این دسته از باکتری‌ها ترکیبات ضد میکروبی تولید نموده و از شیوع باکتری‌های عفونی به خصوص سالمونلا و سایر انتروباکتریاسه‌ها در مرغ داری‌ها ممانعت به عمل می‌آورند. باکتری‌های مذکور از مهم ترین عوامل عفونی مشترک بین دام و انسان هستند. بنابراین ردیابی سویه‌های باسیلوس تولید کننده باکتریوسین علیه باکتری‌های عفونی نه تنها می‌تواند منجر به معرفی سویه‌های پروبیوتیک دامی گردد بلکه این سویه‌ها گزینه‌های مناسبی جهت استخراج باکتریوسین و عرضه آن‌ها به عنوان نگهدارنده زیستی هستند(۳،۵). هدف از این پژوهش جدا سازی، شناسایی باسیلوس‌های بومی از مرغ داری‌ها و بررسی توانایی تولید ترکیبات ضد میکروبی تعیین AU در آن‌ها است. با تعیین فعالیت ضد میکروبی ترکیبات تولیدی امکان کاربرد آن در صنایع و در شرایط مختلف مشخص می‌گردد.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری و جداسازی سویه‌های باسیلوس

برای جداسازی باکتری‌ها، از ۶ مرغ‌داری مختلف ۱۰ نمونه فضولات تازه مرغ تهیه و پس از انتقال به آزمایشگاه به محیط کشت تازه و استریل منتقل شدندنمونه‌ها به نسبت ۱:۱ در بافر آب پپتونه رقیق شده و با استفاده از ورتکس کاملاً مخلوط گردیدند. به‌منظور جداسازی باسیلوس‌ها از روش تیمار حرارتی استفاده شد. لذا، نمونه در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه یا در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ تا ۴۰ دقیقه در بن ماری تیمار شد. نمونه‌های تیمار شده به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق گرماگذاری گردید. بدین ترتیب اسپورها فعال شده و نیاز به تیمار ثانویه برای فعال شدن آن‌ها وجود نداشت. سپس نمونه‌ها به صورت سری رقیق و بر روی نوترین آگار کشت شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند و کلنی‌های تیپیک کاتالاز مثبت، گرم مثبت و میله‌ای شکل دارای اسپور جنس باسیلوس شناسایی و زیر گلیسرول در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند(۷).

شناسایی بیوشیمیایی

ایزوله‌های جداشده از مرحله قبل بر اساس صفات شکلی و بیوشیمیایی مانند آزمون‌های پتاس، حساسیت به ونکومایسین،کاتالاز، حرکت، همولیز، هیدرولیز نشاسته، توانایی مصرف سیترات و پروپیونات، واکنش وژپرسکوئر(VP) و مصرف قندها بر اساس کتاب برگی شناسایی شدند. کلیه آزمایش‌ها بر روی باکتری‌ها در مرحله رشد لگاریتمی صورت گرفته است(۸).

تعیین سینتیک رشد

برای تعیین سینتیک رشد ارلن‌های ۳۰۰ میلی لیترحاوی ۴۵ میلی‌لیتر محیط کشت نوترین براث تهیه و با ۱۰٪ پیش کشت تلقیح و بر روی شیکرانکوباتور با دور **rpm** ۲۰۰، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ساعت گرماگذاری شدند. در فواصل زمانی معین یعنی هر دو ساعت نمونه برداری از ارلن‌ها صورت گرفت و جذب نوری آن اندازه گیری شد. بدین ترتیب الگوی رشدی سویه‌های جدا شده در زمان‌های مختلف تعیین گردید.

خواص ضد باکتریایی

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی سویه‌های جدا شده با سه روش دولایه، انتشار چاهک و انتشار دیسک سنجیده شد. به این منظور از باکتری بیماری زای اشریشیا کلی(ATCC۲۱۴۳) به عنوان اندیکاتور جهت بررسی توانایی آنتاگونیستی استفاده شد. این باکتری‌ها از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی وعفونی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند.

