مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۲۱۸/هفته چهارم بهمن ماه ۱۳۹۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۲۳

باکتریوسین با فعالیت ضد میکروبی وسیع تولیدشده توسط ایزوله‌های جدید باسیلوس تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن

سعیده زاغیان[۱]، دکتر گیتی امتیازی[۲]، داریوش شکری[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: به تازگی شیوع دوباره‌ی عفونت‌ها به دلیل پیدایش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها گسترش یافته است. باکتریوسین‌های تولیدشده توسط باکتری‌ها برای استفاده به جای آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم در تیمار عفونت‌های انسانی بسیار مناسب هستند و در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب نموده‌اند. باکتریوسین‌های تولیدشده توسط باکتری‌های متعلق به جنس باسیلوس می‌توانند نامزد بالقوه‌ای برای استفاده به عنوان عوامل ضد میکروبی جدید در آینده باشند.

روش‌ها: ۱۵ ایزوله‌ی باسیلوس تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن دارای فعالیت ضد میکروبی از خاک جدا شدند. همچنین اثر آنزیم‌های پروتئولیتیک و تغییرات pH و حرارت روی فعالیت باکتریوسین تولیدی بررسی گردید.

یافته‌ها: تمام ایزوله‌های باسیلوس جداشده دارای اثر مهاری بر رشد باکتری‌های بیماری‌زای لیستریا مونوسیتوژنز و استافیلوکوکوس آرئوس بودند. برخی از ایزوله‌های جداشده باعث مهار رشد استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant staphylococcus aureus یا MRSA) و انتروکوکوس فکالیس مقاوم به وانکومایسین (Vancomycin-resistant enterococci یا VRE) شدند، ولی هیچ کدام از ایزوله‌های جداشده اثری در مهار رشد باکتری‌های گرم منفی نداشتند. ترکیبات ضد میکروبی تولیدشده توسط باسیلوس‌های تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن به وسیله‌ی آنزیم‌های پروتئولیتیک غیر فعال شدند ولی در برابر طیف وسیعی از تغییرات pH و حرارت فعالیت خود را حفظ نمودند.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق جداسازی باکتری‌های باسیلوس تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن دارای اثر مهاری بر روی سویه‌های MRSA و VRE مورد مطالعه قرار گرفت.

واژگان کلیدی: باسیلوس تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن، باکتریوسین، استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی‌سیلین، انتروکوکوس فکالیس مقاوم به وانکومایسین

ارجاع: زاغیان سعیده، امتیازی گیتی، شکری داریوش. **باکتریوسین با فعالیت ضد میکروبی وسیع تولیدشده توسط ایزوله‌های جدید باسیلوس تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۱؛ ۳۰ (۲۱۸): ۲۲۶۹-۲۲۶۰

مقدمه

به تازگی شیوع دوباره‌ی عفونت‌ها، به دلیل پیدایش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک گسترش یافته است (۲-۱). این باکتری‌ها قادر هستند در حضور

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر گیتی امتیازی
Email: emtiazi@yahoo.com

آنتی بیوتیک ها زنده بمانند و حتی تکثیر شوند. بیشتر باکتری‌های بیماری‌زا می‌توانند حداقل به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم گردند. سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant staphylococcus aureus یا MRSA)، انتروکوکوس فکالیس مقاوم به وانکومایسین (Vancomycin-resistant enterococci یا VRE) و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به چندین دارو (Multi-drug-resistant tuberculosis یا MDR-TB) تهدیدی جدی برای سلامت عمومی جامعه محسوب می‌شوند (۴-۳، ۱). به دلیل کاهش کارایی آنتی‌بیوتیک‌های کلاسیک و افزایش مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی، یافتن عوامل ضد میکروبی جدید و قدرتمند برای کنترل این باکتری ها مورد توجه قرار گرفته است. در این میان باکتریوسین‌های تولیدشده توسط باکتری‌ها، برای استفاده به جای آنتی بیوتیک‌های مرسوم در تیمار عفونت های انسانی بسیار مناسب هستند و در سال های اخیر توجه زیادی را به خود جلب نموده‌اند (۳).

