Applied Biology
Online ISSN: 2538-3434
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

Research article

Antibacterial effects of Aspergillus crude metabolite isolated from citrus on Staphylococcus aureus (ATCC 13813)[1]

Azam Ghorbannia Delavar | Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran. Azam.ghorbannia@gmail.com
Sayed Benyamin Momeni | Ph.D., Faculty of Veterinary Medicine, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran. Bmomeni399@gmail.com
Sayed Masoud Hashemi Karoii | Assistant Professor, Department of Mycology, Faculty of Veterinary Medicine, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran. Mssepid4977@gmail.com
Issa Gholampour Azizi | Assistant Professor, Department of Mycology, Faculty of Veterinary Medicine, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran **(Corresponding author).** Azad_vet2002@yahoo.com

Abstract

Objective: Discovering species of microorganisms that have antimicrobial effects opened a new window to fight against microorganisms. Aspergillus fungus is one of these microorganisms that is very effective in fighting against pathogenic microbes. All species of Aspergillus do not have appropriate and similar antimicrobial effects, and it is important to identify and isolate species with antimicrobial effects.

Materials and methods: In this research, moldy citrus fruits were sampled and Aspergillus was isolated and identified from them. 3 species of Aspergillus flavus, Aspergillus niger isolate 1 and Aspergillus niger isolate 2 were isolated. After that, the crude metabolites of these molds were prepared in the liquid culture medium of Sabro dextrose broth in Shikardar incubator. Finally, the effect of these metabolites on Staphylococcus aureus was done on this bacterium through disc diffusion by determining the diameter of the growth inhibition halo of each of these metabolites, and then MIC and MBC were calculated.

Findings: The average MIC of Aspergillus flavus metabolite on Staphylococcus aureus was calculated to be 208.33 µl/ml and its average MBC on this bacterium was 416.66 µl/ml. The average MIC of Aspergillus niger metabolite on Staphylococcus

1. **Received:** 2022/03/30 ; **Received in revised form:** 2022/05/03 ; **Accepted:** 2022/06/05 ; **Published online:** 2022/06/22

Cite this article: Ghorbannia Delavar A., Momeni, S.B., Hashemi Karoii, S.M. & Gholampour Azizi, I. (2022). Antibacterial effects of Aspergillus crude metabolite isolated from citrus on Staphylococcus aureus (ATCC 13813). *Applied Biology*, 12(46), 5-20.

© the authors

Publisher: Qom Islamic Azad University

aureus was calculated to be 166.66 µl/ml and its average MBC was determined to be 333.33 µl/ml. Around the disks with 150, 165 and 180 microliters of Aspergillus niger metabolite, the average diameter of growth inhibition halo was 8, 8 and 8.33 mm, respectively.

Conclusion: The metabolite of each Aspergillus produces different effects in preventing the growth of Staphylococcus aureus.

Keywords: Citrus, Fungus, Aspergillus, Fungal metabolite, Staphylococcus aureus, Bacteria.

پیولوژی کاربردی
شاپا الکترونیکی: ۲۵۳۸-۳۴۳۴
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

مقاله پژوهشی

اثرات ضد باکتریایی متابولیت خام آسپرژیلوس‌های جدا شده از مرکبات روی *استافیلوکوک اورئوس* (ATCC 13813)[1]

اعظم قربان‌نیا دلاور استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران. Azam.ghorbannia@gmail.com
سید بنیامین مؤمنی دکتری، دانشکده دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران. Bmomeni399@gmail.com
سیدمسعودهاشمی‌کروئی استادیار، گروه قارچ‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران. Mssepid4977@gmail.com
عیسی غلام‌پور عزیزی استادیار، گروه قارچ‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران (نویسنده مسئول)، Azad_vet2002@yahoo.com

چکیده

هدف: کشف گونه‌هایی از میکروارگانیسم‌ها که دارای اثرات ضد میکروبی هستند، دریچه‌ای جدید برای مبارزه با میکروارگانیسم‌ها گشود. قارچ آسپرژیلوس یکی از این میکروارگانیسم‌ها بوده که در راه مبارزه علیه میکروب‌های بیماری‌زا، بسیار اثرگذار است. تمام گونه‌های آسپرژیلوس دارای اثرات ضد میکروبی مناسب و مشابه نیستند و شناسایی و جداسازی گونه‌های دارای اثرات ضد میکروبی، اهمیت دارد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از مرکبات کپک‌زده نمونه‌گیری صورت گرفته و جداسازی و شناسایی آسپرژیلوس‌ها از آنها انجام شد. سه گونه *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس نایجر* ایزوله اول و *آسپرژیلوس نایجر* ایزوله دوم جداسازی شدند. پس از آن متابولیت‌های خام این کپک‌ها در محیط کشت مایع سابرو دکستروز براث، در انکوباتور شیکردار تهیه گردیدند. در نهایت اثر این متابولیت‌ها روی *استافیلوکوک اورئوس*، از طریق انتشار دیسک با تعیین قطر هاله ممانعت از رشد هر یک از این متابولیت‌ها، روی این باکتری صورت گرفت و پس از آن MIC و MBC محاسبه گردیدند.

