مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفتم شماره چهارم (پیاپی ۲۱) زمستان ۱۳۹۳
صفحات ۳۰۷-۲۹۹

Original Article

شناسایی مولکولی و ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی *باسیلوس تویونسیس* تولید کننده لانتی بیوتیک جدا شده از خاک

درنا کرمی آرخلو[۱]، محمد مهدی محمودی[*۲]

[۱] کارشناس ارشد، گروه میکروب شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، [۲] استادیار، گروه میکروب شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون

چکیده

سابقه و هدف: لانتی بیوتیک ها آنتی بیوتیک های پپتیدی کوچکی هستند که بسیاری از باکتری های گرم مثبت علیه دیگر باکتری ها تولید می نمایند. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی مولکولی *باسیلوس* های تولید کننده لانتی بیوتیک از خاک و همچنین ارزیابی شرایط بهینه تولید و فعالیت ضد باکتریایی لانتی بیوتیک تولیدی انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه بنیادی نمونه ها از خاک مزارع لوبیا سبز در استان فارس جمع آوری گردیدند. سلول های رویشی با روش پاستوریزه کردن از بین برده شدند. کلنی های گرم مثبت اسپوردار انتخاب شدند. شیرابه کشت مایع باکتری، به منظور بررسی قابلیت تولید لانتی بیوتیک با روش انتشار از چاهک مورد آزمایش قرار گرفت. کلنی های مناسب با قابلیت تولید لانتی بیوتیک انتخاب و با روش های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی گردیدند. همچنین تولید لانتی بیوتیک در دما و دامنه های مختلف pH مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: پس از تعیین توالی، سویه جداسازی شده به عنوان *باسیلوس تویونسیس* تشخیص داده شد. بیشترین میزان تولید لانتی بیوتیک پس از ۲٤ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس و در pH ۷ انجام گرفت. نتایج نشان داد که حضور گلوکز و پپتون با غلظت یک درصد می تواند تولید لانتی بیوتیک را بهبود بخشد. همچنین لانتی بیوتیک خالص سازی شده بر تعدادی از باکتری های گرم مثبت دارای اثر ممانعت کنندگی از رشد بود.

نتیجه گیری: با توجه به توانایی مطلوب سویه جداسازی شده در تولید لانتی بیوتیک، انجام مطالعات گسترده تر به منظور شناسایی دقیق تر لانتی بیوتیک تولیدی برای کاربردهای دارویی پیشنهاد می گردد.

واژگان کلیدی: لانتی بیوتیک ، *باسیلوس تویونسیس*، فعالیت ضد باکتریایی، خاک.

دریافت مقاله: تیر ماه ۹۳ پذیرش برای چاپ: مهر ماه ۹۳

مقدمه

در سال های اخیر به دلیل پیدایش و پیشرفت باکتری های مقاوم به دارو، توانایی مواد ضد میکربی موجود باید مجدداً مورد ارزشیابی قرار گیرد. لانتی بیوتیک ها پپتیدهای ضد میکروبی هستند که توسط بسیاری از باکتری های گرم مثبت به صورت ریبوزومی سنتز می شوند. در ساختار مولکولی آنها آمینواسیدهای چند حلقه ای لانتیونین یا متیل لانتیونین وجود دارد که دارای فعالیت ضد میکروبی با طیف گسترده می باشند. بنابراین می توان آنها را در گروه باکتریوسین ها قرار داد (۱). لانتی بیوتیک ها دارای اثر باکتری کشی (باکتریوسیدال) بوده و با ایجاد منفذ در غشای سلولی و یا ممانعت از تشکیل پپتیدوگلیکان می توانند علیه بسیاری از باکتری ها به ویژه باکتری های گرم مثبت عمل نمایند. امروزه این ترکیبات در صنایع غذایی به عنوان نگهدارنده و در دامپزشکی به عنوان آنتی بیوتیک کاربرد دارند. از سال ۲۰۱۱ نیز یک نمونه از

*) آدرس برای مکاتبه: کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون ، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی. تلفن: ۰۹۱۷۷۰٤٤۸۰۰ پست الکترونیک: mmmahmoodi636@yahoo.com