باکتریوسین ها پپتیدهای ضد میکروبی ریبوزومی هستند که توسط باکتری‌ها تولید می‌شوند و به طور معمول ضد سویه‌های نزدیک به ارگانیسم تولیدکننده‌ی خود، فعالیت می‌کنند (۶-۵، ۲). کاربرد رایج باکتریوسین ها به عنوان ماده‌ی افزودنی و محافظ در صنایع غذایی می‌باشد، ولی مطالعات کمی به بررسی کاربردهای درمانی باکتریوسین ها به عنوان عوامل ضد میکروبی پرداخته اند. بسیاری از این پپتیدهای ضد میکروبی فعالیت مؤثری ضد باکتری‌هایی که به آنتی بیوتیک‌های مرسوم مقاوم هستند، از خود نشان می‌دهند (۱).

با وجود این که باکتری‌های متعلق به جنس باسیلوس پس از باکتری‌های اسید لاکتیک، دومین گروه مهم از نظر تولید ترکیبات ضد میکروبی شامل آنتی بیوتیک های پپتیدی و لیپوپپتیدی، باکتریوسین و ترکیبات مهاری شبه باکتریوسین (BLIS یا Bacteriocin-like inhibitory substances) می‌باشند، ولی تاکنون گزارشی از جداسازی باسیلوس های تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن دارای فعالیت ضد میکروبی نشده است. هدف این تحقیق، جستجوی ایزوله‌های جدید باسیلوس تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن بود که دارای فعالیت ضد میکروبی بالقوه ضد باکتری‌های بیماری‌زا باشند.

روش‌ها

به منظور جداسازی باسیلوس‌های تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن، از مناطق مختلف خاک جمع‌آوری گردید و ۱۰ گرم از آن به ۹۰ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه روی Shaker قرار گرفت. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، شوک حرارتی دید تا تمامی شکل‌های رویشی باکتری‌ها حذف شود و فقط اسپور باکتری‌ها باقی بماند. از آن جایی که برخی دیگر از باکتری‌های اسپوردار بی‌هوازی از جمله کلستریدیوم پاستورانیوم نیز قادر به تثبیت نیتروژن می‌باشند، بعد از جدا کردن باکتری‌ها، همه‌ی آن‌ها در شرایط هوازی کشت داده شدند تا باکتری‌های بی‌هوازی مطلق از بین بروند.

به این ترتیب ۱ میلی لیتر از تعلیق خاک و آب مقطر در محیط آگار مغذی به طور هوازی کشت داده شد و بعد از رشد یک لوپ از کلنی باکتری به

۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل انتقال داده شد و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد شوک حرارتی دید. در نهایت ۱ میلی‌لیتر از آن روی پلیت حاوی محیط کشت جامد ازتوباکتر (محیط جامد مانیتول آگار فاقد نیتروژن) کشت داده و به مدت یک هفته در داخل جار بی‌هوازی قرار داده شد. برای تأمین شرایط بی‌هوازی از گاز پک درون جار استفاده شد. بعد از این مدت پلیت جهت رشد باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت (۷).

باسیلوس‌های اسپوردار تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن که به این روش جدا شدند، به محیط تریپتیکاز سوی براث بدون گلوکز و غنی شده با عصاره ی مخمر ۰/۵ درصد (Tryptic soy broth yeast extract یا TSBYE) منتقل گردید و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس ۲ میکرولیتر از هر یک از این محیط‌ها به صورت نقطه‌ای بر روی پلیت حاوی تریپتیکاز سوی آگار بدون گلوکز و غنی‌شده با عصاره‌ی مخمر ۰/۵ درصد (Tryptic soy agar with yeast extract یا TSAYE) کشت داده شد. ۸ میلی‌لیتر از محیط کشت TSAYE حاوی ۰/۶ درصد آگار که به ترتیب با 10^6 کلنی در میلی‌لیتر از هر یک از باکتری‌های لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس آرئوس و باسیلوس سرئوس به عنوان سویه‌ی معرف، تلقیح شده بود، بر روی پلیت‌ها اضافه گردید. پس از انکوباتورگذاری در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، پلیت‌ها برای بررسی ایجاد هاله‌ی عدم رشد در سه تکرار مشاهده شدند. باکتری‌هایی که در اطراف خود هاله‌ی عدم رشد ایجاد کرده بودند، جداسازی شدند (۸).