یافته‌ها: میانگین MIC متابولیت *آسپرژیلوس فلاووس* روی *استافیلوکوک اورئوس* ۲۰۸/۳۳ µl/ml محاسبه

---

۱. **تاریخ دریافت:** ۱۴۰۱/۰۱/۱۰؛ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۱/۰۲/۱۳؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۰۳/۱۵؛ **تاریخ انتشار:** ۱۴۰۱/۰۴/۰۱
پژوهش حاضر مستخرج از: رساله دکتری گروه دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی بابل، با کد ۱۵۶۲۴۹۸۸۸۵۰۲۶۹۱۳۹۹۱۶۲۳۴۶۹۱۷ است.
استناد: قربان‌نیا دلاور، اعظم؛ مؤمنی، سید بنیامین؛ هاشمی کروئی، سید مسعود؛ غلام‌پور عزیزی، عیسی (۱۴۰۱). اثرات ضد باکتریایی متابولیت خام آسپرژیلوس‌های جدا شده از مرکبات روی *استافیلوکوک اورئوس* (ATCC 13813). *پیولوژی کاربردی*، ۱۲(۴۶)، ۵-۲۰.

© نویسندگان **ناشر:** دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

شد و میانگین MBC آن روی این باکتری ۴۱۶/۶۶ µl/ml بدست آمد. میانگین MIC متابولیت *آسپرژیلوس نایجر* روی *استافیلوکوک اورئوس* ۱۶۶/۶۶ µl/ml محاسبه شد و میانگین MBC آن ۳۳۳/۳۳ µl/ml معین گردید. در اطراف دیسک‌های دارای ۱۵۰، ۱۶۵ و ۱۸۰ میکرولیتر از متابولیت *آسپرژیلوس نایجر*، میانگین قطر هاله ممانعت از رشد، به ترتیب ۸، ۸ و ۸/۳۳ میلی متر بدست آمدند.

نتیجه‌گیری: متابولیت هر آسپرژیلوس اثرات متفاوتی را در جلوگیری از رشد *استافیلوکوک اورئوس* ایجاد می‌کند.

کلیدواژه‌ها: مرکبات، قارچ، آسپرژیلوس، متابولیت قارچی، استافیلوکوک اورئوس، باکتری.

۱. مقدمه

کپک‌ها در محیط‌های مختلف، گسترده هستند و چون تعدادی آنتی‌بیوتیک از قارچ‌های مختلف جدا شده است، علاقه پژوهشگران برای جستجوی متابولیت‌های جدید ضد میکروبی، از میکروارگانیسم‌ها، ادامه دارد. بسیاری از مطالعات، نشان دادند که قارچ‌ها، منبع غنی از مواد فعال بی‌نظیر هستند (۱). آسپرژیلوس‌ها مهم‌ترین قارچ‌های موجود در محیط می‌باشند که تقریباً در انواع ترکیبات و مواد آلی قابلیت رشد دارند و کونیدی آن‌ها به مقدار فراوان در آب، خاک و هوا پراکنده است و برخی گونه‌های آن بیماری‌زا بوده و برخی، استفاده صنعتی و غذایی دارند. *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* گونه‌های بیماری‌زا بوده و *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس اورایزا* گونه‌های مفید آن هستند. اعضای آسپرژیلوس، قارچ‌های بسیار هوازی هستند که در محیط‌های غنی از اکسیژن رشد می‌کنند و بسیاری از آن‌ها قادر به رشد در محیط‌های حیاتی و کم مصرف مواد مغذی هستند (۲). گونه‌های مختلف آسپرژیلوس به ایجاد توکسین‌های مختلف معروف می‌باشند. گونه *آسپرژیلوس فلاووس*، آفلاتوکسین تولید می‌کند که هپاتوتوکسیک و کارسینوژنیک است (۳).

متابولیت‌های ثانویه، ترکیبات آلی هستند که مستقیماً در مراحل رشد و نمو یا تولیدمثل یک ارگانیسم زنده، شرکت نمی‌کنند. در طی سالیان طولانی، بشریت از این ویژگی در گیاهان دارویی در صنایع مختلفی همچون صنعتی، دارویی، بهداشتی و... بهره جسته است. برخلاف متابولیت‌های اولیه، نظیر کربوهیدارت‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلوئیک، نبود متابولیت‌های ثانویه، به مرگ فوری موجود منجر نمی‌شود، اما ممکن است در درازمدت سبب اختلال در بقای موجود زنده، باروری یا ویژگی‌های ظاهری آن گردد یا ممکن است هیچ تغییر مشهودی را سبب نشود. متابولیت‌های ثانویه در فرآورده‌های صنعتی کاربرد فراوانی دارند و در ساخت دارو، صابون، اسانس، رنگ‌ها، صمغ‌ها، رزین، کائوچو، چاشنی غذا و نوشیدنی و غیره به‌کار می‌روند (۴، ۵). در جستجوی زیست فعال جدید متابولیت‌های ثانویه، بیشتر علاقه دانشمندان به گیاهان احاطه دارد. اما واقعیت این است که تا سال ۲۰۱۴ حدود ۱۷۰ هزار محصول طبیعی توصیف شده است که بیش از ۲۲۵۰۰ متابولیت زیست فعال توسط میکروارگانیسم‌ها، تولید می‌شوند که حدود ۴۵% به عنوان محصولات تخمیر آکتینومایست‌ها و حدود ۳۸% منشاء قارچی است (۶). بسیاری از عصاره‌های قارچی ماده‌ای برای فعالیت ضد میکروبی خود به طور عمده از قارچ پنی سیلیوم یافت شده‌اند، که منبع غنی از ترکیبات را برای برنامه‌های درمانی از جمله عوامل ضد باکتری، ضد قارچ