روش دولایه(Colony Overlay Assay)

۵ میکرو لیتراز کشت یک شبه باکتری‌های باسیلوس بر روی پلیت LB agar لکه گذاری و به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد تا کلنی باکتری رشد نموده و قابل مشاهده گردد. سپس پلیت‌ها درون یک ظرف استریل به مدت ۳۰ دقیقه در مجاورت بخار کلروفرم قرار گرفتند. بدین ترتیب سلول‌های باسیلوس رشد یافته کشته شدند. به‌منظور از بین بردن اثرات ضد میکروبی بخار کلروفرم پلیت‌ها از ظرف حاوی بخار کلروفرم خارج و ۲۰ دقیقه در زیر هود میکروبی هوادهی شدند(۹).باکتری اندیکاتور در محیط BHI BROTH (BRAIN HEART INFUSION)دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت در شرایط هوازی گرماگذاری شد. از باکتری اندیکاتور که در فاز لگاریتمی رشد قرار داشتند به میزان ۰/۵٪ به محیط‌های BHI AGAR (۰/۷٪ آگار) استریل تلقیح شد. ۵ میلی‌لیتر از محیط‌های کشت حاوی اندیکاتور روی هر محیط LB AGAR پخش گردید. پس از بسته شدن، به منظور تسریع نفوذ مواد تولید شده توسط باسیلوس‌ها در محیطBHI AGAR محیط‌ها به مدت ۲ ساعت در یخچال نگهداری شدند. در نهایت پلیت‌ها ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرما گذاری شدند. توانایی فعالیت ضد میکروبی سویه‌های مورد بررسی بر اساس قطر هاله عدم رشد باکتری‌های اندیکاتور (MM) تعیین شد(۹).

روش انتشار در چاهک (Agar-Well Diffusion Method (Tag and Mc Given 1971))

در این روش محیط کشت نوترین آگار استریل با ۱٪ از کشت یک شبه باکتری اندیکاتور با غلظت برابر ۰/۵ مک‌فارلند تلقیح و در پلیت پخش شد. پس از بستن آگار چاهک‌هایی به قطر ۵ میلی متردر پلیت حاوی محیط کشت جدا گردید. این چاهک‌ها با کشت ۷۲ ساعت از عصاره کشت سویه‌های باسیلوس پر و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند تا تمام ترکیبات ضد میکروبی درون آگار منتشر گردد. جهت تهیه عصاره کشت باسیلوس‌ها، کشت ۷۲ ساعت باسیلوس‌ها در محیط LB BROTH به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و مایع رویی از توده باکتریایی جدا شد. قسمتی از مایع رویی بدون تغییر pH (عصاره اسیدی) حفظ و pH باقی مایع رویی با سود ۴ مولار در حد ۷ تنظیم گردید(عصاره خنثی). در نهایت عصاره‌ها با عبور از فیلتر ۰/۲میکرو مولار استریل و تا زمان استفاده در دمای معادل ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۱۰). سپس چاهک‌ها با یک قطره از Soft Agar پوشانده و در نهایت پلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای مناسب رشد باکتری اندیکاتور گرماگذاری شدند. توانایی فعالیت ضد میکروبی سویه‌های مورد بررسی بر اساس قطر هاله عدم رشد باکتری‌های اندیکاتور (میلی متر) تعیین شد.

روش انتشار دیسک (Agar Disk Diffusion Method)

در این روش به محیط نوترین آگار استریل با ۱٪از کشت یک شبه باکتری اندیکاتور با غلظت برابر ۰/۵ مک‌فارلند تلقیح و در پلیت پخش شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از عصاره کشت باسیلوس‌ها بر روی این دیسک‌های بلنک اضافه و با فاصله بر روی پلیت‌های مذکور قرار گرفت. در نهایت پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای مناسب رشد باکتری اندیکاتور گرماگذاری شدند. در نهایت وجود و یا عدم وجود هاله ممانعت کننده از رشد باکتری‌های اندیکاتور بر حسب (میلی متر)مورد بررسی قرار گرفتند.

تعیین Arbitrary unit (AU)

برای تعیین تیتر باکتریوسین یا همان تعیین واحد Arbitrary unit (AU)، عصاره سویه‌های باسیلوس مورد آزمایش به صورت سری و با ضریب (۰/۵)رقیق گردیدند. فعالیت ضد میکروبی این عصاره رقیق شده همانند آزمایش‌های قبل سنجیده شد. بدین ترتیب که از این عصاره رقیق شده بر روی پلیت حاوی میکروارگانیزم

اندیکاتور به میزان ۵ میکرو لیتر لکه گذاری و پس از گرماگذاری توانایی ایجاد هاله ممانعت از رشد مورد بررسی قرار گرفت. کم‌ترین وقتی که هاله‌ای حداقل به قطر ۵ میلی مترایجاد کرده بود، انتخاب شد. عکس رقتی که دارای این هاله بود به عنوان AU در واحد میلی‌لیتر انتخاب شد(۱۱).