انتخاب سویه‌های معرف بر اساس باکتری‌های بیماری‌زایی صورت گرفت که به باکتریوسین‌های تولیدشده توسط جنس باسیلوس حساسیت بیشتری داشتند (۳-۲).

برای بررسی تولید باکتریوسین در باکتری‌های جدا شده، کلنی‌هایی که در مرحله‌ی قبل هاله‌ی عدم رشد تشکیل داده بودند، به محیط TSBYE منتقل گردیدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس محیط‌های کشت با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردیدند. مایع رویی این لوله‌ها جدا شد و pH آن روی ۷ تنظیم گردید تا اثر احتمالی اسید آلی تولیدشده در اثر رشد باکتری، در مهار رشد باکتری‌های معرف، حذف گردد. سپس مایع رویی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد حرارت داده شد تا پروتئازهای درون سلولی که احتمال داشت باعث هیدرولیز باکتریوسین پروتئینی گردند، غیر فعال شوند. سپس مایع با صافی ۰/۴۵ میکرون، استریل گردید. ۲۰ میکرولیتر از مایع رویی خنثی شده به صورت نقطه‌ای به پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار که پیش از آن با 10^6 کلنی در میلی‌لیتر از سویه‌های معرف جدول ۱ به صورت چمنی تلقیح شده بودند، قرار گرفت. این پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس برای ایجاد هاله‌ی عدم رشد مورد بررسی شدند (۹-۸).

برای بررسی اثر آنزیم‌ها روی فعالیت باکتریوسین، آنزیم پپسین (pH = ۳)، پروتئیناز K و تریپسین (pH = ۷) در غلظت نهایی ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده گردید. به ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی خنثی‌شده از باکتری‌های تولیدکننده‌ی باکتریوسین به

طور جداگانه ۲۰ میکرولیتر از محلول آنزیم‌های پروتئیناز K، تریپسین و پپسین اضافه شد. سپس این محلول‌ها به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مرحله‌ی بعد با حرارت دادن محلول‌ها در ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، آنزیم‌ها غیر فعال گردیدند. سپس میزان فعالیت ضد میکروبی این محلول‌ها به روش رقت‌سازی Broth micro dilution در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. برای این کار ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت TSBYE به تمام چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه افزوده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از باکتریوسین به دست آمده (مایع رویی خنثی‌شده) به اولین چاهک هر ردیف اضافه و رقت‌های ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸ و ... از آن در چاهک‌های بعدی هر ردیف تهیه گردید. سپس ۴۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری معرف استافیلوکوکوس آرئوس در غلظت نهایی 10^6 کلنی در میلی‌لیتر به چاهک‌هایی حاوی باکتریوسین اضافه شد. در هر ردیف یک چاهک به عنوان شاهد منفی (حاوی محیط کشت و باکتری معرف) و یک چاهک به عنوان شاهد (حاوی محیط کشت و باکتریوسین) در نظر گرفته شد. پس از انکوباتورگذاری در ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت، کدورت چاهک‌ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه خواننده‌ی ELISA (ELISA reader) بررسی شد. فعالیت باکتریوسین که به صورت واحدهای فعال در هر میلی‌لیتر بیان می‌گردد، از رابطه‌ی زیر به دست آمد:

$AU/ml = 2^n \times (1000/100)$

در این فرمول n شماره‌ی آخرین چاهکی است که سویه‌ی معرف در آن هیچ رشدی نداشته و کدورتی مشاهده نشده است (۱۰).

برای تعیین اثر درجه‌ی حرارت روی میزان فعالیت باکتریوسین، مایع رویی خنثی شده در ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰، ۲۰ و ۴۵ دقیقه و ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه (حرارت اتوکلاو) حرارت داده شد و میزان اثر مهاری آن بررسی گردید (۱۲-۱۱).

