Archive of SID

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2017; 19(116): 68-78

Evaluation of Antimicrobial Activity of *Bacillus* Strains Isolated from Various Resources

Mohsen Golnari Maranni[1], Mohammad Rabbani Khourasgani[2*], Mohammad Ali Asadollahi[3], Rasoul Shafiei[4]

1.Msc, Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran
2.Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
3.Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran
4.Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Received: 24 Sep 2016, Accepted: 2 Nov 2016

Abstract

Background: Prevalence extension of antibiotic resistant bacteria has raised concerns about control of infections especially nosocomial infections. Many attempts have been done to replace antibiotics or limit their use. The use of antimicrobial agents produced by bacteria as antibiotic replacement has been promising in recent years. The goal of this study was to isolate *Bacillus* strains and evaluate their antimicrobial activity against some standard pathogens and clinical antibiotic resistant strains.

Materials and Methods: In the present study, *Bacillus* strains were isolated from various resources and identified by 16S rDNA PCR method. Then, the phylogenetic tree of the isolates was constructed and antimicrobial activity of the isolates was investigated against some standard pathogens and clinical antibiotic resistant strains using spotting and well diffusion methods.

Results: Eight *Bacillus* strains were isolated from 15 different samples. Based on the molecular identification, the isolates were identified as *B.pumilus*, *B.coagulans*, *B.licheniformis*, *B.endophitycus* and *B.amiloliquefaciens*. The results showed that isolates have antimicrobial activity against meticilin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin resistant enterococci, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Streptococcus* and *Escherichia coli*.

Conclusion: In this study, isolated *Bacillus* strains produced antimicrobial agents against pathogens and antibiotic resistant strains and inhibited their growth.

Keywords: Antimicrobial activity, *Bacillus*, Meticilin-resistant *Staphylococcus aureus*, Vancomycin resistant enterococci

*Corresponding Author:
Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
Email: m.rabbani@biol.ui.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۹، شماره ۱۱ (شماره پیاپی ۱۱۶)، بهمن ۱۳۹۵، ۷۸-۶۸

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی سویه‌های باسیلوس جدا شده از منابع مختلف

محسن گلناری مرنی[۱]، محمد ربانی خوراسگانی[۲*]، محمدعلی اسداللهی[۳]، رسول شفیعی[۴]

۱.کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فن‌آوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲.دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۳.استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فن آوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۴.استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۷/۰۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۸/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: گسترش شیوع باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک باعث ایجاد نگرانی‌هایی در زمینه‌ی کنترل عفونت‌ها به ویژه عفونت‌های بیمارستانی شده است. تلاش‌های زیادی برای محدود کردن مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها یا جایگزینی آن‌ها صورت گرفته است. استفاده از مواد ضد میکروبی تولید شده توسط باکتری‌ها به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها در سال‌های اخیر نوید بخش بوده است. هدف از این مطالعه، جداسازی و بررسی فعالیت ضد میکروبی سویه‌های باسیلوس بر ضد تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا و مقاوم به آنتی‌بیوتیک بالینی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، سویه‌های باسیلوس از منابع مختلف جداسازی و به روش 16S rDNA PCR شناسایی شدند. سپس درخت فیلوژنتیک سویه‌ها رسم شد و فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها در مقابل تعدادی از سویه‌های بیماری‌زا و مقاوم به آنتی بیوتیک بالینی به دو روش لکه‌گذاری و چاهک گذاری بررسی شد.

یافته‌ها: ۸ سویه‌ی باسیلوس از ۱۵ نمونه‌ی مختلف جداسازی شد. براساس شناسایی مولکولی، سویه‌ها مربوط به گونه-های باسیلوس پومیلوس، باسیلوس کواگولانس، باسیلوس لایکنی فورمیس، باسیلوس اندوفیتیکوس و باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس بودند. نتایج حاکی از فعالیت ضدمیکروبی سویه‌ها بر ضد استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، انتروکوکوس فکالیس مقاوم به ونکومایسین، کبسیلا، اسینتوباکتر، سالمونلا، شیگلا، لیستریا، استرپتوکوکوس و اشریشیا کلای بود.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، سویه‌های باسیلوس جدا شده با تولید ماده‌ی ضد میکروبی بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا و مقاوم به آنتی‌بیوتیک، باعث ممانعت از رشد آن‌ها شدند.