نتایج

جداسازی باسیلوس‌ها

در مرحله اول ۴۰ ایزوله بر اساس تفاوت‌های ریختی اولیه و شکل ظاهری کلنی انتخاب و جداسازی شد. شکل ظاهری کلنی باکتری‌های جدا شده بسیار متفاوت بود. اندازه بعضی کلنی‌ها کوچک و در بعضی مواقع قطر آن‌ها بیش از ۱ سانتی متر بود(شکل ۱). باکتری‌های جدا شده بعد از خالص سازی با آب اکسیژنه مجاور شدند تا توانایی تولید کاتالاز در آن‌ها بررسی شود. در تمام موارد سویه‌های جدا شده توانایی بارزی در تولید کاتالاز داشتند. به واسطه عدم دسترسی به کیت‌های شناسایی سریع و برای جداسازی سویه‌های احتمالاً بیماری‌زا از تست همولیز استفاده شد.تعدادی از سویه‌های جدا شده توانایی تولید همولیزین داشته و گلبول‌های قرمز را لیز نمودند. در این موارد اطراف کلنی باکتری‌ها هاله‌ای روشن ایجاد می‌شود. در طی این آزمایش بالغ بر ۱۰ سویه جدا شده به واسطه احتمال بیماری‌زایی حذف شدند. در بیشتر موارد باکتری‌های جدا شده توانایی حرکت داشته و پس از مدتی تمامی محیط کدر می‌شد. نکته جالب توجه این که بیشتر سویه‌های فاقد حرکت، همولیز مثبت داشتند. پس از حذف سویه‌های دارای همولیزین، آزمایش‌های بعدی روی ۳۰ سویه‌ی باقی‌مانده صورت گرفت. تمامی سویه‌ها مورد آزمایش توانایی تولید آنزیم آمیلاز را داشته و MR مثبت و VP منفی بودند. توانایی باکتری‌های جدا شده در تخمیر قندها بسیار متفاوت بود. تمامی سویه‌ها توانایی تخمیر گلوکز را داشته و تولید اسید می‌نمودند. ولی قندهایی همانند آرابینوز و گزیلوز تنها توسط تعداد از آن‌ها تخمیر می‌شود(جدول ۱). از بین ۳۰ سویه مورد بررسی ۱۵ سویه که هاله ممانعت بالای ۲۰ میلی‌متر بود برای آزمون‌های ضد باکتریایی انتشار چاهک و انتشار دیسک انتخاب شدند(جدول ۲). از میان ۱۵ سویه مورد بررسی ۲ سویه A_9a و D_2a با قطر هاله عدم رشد بالاتر از ۲۰ میلی متر برترین سویه‌ها از نظر تولید ترکیبات ضد میکروبی شناسایی و جهت بررسی و آزمون‌های بعدی انتخاب شدند. دو سویه انتخابی دارای الگوی مختلف رشدی می‌باشند. سویه A_9a دارای سرعت توانایی رشدی بالاتری است به نحوی که پیش کشت حاصله از آن نیز OD بالاتری داشته از این رو پس از تلقیح رشد را با OD بالاتری آغاز نموده است. سویه $2A_9a$ ساعت دارای فاز تاخیری بوده و پس از آن رشد لگاریتمی خود را آغاز نموده است که تا ساعت ۱۲ نیز ادامه یافته و پس از آن رشد متوقف شده و فاز سکون آغاز شد. سویه D2a