لانتی بیوتیک ها علیه باکتری *کلاستریدیوم دیفیسیل* (*Clostridium difficile*) وارد مرحله آزمایش شده است (۲).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۲ بر روی پنیر کاسیری یونانی انجام گرفت، نوعی لانتی بیوتیک به نام ماسدوسین از باکتری *استرپتوکوکوس ماسدونیکوس* (*Streptococcus macedonicus*) جداسازی گردید (۳). در سال ۲۰۱۱ نوعی دیگری از لانتی بیوتیک به نام سالیواریسین از باکتری *استرپتوکوکوس سالیواریوس* (*Streptococcus salivarius*) جداسازی و شناسایی گردید. پروبیوتیک *استرپتوکوکوس سالیواریوس* به عنوان کنترل کننده عفونت های *استرپتوکوکوس پیوجنز* (*Streptococcus pyogenes*) حفره دهانی انسان محسوب می گردد (٤). همچنین با توجه به مطالعه ای که در سال ۲۰۱۳ در مادرید انجام شد مشخص گردید که سویه ای از *باسیلوس توینونسیس* (*Bacillus toyonensis*) ترکیب فعالی به نام تایوسرین ایجاد می کند که به عنوان افزودنی غذایی استفاده می شود. این پروتئین به کلاس II باکتریوسین ها تعلق دارد (۵). هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی *باسیلوس* های تولید کننده لانتی بیوتیک از خاک و نیز ارزیابی فعالیت ضد میکروبی لانتی بیوتیک تولیدی در حضور منابع مختلف کربن، نیتروژن و دامنه های مختلف دمایی و pH بود.

مواد و روش ها

الف) جمع آوری نمونه: در این مطالعه بنیادی نمونه ها از سطح تا عمق ۵ سانتی متری خاک مزارع لوبیا سبز در استان فارس جمع آوری گردیدند. نمونه ها درون ظروف شیشه ای استریل قرار داده شدند و به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

ب) جداسازی باسیلوس: یک گرم از مخلوط خاک های جمع آوری شده به ۹۹ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه و مخلوط گردید. سوسپانسیون حاصل در بن ماری در دمای ۸۰ درجه سیلیسیوس به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد تا سلول های رویشی باکتری ها از بین رفته و تنها اسپورها باقی بمانند. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حرارت دیده بر روی محیط کشت نوترینت آگار حاوی ۵٪ کلرید سدیم (مرک، آلمان) کشت داده شد. نمونه ها به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس گرما گذاری شدند (٦).

ج) شناسایی بیوشیمیایی: ویژگی های مورفولوژیک و بیوشیمیایی باکتری های جداسازی شده بر اساس روش های معرفی شده در کتاب باکتری شناسی برگی مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور از آزمون هایی مانند احیای نیترات، تحرک، متیل رد، وگس پروسکوئر، نشاسته و لسیتیناز استفاده شد (٦).

د) سنجش مقدماتی فعالیت ضد باکتریایی: کلنی های خالص جداسازی شده بر روی محیط نوترینت براث (مرک، آلمان) کشت داده شدند. پس از ٢٤ ساعت گرمخانه گذاری، با دور ١٤٠٠٠ g در دمای ٤ درجه سیلیسیوس به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. روماند درون لوله های استریل جمع آوری شد و برای سنجش فعالیت ضد باکتریایی مورد استفاده قرار گرفت.

برای این منظور بر روی پلیت های حاوی محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) به طور جداگانه باکتری هایی از جنس های مختلف شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus* PTCC 1113)، *میکروکوکوس لوتئوس* (*Micrococcus luteus* PTCC 1169)، *نوکاردیا* (*Nocardia* spp)، *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus* PTCC 1665)، *کورینه باکتریوم* (*Corynebacterium spp*)، *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli* PTCC 1330)، *سالمونلا تیفی* (*Salmonella typhi* PTCC 1609)، *کلبسیلا نمونیه* (*Klebsiella pneumonia* PTCC 1290)، *ویبریو* (*Vibrio* spp) و *سودوموناس ائروجینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1074) (تهیه شده از بانک میکروبی دانشگاه آزاد کازرون) کشت سطحی داده شدند. غلظت تمامی باکتری ها به کمک لوله ۰/۵ مک فارلند معادل $۱/۵\times۱۰^{۸}$ تنظیم گردید. پس از خشک شدن سطح پلیت، چاهک هایی به قطر ٦ میلی متر به وسیله پیپت پاستور استریل ایجاد گردید. سپس ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی تهیه شده از

کشت *باسیلوس* درون چاهک ها ریخته شد. پلیت ها به منظور بررسی هاله عدم رشد به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس قرار گرفتند (۷ و ۸).