و ضد ویروس تأمین می‌کنند. برای مثال *آسپرژیلوس اریزه* به دلیل توانایی در تولید موادی با فعالیت ضد قارچی مانند آسپرفوران و اریزوکلورین، علاوه بر آنتی بیوتیک‌هایی مانند پنی‌سیلین، از اهمیت دارویی زیادی برخوردار است. این چهره‌ها از این ایده حمایت می‌کنند که *آسپرژیلوس اریزه* میکروارگانیسم مناسبی برای تخمیر و استفاده در بیوتکنولوژی است (۷). آسپرژیلوس‌ها به دلیل توانایی خود در تولید مواد ضد باکتری مانند *آسپرژیلوس فلاووس* مورد استفاده در تولید اسید آسپرژیلئیک و *آسپرژیلوس اکراسئوس* مورد استفاده در تولید اسید پنیسیلیک و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* مورد استفاده در تولید فوماژلین شناخته شده است. آسپرژیلوس و پنی سیلیوم به دلیل تولید گسترده متابولیت‌های یکسان با فعالیت‌های مختلف بیولوژیکی از جمله فعالیت‌های ضد باکتری و ضد قارچی شناخته شده‌اند. چندین متابولیت ثانویه با اثر آنتی بیوتیکی مانند آسپرگیلورماراسمین، اسید سیکلوپیازونیک (CPA)، اسید کوجیک، اسید ۳-نیتروپروپیونیک، مالتوریزین و ویولاستین تولید می‌کنند که تولید آن فقط در عصاره جو به عنوان یک آنتی بیوتیک بررسی شده است (۱). در مطالعه‌ای دیگر *آسپرژیلوس فلاووس* به طور قابل اثبات قادر به مهار ۳ باکتری یعنی *کلبسیلا پنومونیه*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوک اورئوس* است، اما قادر به مهار *اشریشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* نیست (۲).

استافیلوکوک‌ها سی و سه زیرگونه دارند. آن‌ها اکثراً بی‌خطر بوده و به صورت طبیعی روی پوست اکثر افراد وجود دارند و در خاک نیز زندگی می‌کنند. اما گونه‌های بیماری‌زا نیز در بین استافیلوکوک‌ها وجود دارند که می‌توانند مسمومیت غذایی و استفراغ و گاهی عفونت‌های خطرناک مثل ذات‌الریه ایجاد کنند. از شایع‌ترین زیرگونه‌های استافیلوکوک می‌توان گونه بیماری‌زای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدس* را نام برد. گاهی اوقات عفونت‌های استافیلوکوکی به‌ویژه انواعی که در بیماران بستری در بیمارستان رخ می‌دهند، به اکثر آنتی بیوتیک‌های موجود مقاوم هستند و بسیار خطرناک می‌شوند که به این نوع از استافیلوکوک‌ها MRSA (Methicillin-Resistant*Staphylococcus aureus*) می‌گویند (۳).

نیاز به عوامل ضد باکتری جدید که قادر به کنترل بیماری‌ها با سویه‌های مقاوم باکتری‌ها هستند، تعدادی از گروه‌های تحقیقاتی را برای کشف ترکیبات ضد باکتری جدید الهام‌بخش کرد. تعداد زیادی متابولیت ضد باکتری در بسیاری از گونه‌های قارچ در سراسر جهان شناسایی شده و برخی از آنها به عنوان دارو مانند سفالوسپورین‌ها و اسید فوزیدیک مورد تأیید قرار گرفته‌اند (۸). تمام گونه‌های یک جنس از کپک، دارای اثرات ضد میکروبی مشابه نیستند و شناسایی دقیق گونه‌های

دارای اثرات ضد میکروبی، بسیار اهمیت دارد. در این پژوهش منبع جداسازی آسپرژیلوس‌ها، مرکبات هستند و با تهیه متابولیت خام از این قارچ‌ها و اثر این متابولیت روی *استافیلوکوک اورئوس*، میزان تاثیر از طریق انتشار دیسک و MIC و MBC بدست آمدند.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. نمونه‌گیری: ابتدا مرکبات کپک زده جمع‌آوری شده و در محیط کشت سابورودکستروز آگار کشت داده شد، بعد از یک هفته نگهداری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، دو گونه *آسپرژیلوس نایجر ایزوله* اول و دوم و نیز *آسپرژیلوس فلاووس* جدا گردید.

۲-۲. تهیه متابولیت خام: آسپرژیلوس‌های جدا شده، با فیلدوپلاتین استریل نمونه‌گیری شده و برای جداسازی کونیدی و میسلیوم، هر نمونه با مقداری آب مقطر استریل موجود در لوله آزمایش مخلوط شده و سپس ۵۰۰ میکرولیتر محلول توئین ۸۰ به نمونه اضافه شد و در ۳ نوبت با فاصله زمانی ۱۵دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس با سمپلر، هزار میکرولیتر از کونیدی باقیمانده در پایین محلول گرفته شده و به محیط کشت سابرو دکستروز براث منتقل شده و با انکوبه کردن در انکوباتور تکان‌دهنده به مدت ۷ تا ۱۰ روز، متابولیت ثانویه تهیه شد. سپس برای جداسازی متابولیت‌های خام، هر نمونه به صورت ۳ مرتبه با فاصله زمانی ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و در مرحله بعد محلول رویی با فیلترهای سر سرنگی جمع‌آوری گردید (۹).