واژگان کلیدی: فعالیت ضدمیکروبی، باسیلوس، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، انتروکوکوس فکالیس مقاوم به ونکومایسین

***نویسنده مسئول:** ایران، اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

Email: m.rabbani@biol.ui.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

مقدمه

ظهور مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها در سال‌های اخیر، مطالعات دانشمندان را به سمت یافتن عوامل ضد میکروبی جدید و قوی سوق داده است(۱). گرچه اغلب مقاومت‌ها در محیط‌های بیمارستانی و عفونت‌های مرتبط با آن مشاهده شده است، اما شواهد درباره‌ی مقاومت آنتی‌بیوتیکی عوامل بیماری‌زای حاصل از مواد غذایی در حال افزایش است. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در غذای حیوانات از دلایل وقوع این نوع مقاومت است(۲). اخیرا نیز برخی عفونت‌های باکتریایی به دلیل افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، شیوع مجدد پیدا کرده است. این باکتری‌ها می‌توانند در حضور آنتی بیوتیک‌ها زنده بمانند و حتی تکثیر شوند. بروز و شیوع باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین(Meticilin-resistant *staphylococcus aureus* یا MRSA) و *انتروکوکوس فکالیس* مقاوم به ونکومایسین (Vancomycin-resistant enterococci یا VRE)، مشکلات جدی در زمینه‌ی سلامت عمومی جهانی ایجاد کرده است(۳). در نتیجه ضرورت دست‌یابی به مواد ضدمیکروبی جدید که دارای ویژگی‌های فارماکوکینتیک مناسب و پروفایل ایمنی باشد و بتواند در مقابل عوامل بیماری‌زای مقاوم فعالیت داشته باشد، روز به روز بیشتر می‌شود(۴). به طور مشابه، مواد ضدمیکروبی طبیعی نیز برای کابردهای غذایی نیز مورد نیاز است(۵). بعضی از باکتری‌ها با تولید ترکیباتی مثل اسیدهای آلی، اتانول، پراکسید هیدرژن و ترکیبات پروتئینی شبیه باکتریوسین(Bacteriocin)، اثر ضدمیکروبی خود را اعمال می‌کنند. برخی از گونه‌های باسیلوس نیز قارند آنتی‌بیوتیک‌ها را به عنوان متابولیت‌های ثانویه در فازهای مختلف رشد لگاریتمی، تأخیری یا فاز سکون اولیه، درکشت غیرمداوم تولید کنند(۶). استفاده از باکتریوسین‌ها به جای آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم امید بخش بوده است(۷). علاوه بر این جدایه‌های باکتریایی جنس باسیلوس ممکن است در آینده کاندیدای مناسبی برای کاربرد به عنوان منبع جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های پپتیدی باشد. در همین راستا هدف از این مطالعه جداسازی سویه‌های باسیلوس دارای فعالیت ضدمیکروبی بود. ابتدا جدایه‌ها به روش مولکولی شناسایی شده و درخت فیلوژنتیک برای آن‌ها رسم شد. در نهایت فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌ها در مقابل تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا و مقاوم به آنتی‌بیوتیک مانند MRSA و VRE، بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌ها

نمونه‌گیری از منابعی چون لبنیات بومی، خاک و فضولات تازه‌ی دام و طیور، مناطق مختلف استان‌های اصفهان و اردبیل انجام شد. نمونه برداری در ظروف نمونه‌گیری استریل و با سواپ و اسپاتل استریل انجام شد و در کم‌ترین زمان ممکن به آزمایشگاه زیست فناوری دانشگاه اصفهان منتقل شد.

جداسازی سویه‌های باسیلوس

برای حذف باکتری‌های رویشی و فعال‌سازی اسپورها، از روش تیمار حرارتی استفاده شد. بدین‌صورت که یک گرم از نمونه‌های خشک و یک میلی‌لیتر از نمونه‌های مایع به ۱۰ میلی‌لیتر سدیم‌سیترات ۲ درصد استریل اضافه و در شیکر با دور ۱۵۰ rpm به مدت ۴ ساعت هم زده شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد در بن ماری قرار داده شد. ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های تیمار شده به ۱۰ میلی‌لیتر از محیط MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) مایع تلقیح شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت از گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۱۰۰ میکرو لیتر از هر نمونه‌های رشد کرده بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت MRS آگار پخش شده و در شرایط مشابه گرم‌خانه‌گذاری شدند.کلنی‌های ظاهر شده، سه مرتبه به صورت چهار قسمتی بر روی محیط نوترینت آگار کشت مجدد داده شده و خالص شدند. غربالگری جدایه‌ها با استفاده از رنگ آمیزی گرم، آزمون کاتالاز و رنگ‌آمیزی اسپور انجام شد(۸، ۹).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

شناسایی جدایه‌ها و رسم درخت فیلوژنتیک

به منظور شناسایی جدایه‌ها از روش مولکولی PCR 16S rDNA استفاده شد. بدین منظور ابتدا ژنوم جدایه‌ها استخراج شده و واکنش PCR 16S rDNA با آغازگرهای عمومی 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAC) و 1492R (CGGTTACCTTGTTACGACTT) انجام گرفت. شرایط واکنش PCR در جدول ۱ آورده شده است. پس از مشاهده‌ی باند واضح بر روی ژل آگارز و عدم وجود باند غیراختصاصی و اسمیر برای هر یک از جدایه‌ها، محصول PCR برای توالی‌یابی به شرکت ژن فن‌آوران تهران ارسال شد. توالی‌های حاصل از آغازگرهای رفت و برگشت، پس از دریافت به وسیله نرم افزار CLC Main Workbench ویرایش و به هم متصل شدند. سپس برای تشخیص جنس و گونه باکتری به سایت مرکز بین‌المللی اطلاعات بیوتکنولوژی(NCBI) مراجعه و نتایج توالی‌یابی Blast شد. هم‌چنین با استفاده از توالی جدایه‌ها و نرم افزار MEGA 6.06، درخت فیلوژنتیک برای جدایه‌های شناسایی شده رسم شد(۱۰).