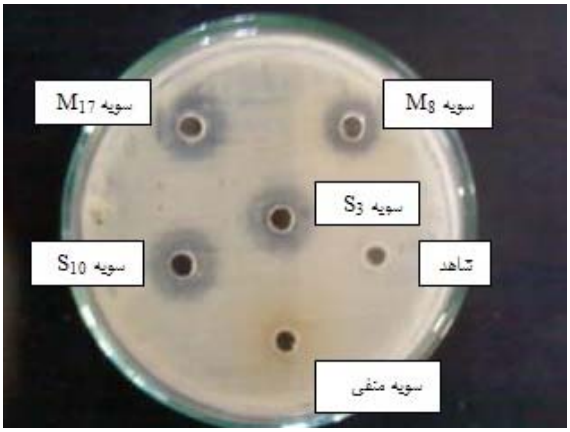
برای بررسی اثر pH روی فعالیت باکتریوسین، pH مایع رویی محیط کشت با استفاده از NaOH ۵ مولار و HCl ۵ مولار استریل بین ۱۰-۲ تنظیم شد و نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. پس از این مدت، pH نمونه‌ها روی ۷ تنظیم شد و میزان فعالیت ضد میکروبی آن‌ها بررسی گردید (۱۱).

برای بررسی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های تولیدکننده‌ی باکتریوسین روی باکتری‌های بیماری‌زا، ۲۸ باکتری بیماری‌زای بیمارستانی شامل سودوموناس آئروژینوزا (۳ ایزوله)، کلبسیلا (۳ ایزوله)، استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی‌سیلین (۸ ایزوله)، انتروکوکوس فکالیس مقاوم به وانکومایسین (۶ ایزوله)، اسینتوباکتر (۴ ایزوله) و اشریشیا کلی (۴ ایزوله) از بیماران مختلف بخش میکروبیولوژی بیمارستان الزهرای (س) اصفهان جداسازی گردید. ایزوله‌های جداشده بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و تست‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. همچنین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها از طریق تست آنتی‌بیوگرام بر اساس حداقل غلظت مهارکننده (Minimum inhibitory concentration یا MIC) بررسی شد. سپس این ایزوله‌های بیماری‌زا به صورت چمنی روی محیط کشت مولر هینتون آگار

(برای ایزوله‌های انتروکوکوس از محیط آگار خون‌دار استفاده گردید) کشت داده شدند. باکتری‌های تولیدکننده‌ی باکتریوسین به صورت نقطه‌ای روی آن قرار گرفتند. پس از انکوباتورگذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، پلیت‌ها برای بررسی ایجاد هاله‌ی عدم رشد، مشاهده شدند.

یافته‌ها

برای جداسازی باسیلوس‌های اسپوردار تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن، نمونه‌گیری از خاک صورت گرفت و پس از آماده‌سازی نمونه‌ها و دادن شوک حرارتی برای از بین رفتن نوع رویشی، باکتری‌ها در محیط بدون نیتروژن کشت داده شدند. در مجموع ۶۵ ایزوله‌ی مختلف به دست آمد. از این میان، ۱۵ ایزوله که قادر به مهار رشد حداقل یکی از ۳ باکتری معرف لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس آرئوس و باسیلوس سرئوس بودند، انتخاب گردید. هیچ کدام از ۶۵ ایزوله تأثیری بر مهار رشد دو باکتری اشریشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا نداشتند (شکل ۱).