شکل ۱- شکل ظاهری کلنی سویه جدا شده

جدول ۱-نتایج شناسایی بیوشیمیایی سویه‌های باسیلوس جدا شده از مرغداری‌ها

ردیف	کد سویه	جنس و گونه	ردیف	کد سویه	جنس و گونه
۱	A_1a	*B. sphaericus*	۱۶	D_4a	*B. megaterium*
۲	A_4b	*B. polymyxa*	۱۷	D_6a	*B. sphaericus*
۳	B_5a	*B. pumilis*	۱۸	D_7c	*B. subtilis*
۴	A_8b	*B. sphaericus*	۱۹	D_8d	*B. polymyxa*
۵	A_9a	*B. subtilis*	۲۰	E_1a	*B. sphaericus*
۶	B_1a	*B. megaterium*	۲۱	E_3b	*B. pasteurii*
۷	B_7a	*B. polymyxa*	۲۲	E_5b	*B. megaterium*
۸	B_8b	*B. megaterium*	۲۳	E_6f	*B. pasteurii*
۹	C_9c	*B. pumilis*	۲۴	E_9f	*B. pumilis*
۱۰	$C_{10}d$	*B. pasteurii*	۲۵	E_6g	*B. polymyxa*
۱۱	$C_{11}a$	*B. subtilis*	۲۶	E_9g	*B. pumilis*
۱۲	D_2a	*B. pasteurii*	۲۷	F_9a	*B. subtilis*
۱۳	B_3d	*B. polymyxa*	۲۸	F_1c	*B. subtilis*
۱۴	B_4a	*B. subtilis*	۲۹	F_2a	*B. megaterium*
۱۵	B_5b	*B. polymyxa*	۳۰	F_9a	*B. polymyxa*

توانایی رشدی نسبتاً کمتری داشته به نحوی که بیومس اولیه پس از تلقیح ناچیز بود. پس از تلقیح رشد این سویه بلافاصله بدون فاز تاخیر آغاز گشته که این خود مزیتی برای این سویه محسوب می‌شود. رشد این سویه نیز تا ساعت ۱۲ ادامه یافته و سپس فاز سکون آغاز گردید (جدول ۳و نمودار ۱).

تعیین AU

AU اندازه‌گیری شده برای دو سویه A_9a و D_2a به ترتیب برابر ۶۴۰۰ و Au۱۲۸۰۰ برمیلی لیتر بود(شکل ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

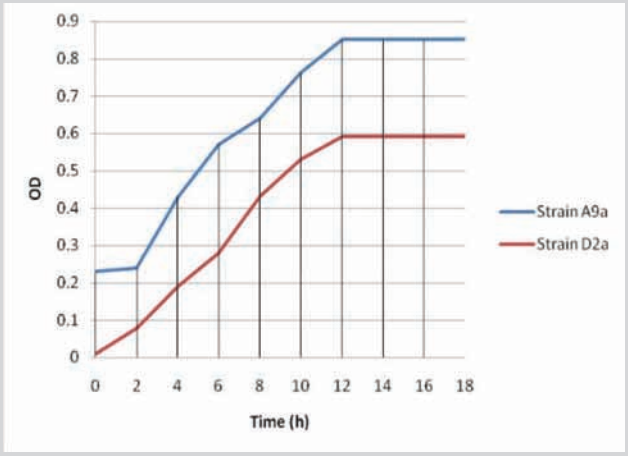
باسیلوس‌ها از جمله میکروارگانیزم‌هایی اسپورداری می‌باشند که کاربرد زیادی داشته و اکثر ترکیبات ضد میکروبی تولید شده توسط این گونه دربرابر باکتری‌های گرم مثبت ازجمله باسیلوس‌سرئوس، باسیلوس‌سوبتیلیس، لیستریا، استرپتوکوکوس‌ها، استافیلوکوکوس‌ها و باکتری‌های گرم منفی ازجله اشریشیاکلی، سالمونلا و سودوموناس موثر می‌باشد. از این رو در این تحقیق سعی شد تا سویه‌هایی از باسیلوس‌های بومی ایران جمع آوری گردد که توانایی تولید ترکیبات ضدمیکروبی داشته باشند(۵). بنابراین در طی آزمایش‌های صورت گرفته گروهی از باسیلوس‌های بومی با توانایی بالای تولید ترکیبات ضد میکروبی جمع‌آوری گردید. این سویه‌ها توانایی تاثیر بر اشریشیا کلی، میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا و آلاینده‌های مواد غذایی را داشتند. این امر می‌تواند نشان

جدول۲- نتایج آزمون‌های انتشار چاهک و انتشار دیسک سویه‌های باسیلوس جدا شده از مرغداری‌ها بر حسب (میلی متر)