جدول ۱. شرایط دمایی انجام واکنش PCR با آغازگرهای ۲۷F و ۱۴۹۲R

ژن هدف	16S rDNA	
دمای ذوب اولیه	۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه	
دمای ذوب	۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه	
دمای اتصال آغازگر	۵۸ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه	۳۰ چرخه
دمای گسترش	۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه	
دمای گسترش نهایی	۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه	

بررسی فعالیت ضدمیکروبی

فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌ها با دو روش لکه‌گذاری و چاهک گذاری بر ضد تعدادی از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان الزهرا(س) اصفهان و هم‌چنین چندین سویه‌ی استاندارد بیماری‌زا(جدول ۳)، بررسی شد. باکتری‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی شامل MRSA، VRE، *اشریشیا کلای*(ESBL)، *کلبسیلا پنومونیه*، *انتروکوکوس فاسیوم* و *اسینتوباکتر بومانی* و سویه‌های استاندارد شامل *استافیلوکوکوس‌اورئوس* ATCC25923، شیگلاسونئی ATCC9290، *لیستریا مونوسیتوژنز* ATCC7624، *اشریشیا کلای* ATCC25922، *سالمونلا تیفی‌موریوم* PTCC1609 و *استرپتوکوکوس پایوژنز* PTCC1762 بودند. ابتدا قدرت رقابتی جدایه‌ها در مجاورت باکتری‌های بیماری‌زا و سپس توانایی جدایه‌ها برای تولید ترکیبات ضد میکروبی بررسی شد.

روش لکه‌گذاری

در این روش از کشت مایع ۲۴ ساعته جدایه‌ها به مقدار ۲ میکرولیتر بر روی محیط مولر-هینتون آگار(MHA) لکه‌گذاری شد. پس از خشک شدن محل‌های لکه‌گذاری شده، از کشت باکتری‌های بیماری‌زا واستاندارد در محیط MHA soft agar (۰/۷ درصد آگار) به مقدار cfu/ml 10^6 سوسپانسیون تهیه و بر روی پلیت‌های لکه‌گذاری شده ریخته شد. پس از گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ظهور هاله‌ی عدم رشد در ساعت‌های ۲۴ و ۴۸ بررسی شد(۱۱، ۱۲).

روش چاهک گذاری

برای انجام این روش ابتدا باکتری‌های بیماری‌زا و هم‌چنین جدایه‌های باسیلوسی به صورت جداگانه به ترتیب در محیط BHI و TSB مایع کشت داده شدند. پس از یک شب گرم‌خانه‌گذاری، مقدار cfu/ml 10^6 از باکتری‌های بیماری‌زا تهیه و بر سطح پلیت حاوی محیط

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

MHA کشت داده شد. با انتهای پیپت پاستور استریل با فاصله‌ی چند سانتی‌متر از لبه پلیت چند چاهک ایجاد گردید که حدود ۳-۴ سانتی‌متر از هم فاصله داشتند. ۲ میلی‌لیتر از کشت مایع جدایه‌ها به میکروتیوب‌های استریل انتقال یافته و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. سپس محلول فاز رویی با فیلتر غشایی ۰/۲۲ میکرونی برای جدا شدن سلول‌ها از محلول، صاف شد و به میزان ۶۰ میکرولیتر از این محلول داخل چاهک‌ها ریخته شد و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری شدند. میزان قطر هاله‌ی عدم رشد اطراف چاهک‌ها بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد(۸، ۱۳).

یافته‌ها

جداسازی و شناسایی جدایه‌ها

از ۱۵ نمونه مختلف لبنی، خاک و فضولات دام و طیور ۸ سویه جداسازی شد. باکتری‌های جدا شده مربوط به نمونه‌های فضولات و خاک بودند. نمونه‌های لبنی که شامل ۳ نمونه‌ی شیر، ۳ نمونه‌ی پنیر و ۱ نمونه‌ی آب ماست بودند، سویه‌ی باکتری اسپورزا نداشتند. نتایج غربال‌گری جدایه‌ها نشان داد که همه جدایه‌ها، باکتری‌های گرم مثبت، تولید کننده آنزیم کاتالاز و دارای اسپور می‌باشند. نتایج توالی‌یابی محصول PCR به دست آمده از ژنوم جدایه‌ها نشان دهنده‌ی یک توالی در حدود ۱۵۰۰جفت بازی بود. هم ردیفی توالی به دست آمده با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌های NCBI با استفاده از ابزارBLAST انجام گرفت. نتایج هم ردیفی نشان دهنده‌ی تشابه ۹۹ درصدی توالی به توالی ژن 16S rDNA باکتری‌های باسیلوس بود. توالی ژنی 16S rDNA سویه‌های جداسازی شده، پس از شناسایی در بانک ژنی سایت NCBI ثبت شد. جزئیات باکتری‌های جداسازی شده و کد دسترسی سویه‌ها در سایت NCBI در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲. ویژگی‌های سویه‌های باسیلوس جدا شده