شکل ۱. بررسی اثر ضد میکروبی ایزوله‌ها بر روی Staphylococcus aureus به روش نقطه‌ای

این ۱۵ ایزوله به صورت S_2، S_3، S_4، S_9، S_{10}، S_{15}، M_8، M_{12}، M_{13}، M_{14}، M_{17}، M_{19}، Z_1، Z_2 و Z_3 نامگذاری شدند. نتایج فعالیت ضد میکروبی این ۱۵ ایزوله در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. طیف ضد میکروبی ایزوله‌های باسیلوس تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن در مقابل ۵ سویه‌ی معرف

سویه‌های معرف	ایزوله‌های جدا شده														
	S_2	S_3	S_4	S_9	S_{10}	S_{15}	S_{15}	S_{15}	M_{13}	M_{13}	M_{13}	M_{13}	Z_1	Z_2	Z_3
لیستریا مونوسیتوژنز (PTCC1163)	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
استافیلوکوکوس آرئوس (ATTC1912)	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
باسیلوس سرئوس (PTCC1015)	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
اشریشیا کلی	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
پسودوموناس آئروژینوزا	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: وجود فعالیت ضد میکروبی (ایجاد هاله‌ی بزرگتر از ۳) -: عدم وجود فعالیت ضد میکروبی (۲)

برای تأیید پروتئینی بودن عامل ضد میکروبی استخراج شده، اثر آنزیم‌های پروتئازی پپسین، پروتیئناز K و تریپسین روی میزان فعالیت باکتریوسین با روش رقت‌سازی Broth micro dilution در برابر نمونه‌ی شاهد که تیماری روی آن انجام نگرفته بود، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اثر مهاری ایزوله‌های جداسازی شده، توسط این آنزیم‌ها به طور کامل از بین می‌رود. این تأییدی بر پروتئینی بودن عامل مهاری مشاهده‌شده در این ایزوله‌ها بود (جدول ۲).

برای تعیین میزان پایداری اثر مهاری مشاهده‌شده، اثر درجه‌ی حرارت بالا روی فعالیت ضد میکروبی مشاهده‌شده، بررسی شد و میزان فعالیت باکتریوسین تیمارشده به روش رقت‌سازی Broth micro dilution در مقایسه با نمونه‌ی شاهد بدون تیمار ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که ایزوله‌های جداسازی شده از نظر مقاومت حرارتی به طور کامل مقاوم به حرارت هستند و حتی بعد از ۱۵ دقیقه حرارت دیدن در اتوکلاو فعالیت خود را حفظ می‌نمایند (جدول ۲).

برای تعیین پایداری اثر مهاری مشاهده شده، اثر pH روی میزان فعالیت ضد میکروبی مشاهده شده به روش رقت‌سازی Broth micro dilution مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اثر ضد میکروبی مشاهده‌شده در شرایط اسیدی و قلیایی پایدار است (جدول ۲).

جدول ۲. بررسی اثر آنزیم‌های پروتئازی، pH و حرارت بر فعالیت باکتریوسین در مقابل سویه‌ی معرف استافیلوکوکوس آرئوس

تیمارهای مختلف	میزان فعالیت (درصد)
شاهد	۱۰۰
آنزیم‌های پروتئولیتیک	
پپسین	۰
تریپسین	۰
پروتئیناز K	۰
دما	
۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۳۰ دقیقه	۱۰۰
۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه	۱۰۰
۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۲۰ دقیقه	۱۰۰
۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۴۵ دقیقه	۱۰۰
۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱۵ دقیقه (اتوکلاو)	۱۰۰
pH	
۲	۶۰
۵	۹۰
۶	۱۰۰
۷	۱۰۰
۸	۱۰۰
۱۰	۱۰۰

جدول ۳. فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین تولید شده ضد ایزوله‌های بیمارستانی

ایزوله‌های بیماری‌زای بیمارستانی	ایزوله‌های دارای اثر مهاری
پسودوموناس آئروژینوزا (۳ ایزوله)	-
کلبسیلا (۳ ایزوله)	-
سوش‌های VRE: a_1 و a_2	S_3 ،M_{17} ،S_{10}
سوش‌های VRE: a_3	M_{17}
سوش‌های VRE: a_4 و a_5	-
سوش‌های VRE: a_6	S_4
آسینتوباکتر (۴ ایزوله)	-
اشریشیا کلی (۴ ایزوله)	-
سوش‌های MRSA: b_1، b_2، b_3 و b_4	S_3 ،M_{17} ،S_{10}
سوش‌های MRSA: b_5 و b_6	S_3،M_{12} ،M_{17} ،S_{10}
سوش‌های MRSA: b_7 و b_8	S_3،M_{17}