۲-۳. کشت باکتری: باکتری مورد بررسی *استافیلوکوک اورئوس* (ATCC 13813) به محیط کشت تریپتیک سوی براث اضافه شد و پس از گذشت ۴۸ ساعت و بررسی کدورت ایجاد شده از آن، نمونه‌گیری شد و بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت خطی داده شد. از باکتری مورد نظر سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند تهیه گرید و برای تست‌های مورد نظر بکار گرفته شد (۱۰، ۱۱). در تعیین اثر ضد باکتریایی متابولیت خام تهیه شده از *آسپرژیلوس*‌های فوق روی *استافیلوکوک اورئوس*، ابتدا MIC و سپس MBC و در انتها انتشار در دیسک انجام شد.

۲-۴. تعیین MIC: برای انجام حداقل غلظت مهارکنندگی[1]، ابتدا ۱۱ لوله آزمایش استریل در نظر می‌گیریم و به لوله‌های مورد نظر ۱ سی‌سی از محیط کشت تریپتیک سوی براث افزوده و اتوکلاو می‌کنیم. سپس بعد از آماده شدن محیط کشت، برای تهیه رقت‌های یک دوم، هزار

1. Minimal Inhibitory Concentration-MIC

میکرولیتر از متابولیت تهیه شده به لوله شماره ۱ که حاوی تریپتیک سوی براث افزوده شده و آن را کاملاً تکان داده و به این طریق رقت یک دوم از متابولیت مورد نظر در لوله ۱ تهیه شده و بر همین اساس مقدار متابولیت در لوله اول ۵۰۰ µl/ml بدست آمد و سپس هزار میکرولیتر از لوله شماره ۱ برداشته شده و به لوله شماره ۲ افزوده می‌شود و این عمل تا لوله شماره ۱۰ تکرار شده و در لوله شماره ۱۰مقدار هزار میکرولیتر برداشته و محلول خارج شد. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند تهیه شده به لوله‌های شماره یک تا یازده افزوده شد. لوله شماره ۱۱ نیز به عنوان لوله شاهد است که حاوی محیط کشت و سوسپانسیون *استافیلوکوک اورئوس* می‌باشد (۱۲) (جدول ۱). سپس تمام لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و پس از آن، لوله‌ها برای تعیین MIC بررسی گردیدند. برای تعیین MIC ابتدا لوله کنترل مثبت بررسی شده و پس از تأیید کدورت حاصل از رشد باکتری، سایر لوله‌ها نیز به منظور یافتن کدورت، بررسی شدند. لوله‌ای که دارای کم‌ترین غلظت از متابولیت آسپرژیلوس بوده و در آن کدورتی دیده نشد، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی تعیین شد. برای تعیینMIC تمام مراحل، ۳ بار تکرار گردیدند (۱۳، ۱۴،۱۵).

جدول ۱ – مقدار ماده موجود در لوله‌های تعیین MIC

شماره لوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
مقدار ماده در هر لوله (µl/ml)	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵	۶۲,۵	۳۱,۲۵	۱۵,۶	۷,۸	۳,۹	۱,۹	۰,۹	۰

شکل ۱- تعیین MBC

۲-۵. تعیین MBC: در مرحله بعد جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی[1] با توجه به نتایج MIC پلیت‌های حاوی تریپتیک سوی اگار تقسیم‌بندی شده و از لوله MIC و لوله‌های قبل از آن

1. Minimal Bactericidal Concentration-MBC

توسط سمپلر به میزان ml ۱۰ نمونه گرفته شده و به پلیت‌های فوق منتقل و از آن کشت خطی تهیه گردید. سپس این پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند (شکل ۱). برای محاسبه MBC آن دسته از پلیت‌هایی که تعداد کلنیدر آن کمتر از ۱۰ عدد باشند، به عنوان MBC تعیین گردید. برای تعیین MBC، تمام مراحل سه بار تکرار شدند (۱۶).

۲-۶. انتشار دیسک: مرحله بعد با توجه به نتایج MIC، روش انتشار دیسک در آگار انجام شد. در این مرحله ابتدا با استفاده از سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند، میزان ml ۱۰ از سوسپانسیون *استافیلوکوک اورئوس* توسط سمپلر برداشته شده و کشت با سواپ استریل روی محیط کشت نوترینت آگار انجام شد. سپس برای هر متابولیت با توجه به نتیجه MIC، ۳ دیسک در نظر گرفته شد. با استفاده از سمپلر، یک دیسک با توجه به نتیجه MIC، به عنوان دیسک اصلی تلقیح شد و برای کنترل، به میزان ۱۵µl رقت‌های بالاتر و پایین‌تر از نتیجه MIC در دو دیسک دیگر تلقیح شده و روی سطح پلیت قرار داده شد. سپس تمام پلیت‌های حاوی دیسک به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. در مرحله بعد قطر هاله‌های ممانعت از رشد[1] متابولیت خام آسپرژیلوس‌ها اندازه‌گیری شدند و این کار ۳ بار تکرار شد (۱۷،۱۸).