ردیف	نام نمونه	منبع نمونه	محل نمونه‌گیری	باکتری جدا شده	کد دسترسی در NCBI
۱	Ma1b	فضولات مرغ	اردبیل	*باسیلوس لایکنی‌فورمیس*	KX270723
۶	KHK	خاک کشاورزی	اصفهان	*باسیلوس کواگولانس*	KX261624
۱۰	Ge1	فضولات گاوی	اصفهان	*باسیلوس پومیلوس*	KX270719
۱۱	SHE	فضولات شتر	اصفهان	*باسیلوس آمیلولیکویی فاسینس*	KX270728
۱۲	GB	فضولات گوسفند	اصفهان	*باسیلوس اندوفیتیکوس*	KX261623
۱۳	G1	فضولات گوسفند	اصفهان	*باسیلوس پومیلوس*	KX270718
۱۴	Ga1a	فضولات گاو	اردبیل	*باسیلوس پومیلوس*	KX261622
۱۵	GUA	فضولات گوساله	اردبیل	*باسیلوس لایکنی‌فورمیس*	KX270722

طبق آزمون شناسایی، ۸ جدایه‌ی باسیلوس شامل ۳ سویه‌ی *باسیلوس پومیلوس*، ۲ سویه‌ی *باسیلوس لایکنی فورمیس*، ۱ سویه‌ی *باسیلوس کواگولانس*، ۱ سویه‌ی *باسیلوس اندوفیتیکوس* و ۱ سویه‌ی *باسیلوس آمیلو لیکوئی فاسینس* بود.

رسم درخت فیلوژنتیک

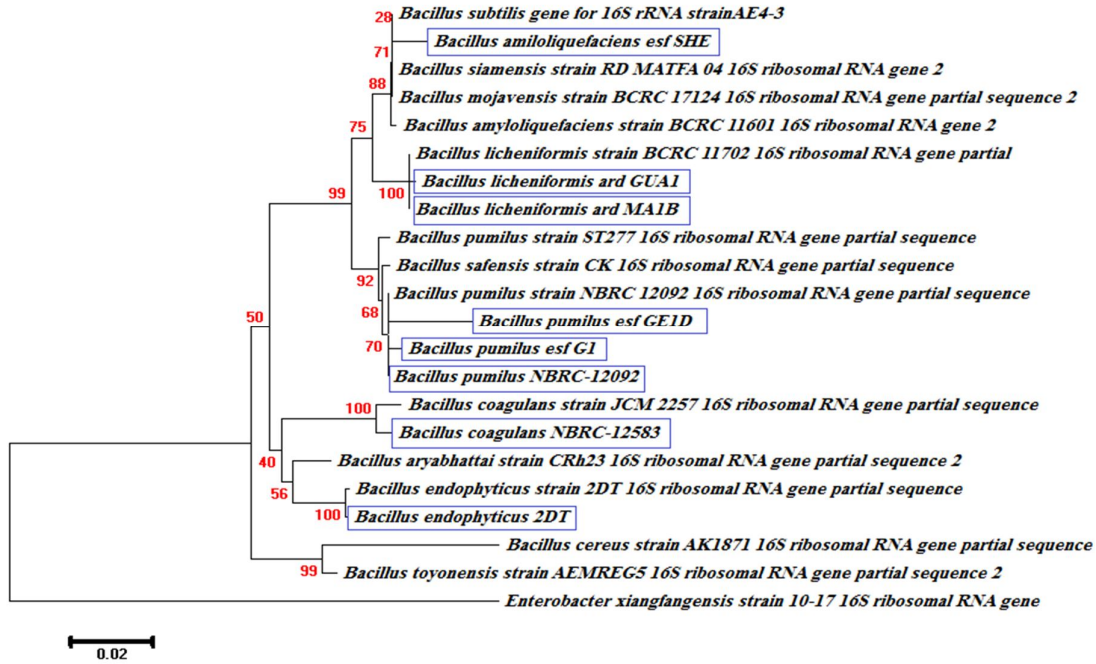
بعد از توالی‌یابی و شناسایی جدایه‌ها، درخت فیلوژنتیک سویه‌ها رسم شد(شکل ۱). هم ردیفی توالی ژن 16S rDNA نمونه‌ها به همراه تعدادی از گونه‌های جنس باسیلوس به روش MUSCLE در برنامه MEGA 6.06 انجام گرفت و سپس ارتباط تبارشناسی سویه‌ها با روش