ه) خالص سازی نسبی لانتی بیوتیک: برای این منظور از روش رسوب دهی با سولفات آمونیوم استفاده شد. ابتدا از کشت ۲٤ ساعته باکتری، به کمک سانتریفیوژ با دور g ۱٤۰۰۰ و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سیلیسیوس، شیرابه باکتری تهیه گردید. با اضافه کردن تدریجی سولفات آمونیوم جامد (مرک، آلمان) تا حد اشباع بر روی شیکر و در دمای اتاق، شرایط رسوب پروتئین ها فراهم گردید. به کمک سانتریفیوژ رسوب حاصل جداسازی شد و در محلول Tris-Hcl با غلظت ۱۰ میلی مولار حل گردید. برای ارزیابی خاصیت ضد میکروبی لانتی بیوتیک، مجدداً از روش انتشار چاهک استفاده شد (۹ و ۱۰).

و) بررسی تاثیر منابع مختلف کربن و نیتروژن: باکتری جداسازی شده، در چندین لوله حاوی محیط کشت پایه لوریا براث (مرک، آلمان) که غلظت های متفاوتی (۲، ۱/۵ ، ۱، ۰/۵، ۰/۳ درصد) از منابع مختلف کربن (مانیتول، گلوکز) و نیتروژن (پپتون، نیترات سدیم) به آنها اضافه شده بود، کشت داده شد. پس از گذشت ۲٤ ساعت کدورت سنجی در طول موج ٦۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (شیمادزو، ژاپن) انجام گرفت.

ز) بررسی اثر دما، pH و زمان بر تولید باکتریوسین: برای این منظور باکتری جداسازی شده که غلظت آن توسط لوله ۰/۵ مک فارلند تنظیم شده بود، در لوله های حاوی محیط لوریا براث به میزان یکسان کشت داده شد. هر کدام به طور جداگانه در دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۵، ٤۰ و ٤۵ درجه سیلیسیوس به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری گردیدند. پس از جداسازی روماند به کمک سانتریفیوژ با دور g ۱٤۰۰۰، میزان نسبی لانتی بیوتیک تولیدی با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تعیین شد.

همچنین به منظور بررسی تاثیر pH محیط بر تولید لانتی بیوتیک، به کمک محلول های اسید کلریدریک و سود ۱ نرمال، pH چندین لوله محیط کشت لوریا براث در مقادیر ۳، ٤، ۵، ٦، ۷، ۸ و ۹ تنظیم گردید. پس از کشت باکتری و سپری شدن مدت گرمخانه گذاری، مجدداً میزان نسبی باکتریوسین تولیدی با اندازه گیری هاله عدم رشد تعیین شد.

تاثیر مدت زمان گرمخانه گذاری و دوره رشد باکتری بر تولید لانتی بیوتیک نیز با نمونه برداری از کشت مایع باکتری در زمان های مختلف ۱۲، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت و تعیین اندازه هاله عدم رشد تعیین گردید.

ح) تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC): لانتی بیوتیک خالص سازی شده توسط سولفات آمونیوم به کمک آب مقطر در رقت های مختلف (هر رقت نصف رقت قبلی) آماده شدند. اثر ضد میکروبی آن بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* سویه PTCC 1113 که با غلظت $۱/۵\times۱۰^{۸}$ باکتری در میلی لیتر در سطح آگار کشت داده شده بود مورد بررسی قرار گرفت (۱۱).

ط) استخراج DNA: ابتدا چند کلنی از آن در محیط نوترینت براث به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس کشت داده شد. سپس استخراج کامل DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (Fermentas K0512) و مطابق با دستور العمل شرکت سازنده انجام گرفت.

ی) واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR): به منظور تکثیر ژن *16S rRNA* از آغاز گرهای عمومی 20F (5’-TTGGAGAGTTTGATCCTGGCTC-3’) و 1530R (5’-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3’) استفاده گردید (۱۲).

واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۳٦ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۱ میکرولیتر مخلوط dNTPs، ۲ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ pmol/µl)، ۱ میکرولیتر از آنزیم Taq پلی مراز و ۲ میکرولیتر از DNA الگو انجام شد. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf Master cycler Gradient, Germany) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سیلیسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل

واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سیلیسیوس به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سیلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR به ژل آگاروز ۱ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و الکتروفورز گردید.

ک) تعیین توالی محصولات PCR: محصولات به دست آمده از واکنش زنجیره ای پلی مراز برای تعیین توالی به شرکت Ampliqon کره جنوبی ارسال گردید. نتیجه تعیین توالی با استفاده از سایت Ez Taxon آنالیز شد.