۲-۷. تجزیه و تحلیل آماری: در این مطالعه برای بررسی اختلاف میانگین میان گروه‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ استفاده شد. اختلاف میان گروه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی Tukey مورد بررسی قرار گرفتند. مقادیر $p\leq0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

۳. یافته‌ها

در این بررسی از سطح مرکبات کپک زده، *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس نایجر* ایزوله اول و *آسپرژیلوس نایجر* ایزوله دوم جداسازی گردیدند و متابولیت خام آنها روی *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر داده شدند. نتیجه تعیین MIC متابولیت *آسپرژیلوس فلاووس* روی *استافیلوکوک اورئوس* در تکرار اول ۲۵۰، در تکرار دوم ۲۵۰، در تکرار سوم ۱۲۵ و میانگین آن ۲۰۸/۳۳ µl/ml محاسبه شد و MBC متابولیت *آسپرژیلوس فلاووس* روی *استافیلوکوک اورئوس* در تکرار اول ۵۰۰، در تکرار دوم ۵۰۰، در تکرار سوم ۲۵۰ و میانگین آن ۴۱۶/۶۶ µl/ml بدست آمد (جدول ۲). با توجه به نتایج MIC، در اطراف دیسک با سه بار تکرار، هاله‌ای پدید نیامد.

1. Inhibition Zone Diameret-IZD

نتیجه تعیین MIC متابولیت *آسپرژیلوس نایجر* ایزوله اول روی *استافیلوکوک اورئوس* در تکرار اول ۱۲۵، در تکرار دوم ۲۵۰، در تکرار سوم ۱۲۵و میانگین آن ۱۶۶/۶۶ µl/ml محاسبه شد (جدول ۲). MBC متابولیت *آسپرژیلوس نایجر* ایزوله اول روی *استافیلوکوک اورئوس* در تکرار اول ۲۵۰، در تکرار دوم ۵۰۰، در تکرار سوم ۲۵۰ و میانگین آن ۳۳۳/۳۳ µl/ml بدست آمد (جدول ۲). در اطراف دیسک دارای ۱۵۰ میکرولیتر (µl) از متابولیت، قطر هاله ممانعت از رشد در تکرار اول ۸، در تکرار دوم ۹ و در تکرار سوم ۷ و میانگین آن mm۸ محاسبه شد. در اطراف دیسک دارای ۱۶۵ µl از متابولیت، قطر هاله ممانعت از رشد در تکرار اول ۷، در تکرار دوم ۹ و در تکرار سوم ۸ و میانگین آن mm۸ بدست آمد. در اطراف دیسک دارای µl۱۸۰ از متابولیت، قطر هاله ممانعت از رشد در تکرار اول ۹، در تکرار دوم ۸ و در تکرار سوم ۸ و میانگین آن ۸/۳۳ میلی‌متر محاسبه شد (جدول۴). نتیجه تعیین MIC متابولیت *آسپرژیلوس نایجر* ایزوله دوم روی *استافیلوکوک اورئوس* در تکرار اول ۱۲۵، در تکرار دوم ۶۲/۵، در تکرار سوم ۶۲/۵ و میانگین آن ۸۳/۳۳ µl/ml محاسبه شد. نتیجه تعیین MBC متابولیت *آسپرژیلوس نایجر* ایزوله دوم روی *استافیلوکوک اورئوس* در تکرار اول ۲۵۰، در تکرار دوم ۱۲۵، در تکرار سوم ۱۲۵ و میانگین آن ۱۶۶/۶۶ µl/ml محاسبه شد (جدول ۲). با توجه به نتایج MIC، در اطراف دیسک با سه بار تکرار، هاله‌ای مشاهده نشد.

جدول ۲- تعیین MIC و MBC برحسب میکرولیتر بر میلی لیتر متابولیت‌های تهیه شده از انواع آسپرژیلوس‌ها

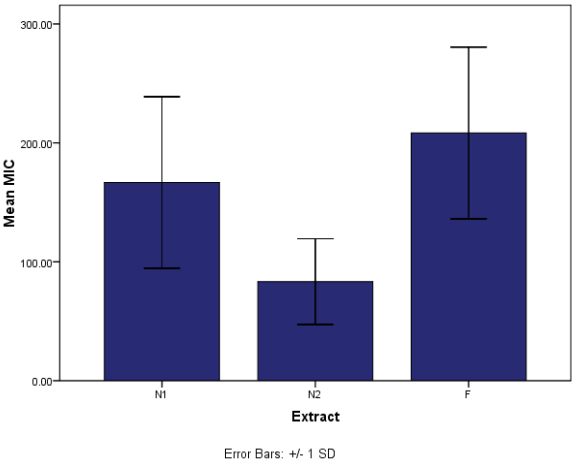
باکتری	استافیلوکوکوس اورئوس	
متابولیت آسپرژیلوس‌ها	MIC(µl/ml)	MBC(µl/ml)
آسپرژیلوس نایجر ایزوله اول(N1)	166.66	333.33
آسپرژیلوس نایجر ایزوله دوم(N2)	83.33	166.66
آسپرژیلوس فلاووس (F)	208.33	416.66

در آنالیز آماری مقادیر $p\leq0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شدند. همانطور که قابل مشاهده است، کمترین میزان MBC و MIC در *استافیلوکوک* توسط *آسپرژیلوس نایجر* ایزوله دوم (N2) و بیشترین میزان توسط *آسپرژیلوس فلاووس* ایجاد شده که هیچ‌کدام معنی‌دار نبودند ($P> 0.05$) (جدول ۳).