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

الحاق همسایگی مشخص شد. هم‌چنین درخت تبارشناختی رسم شده، توسط گونه‌ی *انتروباکتر زیانگ فانجسیس* به عنوان گروه خارجی(out group)، ریشه‌دار گردید. ارزش بوت استرپ با بیان درصد از ۱۰۰۰ تکرار در بالای شاخه‌ها نشان داده‌شده است و شاخه‌های بالای ۵۰ درصد ارزش قابل استناد محسوب شد که طبق شکل ۱ شاخه‌های ایجاد شده برای همه‌ی جدایه‌ها بالای ۵۰ درصد است.



شکل ۱. درخت فیلوژنتیک سویه‌های باسیلوس جدا شده
سویه‌هایی که در کادر قرار گرفته‌اند، مربوط به باسیلوس‌های جدا شده در این مطالعه هستند.

نتایج بررسی فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌ها

روش لکه‌گذاری

فعالیت ضدمیکروبی سویه‌ها بر ضد تعدادی از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک که در بیمارستان الزهرا(س) اصفهان از نمونه‌های بالینی جداشده بودند و هم‌چنین چندین سویه استاندارد بیماری‌زا، به روش لکه‌گذاری بررسی شد. در صورت وجود هاله عدم رشد بیش از ۲ میلی‌متر اطراف کلنی جدایه‌ها، برای بررسی تولید ترکیبات ضدمیکروبی بررسی شد. این روش در واقع یک غربال‌گری اولیه برای انتخاب سویه‌ها به منظور بررسی بیشتر در روش چاهک گذاری بود. در این روش هاله‌ی عدم رشد تعدادی از نمونه‌های بیماری‌زا و استاندارد در مقابل باسیلوس‌ها مشاهده شد یعنی باسیلوس‌ها نسبت نمونه‌های بیماری‌زا قدرت رشد رقابتی نشان دادند. بنابراین همه‌ی جدایه‌ها برای بررسی فعالیت ضدمیکروبی در روش چاهک گذاری، انتخاب شدند.

روش چاهک گذاری

تولید ترکیبات ضدمیکروبی جدایه‌ها با بررسی هاله عدم رشد اطراف چاهک‌ها مشخص شد (شکل ۲)، که نتایج آن در جدول ۳ آورده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

شکل ۲. نمونه‌ای از پلیت چاهک‌گذاری شده برای تعدادی از سویه‌ها در مقابل *استافیلوکوکوس اورئوس*

همان طور که در شکل مشاهده می‌شود *باسیلوس پومیلوس* و به مقدار کمی *باسیلوس لایکنی فورمیس* رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* را مهار کرده‌اند.

جدول ۳. اندازه قطر هاله عدم رشد اطراف چاهک‌ها برحسب میلی‌متر در روش چاهک‌گذاری

باکتری بیماری‌زا / جدایه ی باسیلوس	*K.pneumoniae*	MRSA	*E.faecium*	VRE	*A.baumannii*	*S.typhimurium*	ESBL	*S.sonnei*	*L.monocytogenes*	S. pyogenes	*S.aureus*	*E.coli*
B.pumilus esf G1	–	–	–	۱۲	–	۲۰	–	۱۵	–	۱۱	–	–
B.endophyticus 2DT	–	–	–	–	–	۱۵	–	۹	۱۲	۱۷	–	۱۴
B.licheniformis ard MA1B	–	–	–	–	–	–	–	۹	–	۱۴	–	–
B.coagulans NBRC-12583	۱۷	–	۱۶	–	–	–	–	۱۶	–	–	–	–
B.pumilus NBRC-12092	–	–	۱۲	–	–	–	–	۱۸	–	۱۷	۱۴	۹
B.amiloliquefaciens esf SHE	–	۲۳	۱۵	۱۵	۱۳	–	–	–	۸	–	–	–
B.pumilus esf GE1D	۱۰	۱۱	۱۱	۱۵	–	۱۲	–	۱۱	۱۶	–	۱۲	۱۰
B.licheniformis ard GUA1	۱۷	–	۱۳	–	–	–	–	۱۶	–	۲۲	۹	–