VRE: Vancomycin-resistant Enterococcus faecalis
MRSA: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus

به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های تولیدکننده‌ی باکتریوسین روی باکتری‌های بیماری‌زا، ۲۸ باکتری بیماری‌زا از بیماران مختلف بخش میکروبیولوژی بیمارستان الزهرای (س) اصفهان جداسازی گردید و اثر مهاری باکتریوسین‌های تولید شده بر روی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۳ ایزوله‌ی باسیلوس S3، S10 و M17 فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی ضد همه‌ی ایزوله‌های MRSA و ۴ ایزوله‌ی VRE از خود نشان دادند، ولی در مقابل باکتری‌های گرم منفی، غیر فعال بودند. نتایج کامل در جدول ۳ نمایش داده شده است.

بحث

شیوع روزافزون باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم به دارو از قبیل استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی‌سیلین و انتروکوکوس فکالیس مقاوم به وانکومایسین یک مشکل جدی در سلامت جهانی محسوب می‌شود و تلاش برای یافتن عوامل ضد میکروبی جدید را سبب گردیده است. استفاده از باکتریوسین‌ها به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم برای غلبه بر این مشکل نویدبخش است (۳).

در این پژوهش بررسی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های باسیلوس تولیدکننده‌ی باکتریوسین، روی طیف محدودی از باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت و گرم منفی انجام پذیرفت. در این میان اکثر ایزوله‌ها در مقابل لیستریا مونوسیتوژنز و استافیلوکوکوس آرئوس فعال بودند و ۵ ایزوله‌ی S_3، S_{10}، M_{17}، S_4 و M_{12} به خوبی باعث مهار رشد استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی سیلین و انتروکوکوس فکالیس مقاوم به وانکومایسین که از باکتری‌های مهم بیماری‌زای بیمارستانی هستند، شدند. تعدادی از ایزوله ها نیز رشد باسیلوس سرئوس را مهار کردند. Aunpad و Na-Bangchang گزارش دادند پومیلی‌سین ۴ که توسط باسیلوس پومیلوس WAPB4 تولید می‌شود، علاوه بر مهار لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس آرئوس و باسیلوس سرئوس، رشد استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی‌سیلین و انتروکوکوس فکالیس مقاوم به

وانکومایسین را نیز مهار می‌کند (۳).

هیچ کدام از ایزوله های بررسی شده در این تحقیق، بر روی باکتری های گرم منفی اشریشیا کلی و پسودوموناس آئروژینوزا، اثر مهاری از خود نشان ندادند. این نتایج با نتایج به دست‌آمده توسط اکثر پژوهشگران که عدم فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین ها را در برابر باکتری های گرم منفی گزارش نموده‌اند، هم‌خوان بود (۱۴-۱۳، ۳-۲). به دلیل وجود دیواره‌ی خارجی در باکتری‌های گرم منفی که مانعی برای رسیدن باکتریوسین به جایگاه فعال خود و اعمال اثر مهاری بر باکتری‌های گرم منفی می‌باشد، باکتریوسین‌ها در مقابل این گروه از باکتری‌ها غیر فعال هستند. بر خلاف این نتایج، گزارش‌های معدودی در رابطه با اثر مهاری برخی باکتریوسین‌ها بر باکتری‌های گرم منفی وجود دارد. از جمله گزارش شده است که باکتریوسین تولید شده توسط پانی‌باسیلوس پلی‌میکسا NRRLB30509 رشد کمپیلوباکتر ژژونی را مهار می‌کند (۱۵) و باکتریوسین تولیدی توسط پانی‌باسیلوس پلی‌میکسا JB05-1-1 رشد اشریشیا کلی RR1 و پسودوموناس فلورسنس R73 را مهار می‌کند (۱۶).