یافته ها

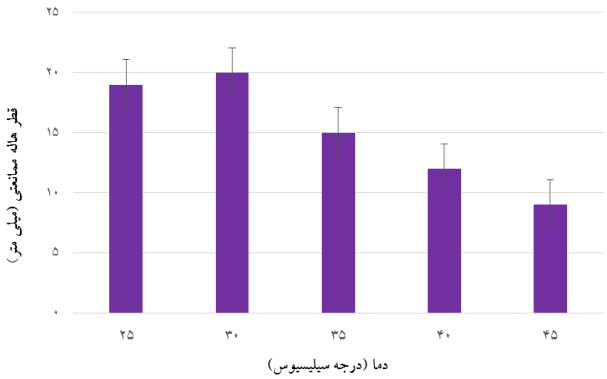
در این مطالعه پس از تیمار حرارتی، بار میکروبی خاک بسیار کاهش یافت به طوری که تنها باکتری هایی که قادر به تولید اسپور بودند توانستند رشد نمایند. پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری، کلنی های مناسب که به صورت باسیل های گرم مثبت، اسپوردار، کاتالاز مثبت و اکسیداز مثبت بودند انتخاب شدند.

در پژوهش حاضر شیرابه سانتریفیوژ شده کشت باکتری که حاوی لانتی بیوتیک تولید شده توسط باکتری بود، با روش انتشار از چاهک های تعبیه شده در سطح آگار مورد ارزیابی قرار گرفت. اثر ضد باکتریایی لانتی بیوتیک علیه چندین باکتری گرم مثبت و گرم منفی بررسی شد. نتایج نشان داد که بر اساس قطر هاله عدم رشد بیشترین اثر ممانعتی به ترتیب مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* (۲۳ میلی متر)، *نوکاردیا* (۲۱ میلی متر)، *میکروکوکوس لوتئوس* (۱۵ میلی متر) و *باسیلوس سرئوس* (۱۳ میلی متر) می باشد. اما هیچ گونه اثر بازدارندگی در مورد *کورینه باکتریوم* و سایر باکتری های گرم منفی مورد مطالعه مشاهده نگردید.

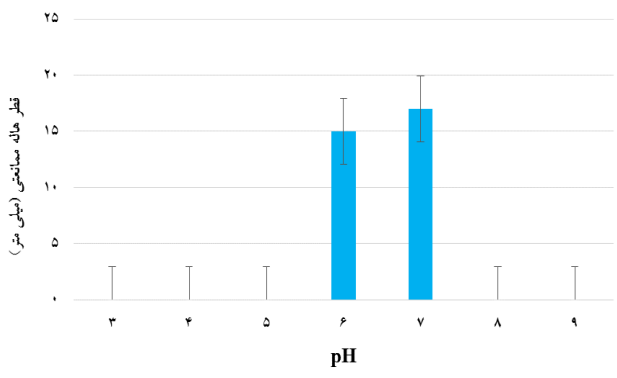
در این بررسی با توجه به خصوصیات مورفولوژیک و شکل ظاهری، ۷ کلنی مختلف با قابلیت تولید مواد ضد میکروبی، جداسازی گردیدند. از این میان یک نمونه که بیشترین قابلیت و اثر ضد میکروبی را از خود نشان داد انتخاب و در مراحل بعدی آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس آزمون های بیوشیمیایی، مولکولی و تعیین توالی ژن *16S rRNA*، باکتری جداسازی شده به گونه *باسیلوس تویونسیس* تعلق داشت.

در این تحقیق اثر چندین فاکتور محیطی بر میزان تولید لانتی بیوتیک، با توجه به قطر هاله عدم رشد ایجاد شده بر علیه باکتری *استاف اورئوس*، مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی اثر دما مشخص گردید که بیشترین میزان تولید لانتی بیوتیک در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس انجام می پذیرد و هرگونه افزایش یا کاهش دما از این میزان، تولید لانتی بیوتیک و در نتیجه قطر هاله عدم رشد را کاهش می دهد (نمودار ۱).

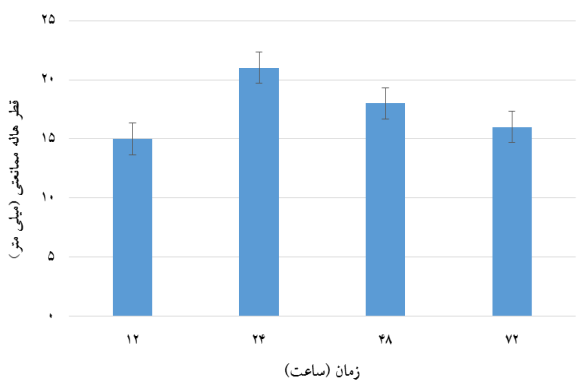
در بررسی اثر pH مشخص گردید که تولید لانتی بیوتیک تنها در pH های ۷ و ۶ به نحو مطلوبی انجام می گیرد و با افزایش یا کاهش pH از این میزان، تولید لانتی بیوتیک به شدت کاهش می یابد. به گونه ای که هاله عدم رشد قابل توجهی ایجاد نمی گردد (نمودار ۲).