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

بیش‌ترین طیف فعالیت ضد میکروبی مربوط به باسیلوس پومیلوس سویه‌ی esf-GE1 و کم‌ترین فعالیت مربوط به باسیلوس لایکنی فورمیس سویه‌ی ard-MA1B بود. به طوری که از بین ۱۲ نمونه باکتری بیماری‌زای بررسی شده، باسیلوس پومیلوس سویه‌ی esf-GE1D رشد ۹ باکتری را محدود کرده و هاله‌ی عدم رشد در برابر آن‌ها نشان داد و باسیلوس لایکنی فورمیس سویه‌ی ard-MA1B فقط در برابر ۲ نمونه فعالیت ضدمیکروبی داشت. بیش‌ترین میزان هاله‌ی عدم رشد با قطر ۲۳ میلی‌متر مربوط به باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس سویه‌ی esf-SHE در برابر MRSA و کم‌ترین میزان هاله نیز مربوط به همین سویه در برابر لیستریا مونوسیتوژنز بود. اکثر سویه‌ها در مقابل باکتری گرم منفی شیگلا سونئی فعالیت ضدمیکروبی نشان دادند به طوری که نتایج نشان داد که از بین ۸ سویه‌ی جداسازی شده، ۷ سویه در مقابل ین باکتری فعالیت ضد میکروبی دارد. فقط سویه‌ی باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس esf-SHE در برابر استوباکتر بومانی فعالیت ضدمیکروبی داشته و هم‌چنین جدایه‌ها در مقابل سایر باکتری‌های گرم منفی از جمله اشریشیا کلای، کلبسیلا پنومونیه و سالمونلا تایفی موریوم فعالیت ضدمیکروبی داشتند. هیچ‌کدام از سویه‌ها در مقابل ESBL، فعالیت ضدمیکروبی نشان ندادند.

بحث

در سال‌های اخیر عفونت‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک مانند استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و انتروکوکوس فکالیس مقاوم به ونکومایسین گسترش یافته و روز به روز رو به افزایش است. یکی از راهکارهای دانشمندان برای غلبه به این بیماری‌ها استفاده از مواد ضدمیکروبی جدید مانند باکتریوسین‌ها می‌باشد(۷).

در این مطالعه نیز فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌های باسیلوس در مقابل تعدادی از باکتری‌های معرف گرم مثبت و منفی و هم‌چنین تعدادی از نمونه‌های بیمارستانی مقاوم به آنتی‌بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت. همه‌ی جدایه‌های باسیلوس در این مطالعه متعلق به گونه‌های باسیلوس کواگولانس، باسیلوس اندوفیتیکوس، باسیلوس لایکنی فورمیس، باسیلوس پومیلوس و باسیلوس آمیلولیکوئی-فاسینس بودند. به منظور بررسی و شناسایی موقعیت فیلوژنتیک جدایه‌ها، رابطه‌ی فیلوژنتیکی جدایه‌های باسیلوسی با تعدادی از گونه‌های جنس باسیلوس و طبقه‌های مرتبط با آن بر اساس تحلیل توالی 16S rDNA صورت گرفت. الگوی شاخه بندی بر اساس روش الحاق همسایگی صورت گرفت. اگر از ۱۰۰۰ تکرار بوت استرپ، درصد به دست آمده بالای ۵۰ درصد باشد، اعداد بالای شاخه‌ها ارزش دارد. مطالعه‌ی اولگ و همکاران(۱۴) در زمینه‌ی جداسازی باسیلوس اندوفیتیکوس از بافت‌های داخلی گیاهان پنبه و هم‌چنین مطالعات نیازی و همکاران(۱۵) در زمینه‌ی جداسازی و شناسایی باسیلوس آمیلولیکویی فاسینس زیر سویه پلانتاروم نیز بر همین اساس بود.

در این مطالعه باکتری باسیلوس اندوفیتیکوس برای اولین بار از فضولات گوسفندی اصفهان جداسازی شد. این باکتری، اولین بار در سال ۲۰۰۲ از بافت داخلی گیاهان پنبه جداسازی شد(۱۴). سپس نگین تاجی و همکاران(۱۶) به منظور تولید زیستی پلی هیدروکسی آلکانوئات باکتری باسیلوس اندوفیتیکوس را از تالاب شور مهارلو واقع در جنوب ایران، جداسازی کردند. اخیرا نیز این باکتری از ریشه‌ی گیاهان بادمجان در ایران جداسازی شده است(۱۷).

در این مطالعه ۳ سویه‌ی باسیلوس پومیلوس جداسازی شد که همه‌ی جدایه‌ها مربوط به نمونه‌های فضولات دام و طیور بودند که گزارشی مبنی بر جداسازی این باکتری از فضولات دام و طیور پیدا نشد. هم‌چنین سویه‌ی باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس نیز از فضولات شتر جدا شد که در این مورد نیز گزارشی از جداسازی این باکتری از نمونه‌ی ذکر شده یافت نشد. بنابر این این سویه‌ها نیز برای اولین بار از نمونه‌های ذکر شده جداسازی شدند.

در این میان دو سویه‌ی باسیلوس پومیلوس esf-GE1D و باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس esf-SHE در مقابل MRSA و سه سویه‌ی باسیلوس پومیلوس esf-G1،

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

باسیلوس پومیلوس esf-GE1D و باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس esf-SHE در مقابل VRE فعالیت ضدمیکروبی نشان دادند که این نتایج از نظر بالینی می‌تواند با اهمیت باشد. هم‌چنین اکثر سویه‌ها در مقابل شیگلا سونئی فعالیت ضد میکروبی داشتند. با توجه به نتایج، سویه‌های جداسازی شده توانستند هم در برابر باکتری‌های گرم مثبت و هم گرم منفی فعالیت ضدمیکروبی نشان دادند.