پایداری مواد ضد میکروبی تولیدشده توسط ایزوله‌های جداشده در این پژوهش، تحت شرایط مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

بدین منظور حساسیت باکتریوسین تولید شده نسبت به آنزیم های تریپسین، پپسین و پروتئیناز K بررسی گردید. نتایج نشان داد که این آنزیم‌ها باعث از بین رفتن فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین‌ها گردید که تأییدی بر پروتئینی بودن ترکیب ضد میکروبی تولید شده می‌باشد. فعالیت پومیلی‌سین ۴، Bac14B و توچیسین که به ترتیب توسط باسیلوس پومیلوس، باسیلوس سابتیلیس و باسیلوس تورنجنسیس تولید می‌شوند نیز به وسیله‌ی آنزیم‌های پروتئولیتیک به طور کامل از دست می‌رود (۱۴-۱۳، ۳).

اثر درجه‌ی حرارت روی فعالیت باکتریوسین نیز مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج نشان داد که ایزوله‌ها به اثر درجه‌ی حرارت بالا مقاوم می‌باشند. پایداری حرارتی خصوصیت مهمی برای این باکتریوسین‌ها است؛ چرا که استفاده از این باکتریوسین‌ها را در محافظت طیف وسیعی از داروها که نیازمند حرارت بالا در طی فرایند آماده‌سازی می‌باشند، ممکن می‌سازد. پانی‌باسیلین تولید شده توسط پانی‌باسیلوس پلی میکسا و پومیلی‌سین ۴ نیز فعالیت خود را پس از اتوکلاو کردن حفظ می‌کنند. باکتریوسین JB05-1-1 دمای ۹۰ درجه‌ی سانتی‌گراد را ۳۰ دقیقه تحمل می‌نماید (۱۶، ۳-۲).

نتیجه‌ی بررسی تغییرات pH از ۱۰-۲ روی فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین نشان داد که باکتریوسین تولید شده به تغییرات pH حساس نیست و در pHهای مختلف قادر به حفظ فعالیت ضد میکروبی خود می‌باشد. پانی‌باسیلین، پومیلی‌سین ۴ و Bac14B، در طیف pH بین ۹-۲ فعالیت خود را حفظ می‌نمایند (۱۳، ۳-۲).

در مجموع ایزوله‌های باسیلوس تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن طیف وسیعی از فعالیت ضد میکروبی ضد دو سویه‌ی مهم بیماری زای بیمارستانی استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی‌سیلین و انتروکوکوس فکالیس مقاوم به وانکومایسین از خود نشان دادند. خصوصیات بیوشیمیایی این ترکیبات ضد میکروبی از

قبیل پایداری حرارتی و pH بسیار قابل توجه است. توانایی بالقوه‌ی این باکتریوسین‌ها ممکن است در آینده آن‌ها را به عنوان ترکیبات ضد میکروبی جایگزین در کنترل عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی‌سیلین و انتروکوکوس فکالیس مقاوم به وانکومایسین مورد استفاده قرار دهد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت گروه زیست شناسی دانشکده‌ی علوم دانشگاه اصفهان انجام گردید. بدین‌وسیله از مسؤولین این دانشکده تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References