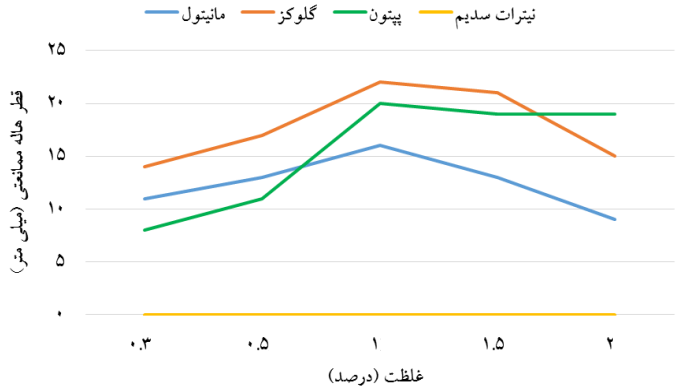
نمودار ۱: اثر دما بر تولید لانتی بیوتیک.



نمودار ۲: اثر pH بر تولید لانتی بیوتیک.



نمودار ۳: تولید لانتی بیوتیک در دوره زمانی مختلف.



نمودار ٤: اثر منابع مختلف کربن و نیتروژن بر تولید لانتی بیوتیک.

در بررسی میزان تولید لانتی بیوتیک در دوره های مختلف زمانی رشد باکتری نیز مشخص گردید که بیشترین میزان تولید لانتی بیوتیک پس از ٢٤ ساعت گرماگذاری انجام می گیرد (نمودار ۳).

در این مطالعه همچنین تاثیر چندین منبع مختلف کربن (مانیتول، گلوکز) و نیتروژن (پپتون ، نیترات سدیم) با غلظت های مختلف (۲، ۱/۵، ۱، ۰/۵، ۰/۳ درصد) بر میزان تولید لانتی بیوتیک توسط سویه جداسازی شده، مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی اثر منابع کربن مشخص گردید که استفاده از قند گلوکز با غلظت ۱ درصد بیشترین میزان تولید لانتی بیوتیک را به دنبال داشته است و هاله عدم رشدی با قطر ۲۲ میلی متر ایجاد گردید. در حالی که استفاده از قند مانیتول با غلظت یک درصد موجب تولید لانتی بیوتیک کمتری شد و قطر هاله عدم رشد به ١٦ میلی متر کاهش یافت (نمودار ٤).

در بررسی اثر منابع نیتروژن نیز مشخص گردید که استفاده از پپتون با غلظت ۱ درصد بیشترین میزان تولید لانتی بیوتیک را به دنبال داشته است و هاله عدم رشدی با قطر ۲۰ میلی متر ایجاد گردید. در حالی که استفاده از نیترات سدیم به عنوان منبع نیتروژن موجب عدم تولید لانتی بیوتیک گردید و هاله عدم رشدی ایجاد نشد (نمودار٤).

در این مطالعه کمترین غلظت ممانعت کننده رشد (MIC) و کمترین غلظت کشندگی (MBC) لانتی بیوتیک تولیدی توسط *باسیلوس* بر علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب معادل ۱/٤ و ۲/۸ (میکروگرم/میلی لیتر) به دست آمد.

بحث

در مطالعه حاضر، شناسایی سویه *باسیلوس* جداسازی شده از خاک بر اساس آزمون های بیوشیمیایی و مولکولی انجام گرفت. پس از ارزیابی آزمون های بیوشیمیایی و مقایسه نتایج با کتاب باکتری شناسی برگی، گونه جداسازی شده با *باسیلوس سرئوس* مطابقت داشت. بررسی مولکولی و تعیین توالی باکتری جداسازی شده، شباهت این باکتری را با سویه BCT-7112 که قبلاً در بانک ژنی NCBI به ثبت رسیده است را نشان داد. سویه BCT-7112 سویه ای است که به تازگی در گونه *باسیلوس تویونسیس* طبقه بندی شده است (۱۳). این گونه در کنار دیگر گونه های *باسیلوس* مانند *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس تورنجینسیس*، *باسیلوس آنتراسیس*، *باسیلوس مایکویدز*، *باسیلوس سودومایکویدز* و *باسیلوس سیتوتوکسیکوز* از میکروارگانیسم های مهم خاک محسوب می شوند که اغلب به صورت ساپروفیت در خاک وجود دارند. برخی از گونه های این جنس بیماری زا هستند و برخی دیگر به عنوان حشره کش های بیولوژیکی مورد استفاده قرار می گیرند (١٦-١٤).