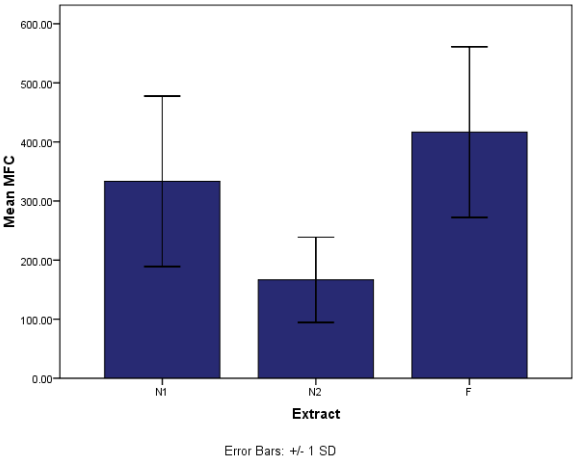
جدول ۳- نتایج MBC و MIC (µl/ml)

p-Value	Aspergillus flavus(F)	Aspergillus niger(N2)	Aspergillus niger(N1)	Staphilococus
0.118	208.33±72.17	83.33±36.08	166.67±72.17	MIC
0.118	416.67±144.34	166.67±72.17	333.33±144.34	MBC

MIC و MBC برای ۳ نمونه *آسپرژیلوس نایجر* ایزوله اول (N1)، *آسپرژیلوس نایجر* ایزوله دوم (N2) و *آسپرژیلوس فلاووس* (F) تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. به عبارت دیگر، اثر هر سه ترکیب یکسان بوده است.



نمودار ۱- میانگین MIC/*استافیلوکوک اورئوس* نسبت به هر متابولیت آسپرژیلوس‌ها



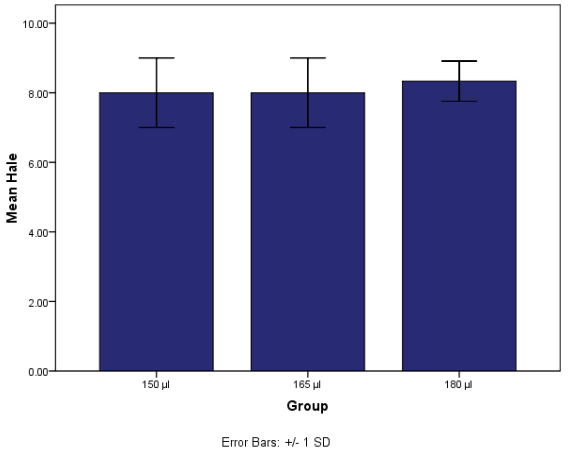
نمودار ۲- میانگین MBC/*استافیلوکوک* نسبت به هر متابولیت آسپرژیلوس‌ها

همچنین اثر غلظت‌های مختلف متابولیت‌های آسپرژیلوس بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی شدند. قطر هاله ممانعت از رشد در غلظت‌های ۱۵۰، ۱۶۵ و ۱۸۰ متابولیت *آسپرژیلوس نایجر* ایزوله اول (N1)، بررسی شدند و نشان داده شد که در تمامی حجم‌ها تغییرات معنی‌داری

مشاهده نشدند. از این‌رو استفاده از کمترین حجم نیز اثربخشی مشابهی با بیشترین حجم دارد (جدول۴).

جدول٤- مقایسه اثر حجم‌های مختلف بر هاله عدم رشد در روش انتشار از دیسک متابولیت *آسپرژیلوس نایجر* ایزوله اول روی *استافیلوکوکوس اورئوس*

p-Value	180mm	165mm	150mm
0.870	8.33±0.58	8.00±1.00	8.00±1.00



نمودار ۳- میانگین هاله ممانعت از رشد متابولیت *آسپرژیلوس نایجر* ایزوله اول (N1)

٤. بحث

داروهای تولید شده از منابع طبیعی و کشف ترکیبات ضد میکروبی هدف بسیاری از تحقیقات و اکتشافات است. کشف پنی سیلین در سال ۱۹۲۸ انگیزه‌ای برای کشف عوامل ضد میکروبی جدید بیشتری از منابع طبیعی شدند. قارچ‌ها طیف متنوعی از متابولیت‌های فعال زیستی را تولید می‌کنند که باعث می‌شود آنها منبع غنی از انواع مختلف داروها باشند (۸). قارچ‌ها در واقع یکی از قدیمی‌ترین ارگانیسم‌های اهلی بشریت بوده و مسئول تولید برخی مواد صنعتی به عنوان مثال الکل، مواد مغذی به عنوان مثال نان و محصولات مفید پزشکی به عنوان مثال پنی‌سیلین هستند (۱۹). در این بررسی دو گونه *آسپرژیلوس نایجر ایزوله* اول و دوم و نیز *آسپرژیلوس فلاووس*، از مرکبات جدا گردیدند. متابولیت خام آنها روی *استافیلوکوک اورئوس* اثر داده شدند. در اطراف دیسک دارای µl۱۵۰ از متابولیت *آسپرژیلوس نایجر*، میانگین قطر هاله ممانعت از رشد ۸ mm بدست آمد.

میانگین MIC متابولیت *آسپرژیلوس نایجر* روی *استافیلوکوک اورئوس* ۱۶۶/۶۶ µl/ml محاسبه شد و میانگین MBC آن ۳۳۳/۳۳ µl/ml بدست آمد. میانگین MIC متابولیت *آسپرژیلوس فلاووس* روی *این باکتری* ۲۰۸/۳۳ µl/ml محاسبه شد و میانگین MBC آن ۱۰۸۳/۳۳ µl/ml بدست آمد.