1. Donadio S, Maffioli S, Monciardini P, Sosio M, Jabes D. Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives. J Antibiot (Tokyo) 2010; 63(8): 423-30.
2. 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): 168-78.
3. Aunpad R, Na-Bangchang K. Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria Bacillus pumilus strain WAPB4. Curr Microbiol 2007; 55(4): 308-13.
4. Carroll J, O' Mahony J. Anti-mycobacterial peptides: made to order with delivery included. Bioeng Bugs 2011; 2(5): 241-6.
5. Bierbaum G, Sahl HG. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. Curr Pharm Biotechnol 2009; 10(1): 2-18.
6. Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int J Food Microbiol 2001; 71(1): 1-20.
7. Phi QT, Oh SH, Park YM, Park SH, Ryu CM, Ghim SY. Isolation and characterization of transposon-insertional mutants from Paenibacillus polymyxa E681 altering the biosynthesis of indole-3-acetic acid. Curr Microbiol 2008; 56(5): 524-30.
8. Mirhosseini M, Nahvi I, Emtiazi G, Tavasoli M. Incidence and antibiotic susceptibility of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from dairy products. Int J Dairy Technol 2008; 61(4): 391-6.
9. Zaghian S, Shokri D, Emtiazi G. Co-production of a UV-stable bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) and indole-3-acetic acid hormone (IAA) and their optimization by Taguchi design in Bacillus pumilus. Ann Microbiol 2012; 62(3): 1189-97.
10. Daba H, Pandian S, Gosselin JF, Simard RE, Huang J, Lacroix C. Detection and activity of a bacteriocin produced by Leuconostoc mesenteroides. Appl Environ Microbiol 1991; 57(12): 3450-5.
11. Khalil R, Elbahloul Y, Djadouni F, Omar S. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated Bacillus megaterium 19 strain. Pakistan Journal of Nutrition 2009; 8(3): 242-50.
12. Mirhosseini M, Nahvi I, Emtiazi G, Tavassoli M. Characterisation of anti-Listeria monocytogenes bacteriocins from Enterococcus faecium strains isolated from dairy products. Int J Dairy Technol 2010; 63(1): 55-61.
13. 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): 253-60.
14. Paik HD, Bae SS, Park SH, Pan JG. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin offduced by Bacillus thuringiensis subsp tochigiensis. J Ind Microbiol Biotechnol 1997; 19(4): 294-8.
15. Stern NJ, Svetoch EA, Eruslanov BV, Kovalev YN, Volodina LI, Perelygin VV, et al. Paenibacillus polymyxa purified bacteriocin to control Campylobacter jejuni in chickens. J Food Prot 2005; 68(7): 1450-3.
16. Naghmouchi K, Paterson L, Forster B, McAllister T, Ohene-Adjei S, Drider D, et al. Paenibacillus polymyxa JB05-01-1 and its perspectives for food conservation and medical applications. Arch Microbiol 2011; 193(3): 169-77.

Journal of Isfahan Medical School Received: 31.10.2012

Vol. 30, No. 218, 4th Week, February 2013 Accepted: 12.01.2013

A Bacteriocin with Broad Antimicrobial Activity Produced by Newly Isolated Nitrogen-Fixing Bacillus Strains

Saeideh Zaghian MSc[1], Giti Emtiazi PhD[2], Dariush Shokri MSc[3]

Original Article

Abstract

Background: Recently re-emerging infections occur due to antibiotic-resistant bacteria. The use of bacteriocins as a substitute for currently used antibiotics is promising. The isolated nitrogen-fixing *Bacillus* bacteria might be a potential candidate strain as an alternative source of peptide antibiotics in the future.

Methods: A total of 15 nitrogen-fixing *Bacillus* strains with antibacterial activity were isolated from soil samples. Bacteriocin-producing strains against the indicator strains were co-cultured and isolated. The antibacterial activity of bacteriocin was detected by spot-on-the lawn method with different bacteria. Effects of proteolytic enzymes, pH, and heat treatment on bacteriocin activity were also determined.

Findings: All isolated spore forming *Bacillus* strains had an inhibitory effect on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Some of them had an inhibitory effect on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE). None of them had an inhibitory effect on Gram-negative bacteria. The antimicrobial compounds produced by these novel strains were inactivated by the proteolytic enzymes which demonstrated their proteinaceous nature. These bacteriocins were also active in a wide range of pH and temperature.

Conclusion: In the present study, new bacteriocin-producing nitrogen-fixing *Bacillus* strains with anti-MRSA and anti-VRE activity were isolated from the environment and their biochemical properties were determined.

Keywords: Nitrogen-fixing *Bacillus strains*, Bacteriocin, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*

Citation: Zaghia S, Emtiazi G, Shokri D. **A Bacteriocin with Broad Antimicrobial Activity Produced by Newly Isolated Nitrogen-Fixing Bacillus Strains.** J Isfahan Med Sch 2013; 30(218): 2260-9

* This paper is derived from a medical doctorate thesis in Isfahan University of Medical Sciences.

1- Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
2- Professor, Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
3- PhD Candidate, Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Giti Emtiazi PhD, Email: emtiazi@yahoo.com