گونه BCT-7112 در سال ١٩٦٦ در ژاپن جداسازی گردید و به عنوان پروبیوتیک در سال ۱۹۷۵ در غذای حیوانات مورد استفاده قرار گرفت (۱۳). در پژوهش های مختلف اثرات مفید *باسیلوس* های موجود در خاک در افزایش رشد گیاهان به اثبات

رسیده است (٦). خانواده باسیلاسه (Bacillaceae) دارای بیش از ۳۰ جنس و گونه می باشد. باکتری های موجود در این خانواده به دلیل ترشح آنزیم ها و ترکیبات مختلف و تشکیل اسپور در خاک، از اهمیت بالایی برخوردار می باشند (۱۷).

در این مطالعه مشخص گردید که باکتری *باسیلوس تویونسیس* از قابلیت مطلوبی برای تولید لانتی بیوتیکی برخوردار می باشد. نتایج نشان داد که بهترین شرایط تولید لانتی بیوتیک توسط سویه جداسازی شده، دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس، pH ۷ و مدت زمان ٢٤ ساعت گرمخانه گذاری می باشد. همچنین استفاده از گلوکز و پپتون با غلظت یک درصد به عنوان منابع کربن و نیتروژن می تواند شرایط مطلوبی را برای تولید لانتی بیوتیک فراهم سازد.

پاردب کائور (Pardeep Kaur) و همکاران در هند *باسیلوسی* را از خاک جداسازی نمودند که قادر به تولید ماده سوبتیلین بود. این ترکیب می توانست از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* ممانعت کند. بیشترین تولید سوبتیلین در شرایط بهینه سازی شده شامل دمای ۲۸ درجه سیلیسیوس و pH بهینه ۸ در یک دوره زمانی ۹٦ ساعته در محیط های بهینه شده با منبع کربن و نیتروژن به دست آمد (۲).

در مطالعاتی که با هدف جداسازی، شناسایی و بهینه سازی تولید باکتریوسین ها توسط باکتری ها صورت می گیرد، به طور معمول از روش انتشار از چاهک به عنوان معیاری در سنجش اولیه اثرات ضد میکروبی متابولیت های تولیدی استفاده می شود (۱۸). در مطالعه حاضر نیز از این روش به منظور ارزیابی تاثیر لانتی بیوتیک تولیدی استفاده شد. در مطالعه ای مشابه که اویس (Awais) و همکاران در سال ۲۰۰۷ برای جداسازی باکتری های مولد باکتریوسین انجام دادند، از روش انتشار چاهک برای بررسی فعالیت ضد باکتریایی متابولیت های تولید شده استفاده گردید. یافته های آنها نشان داد که بیشترین هاله ممانعتی رشد علیه باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *میکروکوکوس لوتئوس* در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس و pH بهینه ۸ بوده است (۱۹).

در بسیاری از مطالعات به منظور خالص سازی اولیه ترکیبات پروتئینی، از روش رسوب دهی به کمک سولفات آمونیوم اشباع استفاده شده است (۲۰ و ۲۱). در مطالعه حاضر نیز از این روش برای خالص سازی لانتی بیوتیک تولید شده با ساختار پپتیدی استفاده گردید. موبولاجی (Mobolaji) و همکاران در سال ۲۰۰۹ برای بررسی فعالیت ضد باکتریایی ترکیبات فعال زیستی تولید شده توسط گونه های *باسیلوس*، با اضافه کردن سولفات آمونیوم جامد به مایع فیلتر شده کشت باکتری توانست پروتئین را در محلول رسوب داده و سپس در بافر Tris-Hcl حل نماید (٦). یکی از کاربرد های مهم لانتی بیوتیک ها فعالیت ضد میکروبی آنهاست. هر روزه مقاومت باکتری ها در برابر آنتی بیوتیک ها بیشتر می گردد.

تحقیق در مورد کشف مواد جدید با خواص ضد میکروبی قوی تر همپای افزایش مقاومت در باکتری ها رو به گسترش است. از این رو لانتی بیوتیک ها به عنوان یک جایگزین یا مکمل مناسب برای داروهای ترکیبی مورد توجه می باشند. لانتی بیوتیک ها با اثرات ضد میکروبی بر روی طیف گسترده ای از ارگانیسم های گرم مثبت و هم چنین قابلیت مصارف غذایی آنها در برخی موارد و کمتر بودن اثرات جانبی آنها نسبت به آنتی بیوتیک های رایج می توانند در برخی موارد جایگزین آنتی بیوتیک ها شوند (۲۲).