Ghada و همکاران (۲۰۱۱) در پژوهشی فعالیت ضدباکتریایی متابولیت‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس نایجر بر روی اشریشیا کلی، شیگلا، سالمونلا و استافیلوکوک اورئوس را بررسی کردند. نتایج MIC، متابولیت آسپرژیلوس نایجر بر روی اشریشیا کلی، سالمونلا و استافیلوکوک اورئوس ۶۲/۵ میکرو گرم بر میلی لیتر و شیگلا ۳۱/۲۵ بود. نتایج قطر هاله ممانعت از رشد متابولیت آسپرژیلوس نایجر بر روی استافیلوکوک اورئوس ۹ و ۱۰ میلی‌متر بود که با جنتامایسین و آمپی سیلین ۲۲ و ۱۹ میلی متر، مقایسه شد. همچنین نتایج قطر هاله ممانعت از رشد متابولیت آسپرژیلوس فلاووس صفر بود و بدون هاله گزارش شد. نتایج مطالعه حاضر با این تحقیق مطابقت دارد (۱۲).

نتایج تحقیق Kalyani & Hemalatha (۲۰۱۷) نشان داد، قطر هاله ممانعت از رشد متابولیت *آسپرژیلوس نایجر* بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* با بیشترین اندازه ۱۱ و کمترین ۸ میلی‌متر است. در تحقیق حاضر متابولیت *آسپرژیلوس نایجر* ایزوله اول روی *استافیلوکوک اورئوس* در اطراف دیسک دارای ۱۵۰µl از متابولیت میانگین، قطر هاله ممانعت از رشد آن ۸mm محاسبه شد. در اطراف دیسک دارای ۱۶۵ برابر با ۸mm و در اطراف دیسک دارای ۱۸۰µl قطر هاله عدم رشد ۸/۳۳mm محاسبه شدند. این یافته‌ها با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. اما این اثرات بدلیل نوع آسپرژیلوس و قدرت ضد میکروبی آنها، مقدار متابولیت و عواملی از این قبیل ممکن است متفاوت باشد (۲۰).

Yahaya و همکاران (۲۰۱۷)، در پژوهشی فعالیت ضدباکتریایی متابولیت‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس نایجر و آسپرژیلوس فومیگاتوس را بر روی استرپتوکوک پنومونیه، استافیلوکوک اورئوس، اشریشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا بررسی کردند. نتایج نشان داد که در این میان متابولیت به دست آمده از آسپرژیلوس فومیگاتوس دارای بالاترین اثر بر روی همه باکتری‌ها، با ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌گرم است (۲۱).

در تحقیق Rani و همکاران (۲۰۱۷)، اثرات آنتی باکتریال گونه‌های فوزاریوم و آسپرژیلوس بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی سنجیده شد. نتایج MIC، دارای مقادیر ۱۵/۶ تا ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر متغیر بود (۲۲). Abdulkawi و همکاران (۲۰۱۹) متابولیت جدا شده از

آسپرژیلوس را روی *باسیلوس سوبتیلیس*، *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوک اورئوس* با MIC به ترتیب: ۷/۸، ۶۲/۵، ۳۱/۳ و ۱۵/۶ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش کردند (۸). در صورتی که در تحقیق حاضر میانگین MIC متابولیت *آسپرژیلوس نایجر* روی *استافیلوکوک اورئوس* ۱۶۶/۶۶ µl/ml محاسبه شد و میانگین MIC متابولیت *آسپرژیلوس فلاووس* روی *این باکتری* ۲۰۸/۳۳ µl/ml بدست آمد.

Abdulwahid و همکاران (۲۰۱۳) در پژوهشی اثرات آنتی باکتریال ۳ قارچ *آسپرژیلوس نایجر*، *پنی سیلیوم و آلترناریا* بر روی *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوک اورئوس* و *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* را بررسی کردند. براساس نتایج بدست آمده، *آسپرژیلوس نایجر* دارای بالاترین اثر مهاری علیه این باکتری‌ها بوده و به ترتیب با قطر هاله ممانعت از رشد ۱۵، ۲۵، ۳۰ و ۳۲ میلی متر گزارش شده است (۲۳). آسپرژیلوس‌ها به دلیل توانایی در تولید مواد ضد باکتریایی مانند اسید آسپرژیلئیک، اسید پنیسیلیک و فوماژلین شناخته شده‌اند. آسپرژیلوس‌ها و پنی‌سیلیوم‌ها متابولیت ثانویه با اثر آنتی بیوتیکی مانند آسپرگیلورماراسمین، اسید سیکلوپیازونیک (CPA)، اسید کوجیک، اسید ۳-نیتروپروپیونیک، مالتوریزین و ویولاستین تولید می‌کنند (۱).

۵. نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که متابولیت‌های ثانویه بدست آمده از آسپرژیلوس‌ها دارای اثرات قابل قبولی در جهت ممانعت از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* هستند. اما این اثرات بدلیل نوع آسپرژیلوس و قدرت ضد میکروبی آنها، مقدار متابولیت و عواملی از این قبیل ممکن است متفاوت باشد. این نتایج با مطالعه حاضر مطابقت داشت که بیشترین اثر مربوط به *آسپرژیلوس نایجر* بود.