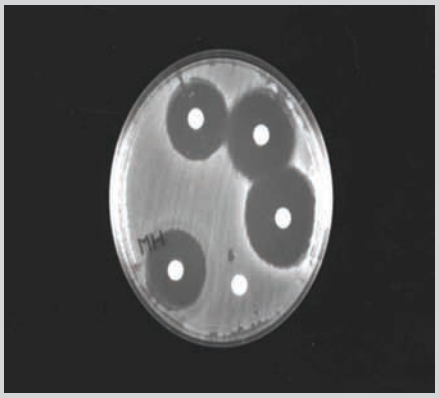
ردیف	کد سویه	جنس و گونه	قطر هاله عدم رشد در روش چاهک (میلی متر)	قطر هاله عدم رشد در روش دیسک (میلی متر)
۱	A_1a	*B. sphaericus*	۱۷±۴	۱۵±۲
۲	A_8b	*B. sphaericus*	۱۶±۳	۱۲±۵
۳	A_9a	*B. subtilis*	۲۵±۴	۲۰±۳
۴	B_5b	*B. polymyxa*	۱۰±۲	۶±۲
۵	$C_{10}d$	*B. pasteurii*	۸±۵	۶±۲
۶	$C_{11}a$	*B. subtilis*	۱۳±۳	۱۴±۳
۷	D_2a	*B. pasteurii*	۲۷±۲	۲۴±۳
۸	B_3d	*B. polymyxa*	۱۳±۴	۱۰±۶
۹	D_7c	*B. subtilis*	۹±۳	۱۰±۱
۱۰	E_1a	*B. sphaericus*	۳±۲	۵±۲
۱۱	E_3b	*B. pasteurii*	۱۷±۷	۱۶±۵
۱۲	E_6f	*B. pasteurii*	۱۶±۷	۱۵±۶
۱۳	E_6g	*B. polymyxa*	۷±۲	۵±۲
۱۴	E_5b	*B. megaterium*	۱۶±۴	۱۲±۳
۱۵	F_9a	*B. polymyxa*	۱۶±۵	۱۵±۶

جدول ۳- جذب نوری سویه A_9a و D_2a در زمان‌های مختلف

	جذب نوری(OD)	
زمان(ساعت)	A_9A	D_2A
0	۰/۲۳	۰/۰۱
2	۰/۲۴	۰/۰۷۷
4	۰/۴۳	۰/۱۹
6	۰/۵۷	۰/۲۸
8	۰/۶۴	۰/۴۳
10	۰/۷۶	۰/۵۳
12	۰/۸۵	۰/۵۹
14	۰/۸۵	۰/۵۹
16	۰/۸۵	۰/۵۹
18	۰/۸۵	۰/۵۹



نمودار۱- سینتیک رشد دو سویه A_9a و D_2a



شکل۲-ایجاد هاله در غلظت‌های مختلف عصاره باکتری از سویه A_9a

دهنده کاربرد و مصارف گوناگون آن‌ها بر حسب نیاز باشد. از بین سویه‌های جدا شده تعداد زیادی توانایی ممانعت از رشد باکتری اندیکاتور را داشتند، بررسی تمامی آن‌ها کاری بسیار وقت‌گیر با صرف هزینه زیاد بود از این رو ۲۰ سویه‌ای که در روش دولایه توانایی ممانعت از رشد اشریشیا کلی را داشتند انتخاب و بررسی توانایی آنتاگونیسمی با دیگر روش‌های انتشار دیسک و انتشار در چاهک روی آن‌ها صورت گرفت. نتایج دو آزمون انتشار دیسک و انتشار در چاهک با عصاره باسیلوس‌های انتخاب شده از مرحله قبل نشان داد که ۱۵ سویه توانایی ایجاد هاله عدم رشد را ندارند. این نتیجه نشان دهنده آن است که باکتریوسین چنین سویه‌هایی متصل به غشاء سلولی بوده و پس از سانتریوفوژ در عصاره حاصله آزاد نمی‌شود(۱۲،۱۶). بررسی‌ها نشان داد دو سویه A_9a ,D_2a بالاترین میزان باکتریوسین تولیدی ترتیب برابر ۱۲۸۰۰ و ۶۴۰۰ را دارند. سویه A_9a علاوه بر تولید ترکیب ضدباکتریایی قوی‌تر، توانایی رشدی بالاتری را نیز نشان داد که نشان دهنده برتری این سویه بود. این نتایج با پژوهش‌های صورت گرفته توسط بسیاری از دانشمندان دیگر نیز هم‌خوانی داشت. M. Yousaf در سال ۱۹۹۷ در پاکستان موفق به جداسازی سویه‌هایی از *B.licheniformis* گشت که توانایی تولید باکتریوسین داشته و امکان استفاده از آن‌ها به عنوان نگهدارنده مواد غذایی وجود داشت و مشاهده کرد که میزان باکتریوسین تولیدی توسط این باکتری ۶۴۰۰ Au برمیلی لیتر است(۱۵). A. Paulo و همکارانش در سال ۲۰۰۷ توانستند سویه‌هایی از باسیلوس را جدا کنند که از عفونت سالمونلایی در بوقلمون ممانعت می‌نمود. ترکیب ضدمیکروبی تولید شده این باکتری در دامنه pH ۱ تا ۱۰