مطالعات آئونپاد و بانگ چنگ(۳) نشان داد که باکتری باسیلوس پومیلوس سویه‌ی WAPB4 باکتریوسینی به اسم پومیلی‌سین ۴ تولید می‌کند. این باکتری علاوه بر مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و انتروکوکوس فکالیس مقاوم به ونکومایسین، توانست رشد لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس فاسیوم، باسیلوس مگاتریوم و باسیلوس لایکنی فورمیس را مهار کند ولی رشد هیچ کدام از باکتری‌های گرم منفی را مهار نکرد. رام کریشنا و همکاران(۸) نیز از روش چاهک‌گذاری برای بررسی فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌ی باسیلوس کواگولانس RK-02 استفاده کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که جدایه‌ی باسیلوس کواگولانس بر ضد انواع باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت ومنفی فعالیت ضدمیکروبی دارد. در مطالعه‌ی حاضر نیز روش به کار برده شده برای بررسی فعالیت ضد میکروبی، همان روش چاهک‌گذاری بود. هم‌چنین باسیلوس کواگولانس جدا شده در این مطالعه نیز فعالیت ضدمیکروبی برضد تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت و منفی نشان داد که با نتایج مطالعات رام کریشنا و همکاران(۸) مطابقت داشت.

فخری و همکاران(۱۸)، اثر ضدمیکروبی جدایه‌های باسیلوس را با روش لکه‌گذاری در مقابل باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز و باکتری‌های گرم منفی سالمونلا انتریکا و شیگلا سونئی بررسی کردند. سویه‌های جدا شده شامل ۴ سویه‌ی باسیلوس پومیلوس و ۲ سویه‌ی باسیلوس لایکنی فورمیسبود. جدایه‌های باسیلوس پومیلوس بر ضد باکتری‌های گرم مثبت و منفی فعالیت ضدمیکروبی نشان دادند و جدایه‌های باسیلوس لایکنی فورمیس فقط بر ضد باکتری‌های گرم مثبت فعالیت ضدمیکروبی نشان دادند. ولی در مطالعه‌ی حاضر جدایه‌های باسیلوس پومیلوس و باسیلوس لایکنی‌فورمیس هم برضد باکتری‌های گرم مثبت و هم بر ضد باکتری‌های گرم منفی، فعالیت ضدمیکروبی نشان داد.

ییلماز و همکاران(۱۳) فعالیت ضدمیکروبی سویه‌های باسیلوس جداشده از خاک را به روش چاهک گذاری بر روی میکروب‌های بیماری‌زای استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923، باسیلوس مگاتریوم RSKK 578، باسیلوس سرئوس F2، پاستورلا فلورسنس RSKK 240 و میکروکوکوس فلاووس، بررسی کردند. نتایج نشان داد که سویه‌های باسیلوس سرئوس و باسیلوس برویس جدا شده در این مطالعه نسبت به سایر جدایه‌ها فعالیت ضدمیکروبی بیش‌تری نشان دادند. یورداسی و همکاران(۱۹) فعالیت ضدمیکروبی و ایمنی‌زایی سویه‌های باسیلوس کلاوسی بر روی باکتری‌های بیماری‌زا از جمله استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلای، سالمونلا تیفی موریوم، لاکتوکوکوس لاکتیس و کلستریدیوم دیفسیلیه را با دو روش لکه‌گذاری و چاهک گذاری آزمایش کردند. سویه‌ها اثر ضدمیکروبی بر ضد سالمونلا تیفی موریوم و اشریشیا کلای نداشتند ولی در مطالعه‌ی حاضر فعالیت ضدمیکروبی بر ضد این دو باکتری بیماری‌زا مشاهده شد.

سئو و همکاران(۲۰)، سویه‌های باسیلوسی را از خمیر دانه‌ی سویا جدا کرده و شناسایی کردند. سپس اثر ضدمیکروبی سه سویه‌ی باسیلوس سوبتیلیس جدا شده را بر ضد باکتری‌های بیماری‌زای غذایی از جمله اشریشیا کلای، سودوموناس آئروژینوزا، انواع سویه‌های سالمونلا و شیگلا، لیستریا مونوسیتوزنز، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیس، بررسی کردند. هر سه سویه‌ی باسیلوس بررسی شده در این مطالعه، فعالیت ضدمیکروبی گسترده‌ای در برابر میکروب‌های بیماری‌زای

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

گرم مثبت و منفی نشان داد که نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز با این نتایج هم‌خوانی داشت.