References

1. Jaberi Ansari F, Jafari Mansoorian H, Jalili H & Azizi M. A Review of the Effective Factors for Lovastatin Production by Aspergillus Terreus Atcc 20542 in Liquid Submerged Fermentation. *Journal Babol University Medical Science*s. 2016; 18(12): 40-8. [in persian]
2. El-hawary S S, Moawad A S, Bahr H S, Abdelmohsen U R & Mohammed R. Natural product diversity from the endophytic fungi of the genus *Aspergillus*. *RSC Advances*. 2020; 10(37): 22058-22079.
3. Gholampour Azizi I. *Mycotoxins*. Sadaf. Shekofeh yas. 2011: 23-28. [in persian]
4. Karuppusamy S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2009; 3(13): 1222-1239.
5. Sumner L, Lei W, Nikolau Z & Saito K. Modern plant metabolomics: advanced natural product gene discoveries, improved technologies, and future prospects. *Natural product reports*. 2015; 32(2): 212-229.
6. Goyal S, Ramawat K G & Mérillon J M. Different shades of fungal metabolites an overview. *Fungal metabolites.* 2016; 1-29. **DOI:** 10.1007/978-3-319-19456-1_34-1
7. Nacef HS, Belhattab R, Galvez J, Rodriguez SMJ & Vezza T. In Vitro Antimicrobial, Antiviral and Cytotoxicity Activities of *Aspergillus oryzae* Isolated from El-Baida Marsh in Algeria. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2020; 10(4): 191-195.
8. Abdulkawi AA & Abdulgabbar A. Over view on antibacterial metabolites from terrestrial Aspergillus spp. *Mycology*. 2019; 10(4): 191-209.
9. Dhurgham AH, Alhasan Husein A & Husein Ahmed Q Dawood. In Vitro Antimicrobial Activity of The Filtrate Crude Extract Produced by Aspergillus niger. *University Thi-Qar Journal Sciences.* 2019; 7(1): 66-71.
10. Lijian D, Lu R, Shuang L, Jingjing S, Zhiwen H, Shan H & Shihai X. Production of New Antibacterial 4 Hydroxy-α-Pyrones by a Marine Fungus *Aspergillus niger* Cultivated in Solid Medium. *Mar Drugs*. 2019; 17(344): 1-8.
11. Borjian Brojeni S, Kaveh Babaheydari E, Mortezaei S, Karimian M, Shirzad M & Validi M. The Antibacterial Effects of the Hydroalcoholic Extracts of Aloe Vera and Glycyrrhiza Glabra against Cariogenic Bacteria InVitro. *Journal Babol University Medical Sciences*. 2016; 18(4): 14-20. [in persian]
12. Ghada A, Fawzy Areej M, Al-Taweel & Nahla A M. In Vitro Antimicrobial and Anti-Tumor Activities of Intracellular and Extracellular extracts of *Aspergillus niger* and Aspergillus flavus var, columinari. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2011; 3(1): 980-987.
13. Safarkar R, Bonabi R, Massiha A, Rezaei Nazifi M & Sotoudeh R. An Evaluation of the Inhibitory and Synergistic Effects of Alcoholic Extract of Stachys Byzantina on Standard Strains under in vitro Conditions. *Journal Babol University Medical Science*s. 2017; 19(5): 39-46. [in persian]

14. Azam Taheri A, GholampourAzizi I, Hashemi M, Farhadi L, Servatyari K & Rouhi S. Inhibitory effect of aquatic and alcoholic extracts of Artemisia sieberi on growth of *Candida Albicans:* An in vitro study. *Qom University Medical Sciences Journal*. 2018; 12(6): 39-47. [in persian]
15. Gholampour Azizi I, Rouhi S, Zandi S, Kashefi H & Hassanzadeh Miandasteh S. Antifungal effect of melia azedarach alcoholic and aquatic extract on *Malassezia furfur*. *Novin Health* Journal. 2017; 1(2): 7-11. [in persian]
16. Najafi M, Gholampour Azizi I, Hashemi Karouei M, Khani D & Rouhi S. Investigation of the anti-growth effect of hydroalcoholic extract of Artemisia deserti on *Malassezia furfur* isolated from clinical specimen. *Razi Journal Medical Sciences*. 2018; 25(166): 100-106. [in persian]
17. Sajadi Kaboodi P, Bakhshi D & Moghadamnia AA, Sefidgar A. The Antibacterial Effects of Methanol Extract of Ammi majus on Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *Journal Babol University Medcal Science*s. 2017; 19(1): 36-42. [in persian]
18. Espinel-Ingroff AV & Pfaller MA. *Susceptibility test methods: yeasts and filamentous in fungi*. In: Manual of clinical microbiology, 9th ed. Washington, DC: ASM Press: 2007.
19. Kavanagh K. *Fungal fermentations systems and products*. In: Kavanagh K (ed.). Fungi: biology and applica –tions. UK: Wiley-Blackwell. 2011:125-146.
20. Kalyani P & Hemalatha K. In vitro antimicrobial potential of Aspergillus niger. (MTCC-961). *International Journal of Chemistry Technical Research*. 2017; 10(4): 430-435.
21. Yahaya S, Idris B, Yusuf I & Rabiu MK. Screening and identification of antibacterial agents produced by Aspergillus species from the soil of Bayero University Kano. *Bayero Journal Pure Applied Sciences*. 2017; 10(1): 498–502.
22. Rani R, Sharma D, Chaturvedi M & Yadav J P. Antibacterial activity of twenty different endophytic fungi isolated from Calotropis procera and time kill assay. *Clinical Microbiology*. 2017; 6(3): 1-6.
23. Abdulwahid BA, Al-Shaibani Faiz I, Al-Shakarchi & Rasha SA. Extraction and Characterization of Antibacterial Compound from *Aspergillus niger*. *Journal Al-Nahrain University*. 2013; 16(4): 167-174.