یافته های این پژوهش نشان داد که لانتی بیوتیک تولیدی *باسیلوس تویونسیس* دارای خاصیت ضد باکتریایی می باشد. این خصوصیت با توجه به رقت لانتی بیوتیک و جنس باکتری هدف متفاوت است. در این پژوهش مشخص گردید که حساسترین باکتری نسبت به تاثیر لانتی بیوتیک تولیدی توسط سویه جداسازی شده، *استافیلوکوکوس اورئوس* و مقاومترین آنها باکتری های گرم منفی می باشند. تفاوت در حساسیت باکتری های گرم مثبت و گرم منفی نسبت به متابولیت های مختلف، می تواند به تفاوت های ساختاری بین این میکروارگانیسم ها مرتبط باشد. باکتری های گرم منفی دارای غشا خارجی لیپیدی هستند که دارای ترکیباتی با ساختار لیپو پلی ساکارید می باشند. بنابراین یک دیواره سلولی نفوذ ناپذیر به وجود می آورند. اما باکتری های گرم مثبت دارای

حساسیت بیشتر می باشند. زیرا تنها یک لایه پپتید و گلیکان خارجی دارند. این لایه نمی تواند یک مانع موثر در برابر نفوذ پذیری مولکول های خارجی باشد. یافته های این مطالعه، اهمیت موضوع را برای تحقیقات آینده به منظور به دست آوردن ترکیبات ضد میکروبی در میان گونه های *باسیلوس* از خاک مشخص می نماید.

مطالعه برای کشف متابولیت های زیستی جدید و ترکیبات دارویی، به تعداد زیادی از جدایه ها احتیاج دارد. اگر *باسیلوس* های متنوع نمونه گیری و غربال گری شوند، این تحقیقات در آینده امید بخش خواهد بود. با این حال وجود برخی تفاوت ها در میزان اثرات ضد میکروبی مشاهده شده در این مطالعه تجربی و تحقیقات مشابه می تواند به دلیل تفاوت سوبستراهای مختلف برای رشد باکتری تولید کننده لانتی بیوتیک و به کارگیری روش های مختلف برای استخراج باشد. تفاوت در اثرات ضد باکتریایی نشان دهنده تفاوت های موجود در ترکیبات لانتی بیوتیک ها نیز می تواند باشد.

نتیجه گیری

از آن جایی که سویه جداسازی شده در این مطالعه قادر به تولید لانتی بیوتیک می باشد و با توجه به اثر ممانعت کنندگی مناسب بر علیه تعدادی از باکتری های گرم مثبت بیماری زا، می توان گفت که باکتری *باسیلوس تویونسیس* پتانسیل فراوانی برای استفاده در پزشکی، صنعت و بیوتکنولوژی دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از کارشناس آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون سرکار خانم پیکر به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Lorraine D, Cotter C, Paul R. The two peptide lantibiotic lacticin 3147 acts synergistically with polymyxin to inhibit gram negative bacteria. BMC Microbiol. 2013; 13(3): 212-220.

2. Pardeep K, Poorvi Sh, Farough A, Vivek T. Optimization of subtilin production by *Bacillus subitilis*. J Pharma Sci. 2011; 4(2): 362-368.

3. Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, Staley JT, Williams ST. Bergey's manual of determinative bacteriology .USA. Baltimore. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. 2009; 12: 21-68.

4. Georgalaki M, Van den Berghe E. Macedocin. A food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC. Appl Environ Microbiol. 2002; 12(5): 5891-5903.

5. Wescombe P, Upton M, Renault P, Wirawan R. Salivaricin 9: a new lantibiotic produced by *Streptococcus salivarius*. Microbiol. 2011; 157:1290-1299.

6. Guillermo J, Anicet R, Blanch Javier T, Mora R. Complete genome sequence of *Bacillus toyonensis* BCT-7112,active ingredient of the feed additive preparation toyocerin. Appl Environ Microbiol. 2013; 1(3): 6-13.

7. Amanda SM, Florencia O, Adriano B. Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from amazon basin. Brazil J Microbiol. 2004; 35(4): 12-19.

8. Snell N, Ijichi K, Lewis JC. Paper chromatographic identification of polypeptidic gram positive inhibiting antibiotics. Appl Environ Microbiol. 1956; 4: 13-17.

9. Mobolaji A. Antimicrobial activity of bioactive compound(s) produced by *Bacillus* species.

Appl Environ Microbiol. 2009; 1: 1-14 .