نتیجه‌گیری

جدایه‌های باسیلوس در این مطالعه فعالیت ضدمیکروبی قابل توجهی در برابر میکروب‌های بیماری‌زا و استاندارد نشان دادند. هم‌چنین سه جدایه، رشد *استافیلوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین و *انتروکوکوس فکالیس* مقاوم به ونکومایسین را مهار کردند که می‌توان از این جدایه‌ها در مهار و کنترل این دو باکتری مقاوم به آنتی‌بیوتیک، استفاده کرد. بنابر این خالص‌سازی و استفاده از مواد ضدمیکروبی تولید شده توسط باسیلوس‌ها، می‌تواند کاندید مناسبی برای جایگزینی با آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حمایت‌های مادی و معنوی شرکت دانش بنیان احیاگران قلب صنعت آسیا و زحمات و همکاری‌های جناب آقایان دکتر مجید مرادمند و دکتر داریوش شکری کمال تشکر را دارند.

منابع

1.F. Menichetti, Current and emerging serious Gram-positive infections, Clin. Microbiol. Infect. 11 (2005) 22–28.
2.D.G. White, S. Zhao, R. Singh, P.F. McDermott, Antimicrobial resistance among gram-negative foodborne bacterial pathogens associated with foods of animal origin, Foodb. Pathog. Dis. 1 (2004) 137–152.
3.R. Aunpad, K. Na-Bangchang, Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4, Curr. Microbiol. 55 (2007) 308–313.
4.D.M. Livermore, The need for new antibiotics, Clin. Microbiol. Infect. 10 (2004) 1–9.
5.Z. He, D. Kisla, L. Zhang, C. Yuan, K.B. Green-Church, A.E. Yousef, Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin, Appl. Environ. Microbiol. 73 (2007) 168–178.
6.R.A. Slepecky, H.E. Hemphill, The genus *Bacillus*—nonmedical, in: The Prokaryotes, Springer, 2006: pp. 530–562.
7.M. Papagianni, Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications, Biotechnol. Adv. 21 (2003) 465–499.
8.R. Sen, D. Pal, V.P. Kodali, S. Das, S.K. Ghosh, Molecular characterization and in vitro analyses of a sporogenous bacterium with potential probiotic properties, Probiotics Antimicrob. Proteins. 2 (2010) 152–161.
9.M.Y. Ali, M.M. Rahman, A. Rahman, M. Basaglia, M. Rahman, T. Sultana, et al., Isolation of *Bacillus* spp. From soil and an evaluation of their sensitivity towards different extracts and essential oils of cumin (Cuminum cyminum L.), J. Agric. Sci. Technol. 16 (2014) 623–633.
10.J. Pevsner, Functional Genomics, Bioinforma. Funct. Genomics, Second Ed. (2009) 460–514.
11.M. Mirhosseini, I. Nahvi, G. Emtiazi, M. Tavasoli, Incidence and antibiotic susceptibility of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from dairy products, Int. J. Dairy Technol. 61 (2008) 391–396.
12.M. Kazemipoor, C.W.J.W.M. Radzi, K. Begum, I. Yaze, Screening of antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from fermented vegetables against food borne pathogens, arXiv Prepr. arXiv1206.6366. (2012).
13.M. Yilmaz, H. Soran, Y. Beyatli, Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil, Microbiol. Res. 161 (2006) 127–131.
14.O.N. Reva, V. V Smirnov, B. Pettersson, F.G. Priest, *Bacillus endophyticus* sp. nov., isolated from the inner tissues of cotton plants (Gossypium sp.)., Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52 (2002) 101–107.
15.A. Niazi, S. Manzoor, S. Bejai, J. Meijer, E. Bongcam-rudloff, Complete genome sequence of a plant associated bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. plantarum UCMB5033, Stand. Genomic Sci. 9 (2014) 718–725.
16.N. Negintaji, S. Rasoul-Amini, Y. Ghasemi, Bioproduction of polyhydroxyalkanoates by *Bacillus endophyticus* isolated from the Maharlou salt lake in south of Iran, J.

www.SID.ir

Archive of SID

Biotechnol. 150 (2010) 372.
17.F. Etminani, A. Etminani, Identification of endophyte bacterium *Bacillus endoohyticus* from eggplant roots, 1st international congress on the development of agricultural science and natural resources, 2015 (In Persian).
18.S. Fakhry, I. Sorrentini, E. Ricca, M. De Felice, L. Baccigalupi, M. De Felice, et al., Characterization of spore forming *Bacilli* isolated from the human gastrointestinal tract, J. Appl. Microbiol. 105 (2008) 2178–2186.
19.M.C. Urdaci, P. Bressollier, I. Pinchuk, I. Activities, M.C. Urdaci, P. Bressollier, et al., *Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities, J. Clin. Gastroenterol. 38 (2004) S86–S90.
20.W.T. Seo, S.H. Nam, C.K. Lee, K.M. Cho, Identification of potential *Bacillus subtilis* probiotics from Korean soybean paste and their antimicrobial and immune activities, J. Food Sci. Nutr. 16 (2011) 37–44.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

www.SID.ir