فعال باقی می‌ماند ولی با تیمار پاپائین، آلفا کیموتریپسین، تریپسین و پروتئیناز K کاملاً غیرفعال می‌گشت(۱۰). Yilmaza در سال ۲۰۰۶ ویژگی‌های آنتی‌بیوتیک سویه‌های باسیلوس جدا شده از خاک را بررسی نمود که میزان باکتریوسین تولید شده توسط آن ۶۴۰۰ Au برمیلی لیتر بود(۱۴). مقایسه نتایج حاصل از این بررسی با دیگر تحقیقات صورت گرفته نشان می‌دهد دو سویه D_2a, A_9a از توانایی آنتاگونیسمی بالایی برخوردار هستند. از آن جا که منبع جداسازی این باکتری‌ها مرغداری بوده، احتمالا این سویه‌ها توانایی کلونی زاسیون در روده مرغ را دارند و این سویه‌ها گزینه‌های مناسبی جهت بررسی‌های تکمیلی in vivo هستند. بدیهی است در صورت تایید این نتایج در شرایط in vivo و ارزیابی‌های ایمنی این سویه‌ها به عنوان پروبیوتیک‌های بومی ایران معرفی خواهند شد.

منابع

1.Barbosa, T.M. (2005) Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. Applied and Environmental Microbiology, 71(2); 968.

2.Barefoot, S.F., Klaenhammer, T.R.(1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Applied and Environmental Microbiology, 45(6); 1808.

3.Bernhard, K., Schrempf, H. , Goebel, W.(1978).Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 133(2); 897.

4.Chu, H.P.(1949).The Lecithinase of B*acillus cereus* and its Comparison with *Clostridium welchii* {alpha}-toxin. Microbiology, 3(2); 255.

5.Cladera-Olivera, F., Caron, G.R., Brandelli, A.(2004). Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology.Biochemical Engineering Journal, 21(1); 53-58.

6.Cleveland, J.(2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology, 71(1); 1-20.

7.Coeuret, V.(2003). Isolation, characterisation and identification of *lactobacilli focusing* mainly on cheeses and other dairy products. Le Lait, 83(4); 269-306.

8.Garrity, G.M.(2005).Bergey's manual of systematic bacteriology.

9.Hoover, D.G. , Steenson, L.R.(1993).Bacteriocins of *lactic* acid bacteria. Academic Press.

10. Paulo, A., Vicente ,I. R. , Albertina,A. (2007). Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. Brazilian Journal of Microbiology, 38;704-709.

11. Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W.(1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 40(3); 722.

12. Touré, R.(2003).Production of antibacterial substances by *Bifidobacterial* isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. Journal of Applied Microbiology, 95(5);1058-1069.

13. Upreti, G.C. , Hinsdill, R.D.(1973).Isolation and characterization of a Bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 4(4); 487-494.

14. Yilmaza,M., Sorana,H., Beyatlib,Y.(2006). Antimicrobial activities of some *Bacillus spp*. strains isolated from the soil.Microbiological Research,161;127-131.

15. Yousaf,M.(1997). Study on the cultural conditions for the production of antibiotic bacteriocin

by *Bacillus licheniformis*, department of chemistry Islamic university, Bahawalpure,Pakistan.

16. Zajdel, J.K., Ceglowski, P. , Dobrazanski, W.T.(1985). Mechanism of action of *lactostrepcin* 5, a bacteriocin produced by *Streptococcus cremoris* 202. Applied and Environmental Microbiology, 49(4); 969.