10. Diaz J, Rios-sanchez R, esmazeaud M, Ruiz-Barba JC. Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPC10 isolated from a green olive fermentation. Appl Environ Microbiol. 1993; 59(5): 1416-1424.

11. NCCLS. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Eight information supplement. NCCLS document M100-S8. 1998; 27: 19-86.

12. Casiano H, Choresca J, Dennis K, Gomez K. Molecular detection of *Aeromonas hydrophila* isolated from albino. Appl Environ Microbiol. 2010; 50(4): 331-333.

13. Sun H, Zhao P, Ge X, Xia Y, Hao Z, Liu MP. Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes. Appl Biochem Biotechnol. 2010; 160: 988-1003.

14. Guinebretière MH, Auger S, Galleron N, Contzen M, Sarrau B, Buyser ML, Lamberret G, Fagerlund A, Granum PE, Lereclus D, De Vos P, Nguyen F, Sorokin A. The *Bacillus cytotoxicus* sp. a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. Int J Syst Evol. Microbiol. 2013; 63: 31-40.

15. Rasko DA, Altherr MR, Han CS, Ravel J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. FEMS Microbiol Rev. 2005; 29: 303-329.

16. Williams LD, Burdock GA, Jiménez G, Castillo M. Literature review on the safety of toyocerin, a non-toxigenic and non-pathogenic *Bacillus cereus* var. toyoi preparation. Regul Toxicol Pharmacol. 2009; 55(8): 236-246.

17. Jiménez G, Urdiain M, Cifuentes A, López-López A, Blanch AR , Tamames J, Kämpfer P, Kolstø AB, Ramón D, Martínez JF, Codoñer FM, Rosselló-Mora R. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov. novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ani calculations. Syst Appl Microbiol. 2013; 36: 383-39.

18. Harris LJ, Daeschel MA, Stiles ME , Klaenhammer TR. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. Food Prot. 1989; 52(4): 384-387.

19. Awais M, Shahabdul Hameed A, Hasan F. Isolation, identification and optimization of bacitracin produced by *Bacillus* sp. Appl Environ Microbiol. 2007; 4: 1303-1312.

20. Muriana PM, Luchansky JB. Biochemical methods for purification of bacteriocins. In: Hoover DG, Steenson LR (eds.). Bacteriocins of lactic acid bacteria. J Sys Evol Microbiol. 1993; 32: 41-61.

21. Ouwehand AC. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen S, Von Wright A (eds.). Lactic acid bacteria. Microbiology and Functional Aspects. Marcel Dekker. 1998; 34: 139-159.

22. Singh P, Cameotra SS. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. Trend Biotechnol. 2004; 22: 142-146.

Journal of Microbial World
Volume 7, No. 4, January 2015

Original Article

Molecular identification of lantibiotic- producing *Bacillus toyonensis* isolated from soil and evaluation of its antibacterial activity

Dorna Karami Arekhloo[1], **Mohammad Mehdi Mahmoodi**[2]

[1]MS.c., Department of Microbiology, Kazerun branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Microbiology, Kazerun branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Lantibiotics are small peptide antibiotics that produced by a large number of gram positive bacteria to limit growth of other bacteria. This study was performed with the aim of isolation and molecular identification of lantibiotic producer *Bacilli* from soil, also to optimize the production conditions and antibacterial activity of the product.

Materials & Methods: In this basic research, soil samples were collected from green bean fields located at Kazerun. The vegetative cells were killed by pasteurization method and the Gram positive spore former colonies were selected for further studies. These bacteria were grown in the broth media and their culture extracts were examined for lantibiotic production by well diffusion method. Appropriate colonies with high ability for lantibiotic production were selected and identified by biochemical and molecular methods. Also lantibiotic production at different temperatures and pH values was investigated.

Results: The isolated strain was identified as *Bacillus toyonensis* based on DNA sequencing. Maximum lantibiotic production was determined after 24h incubation at 30°C and pH 7. These results showed that the addition of 1% glucose and pepton can improve lantibiotic production. The purified lantibiotic showed inhibitory effects on some gram positive bacteria.

Conclusion: According to ability of this isolated strain in lantibiotic production, further studies is required for more accurate identification of produced lantibiotic in order to be employed in pharmaceutical applications.

Keywords: Lantibiotic, *Bacillus toyonensis*, Antibacterial activity, Soil.

Correspondence to: Mohammad Mehdi Mahmoodi

Tel: +989177044800

E-mail: mmmahmoodi636@yahoo.com

Journal of Microbial World 2015, 7(4): 299-307.