Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2018; 20(129): 10-23

Isolation and Discovery of New Antimicrobial-agent Producer Strains Using Antibacterial Screening of Halophilic Gram-positive Endospore-forming Bacteria Isolated from Saline Lakes of Iran

Asefeh Dahmardeh Ghalehno[1], Maryam Ghavidel-Aliabadi[2], Zeinab Shahmohamadi[2], Maliheh Mehrshad[3], Mohammad Ali Amoozegar[4], Abolghasem Danesh[5*]

1. PhD Student, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
2. Pharmasist, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
3. PhD Student, Extremophiles Laboratory, Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Tehran, Tehran, Iran.
4. Associate Professor, Extremophiles Laboratory, Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Tehran, Tehran, Iran.
5. Assistant Professor, Biotechnology Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Received: 25 Nov 2017, Accepted: 7 Jan 2018

Abstract

Background: Today, discovery and production of new antimicrobial drugs has been emphasized due to the growing of antimicrobial resistance. The purpose of this study was to screen out antimicrobial producing bacteria among halophilic or halotolerant Gram-positive endospore-forming bacteria isolated from different areas of Iran.

Materials and Methods: 62 strains were isolated from salin lakes of Iran, endospore-forming ability was evaluated and further identification of strains was done using 16S rRNA gene sequencing. Screening test was performed using two-layer agar diffusion method in which the indicator strains, *Bacillus cereus* (ATCC 14579) and *Escherichia coli*, (PTCC 1330) were inoculated in the seed layer. Finally, the production of antimicrobial active agent during a period of 7 days was studied followed by evaluating the effect of base-layer agar concentration on the dissemination of antibacterial metabolite.

Results: Isolates WT6, R4A19 produced an agent(s) which inhibited the growth of both *B.cereuse* and *E.Coli*. The inhibition zone against only *E.Coli* was observed when R4A20 strain had been cultured in the base layer, while four non-bacillus strains (R4S2, LbS2, RF1 and WT19) could inhibit the growth of *B.cereuse*. The antibacterial compound production of WT6 against *Bacillus cereuse* and *E.Coli* reached to its optimumm leved after 3 and 4 days respectively, while R4A20 produced the active substance, optimally, after 5 days. No significant difference effect on diameter of zone inhibition was observed among various base-layer agar concentrations.

Conclusion: Halophile or halotolerant endospore-forming bacteria isolated from different areas of Iran possess a potential to be considered as interesting microorganisms for further antimicrobial research studies.

Keywords: Antibacterial agents, Endospore Forming bacteria, Halophiles saline tolerance, Iran.

*Corresponding Author:
Address: School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
Email: DaneshA@mums.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۲۰، شماره ۱۲ (شماره پیاپی ۱۲۹)، اسفند ۱۳۹۶، ۲۳-۱۰

جداسازی و شناسایی سویه‌های تولیدکننده مواد فعال ضدمیکروبی در طی غربال‌گری باکتری‌های گرم‌مثبت تشکیل‌دهنده‌ی آندوسپور هالوفیل جداشده از دریاچه‌های شورایران

آصفه ده‌مرده قلعه‌نو[۱]، مریم قوی‌دل علی‌آبادی[۲]، زینب شاه‌محمدی[۲]، ملیحه مهرشاد[۳]، محمدعلی آموزگار[۴]، ابوالقاسم دانش[۵*]

۱. دانشجوی دکتری، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۲. داروساز، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۳. دانشجوی دکتری، آزمایشگاه اکسترویموفیل‌ها، گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴. دانشیار، آزمایشگاه اکسترویموفیل‌ها، گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۵. استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم نوین دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۴، تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: امروزه، با توجه به رشد روزافزون مقاومت ضدمیکروبی، کشف و تولید داروهای ضدمیکروبی جدید مورد تأکید است. هدف از این مطالعه، بررسی باکتری‌های هالوفیل یا هالوتالرنت تولیدکننده‌ی آندوسپور جداشده از مناطق مختلف ایران به‌منظور غربال‌گری گونه‌های تولیدکننده مواد فعال ضدمیکروبی است.

مواد و روش‌ها: تعداد ۶۲ ایزوله از دریاچه‌های شور مختلف ایران جداسازی شدند، تولید آندوسپور مورد بررسی قرار گرفت و شناسایی تکمیلی با استفاده از توالی‌یابی ژن 16S rRNA انجام شد. غربال‌گری به روش دو لایه در محیط‌کشت آگار به‌گونه‌ای انجام شد که دو باکتری اندیکاتور باسیلوس سرئوس (ATCC 14579) و اشرشیا کلی (PTCC 1330) در لایه‌ی بالایی تلقیح شدند. در انتها تولید ماده‌ی فعال ضدمیکروبی در یک دوره زمانی هفت روزه مورد بررسی قرار گرفت و در ادامه اثر غلظت آگار در لایه‌ی پایینی بر انتشار متابولیت ضدباکتریایی مطالعه شد.

یافته‌ها: سویه‌های WT6 و R4A19 با تولید ماده ضدمیکروبی رشد هر دو باکتری باسیلوس سرئوس و ایشرشیا کلی را مهار کردند. هاله‌ی عدم رشد فقط بر علیه اشرشیا کلی، زمانی‌که سویه‌ی R4A20 در لایه‌ی پایینی کشت داده شده بود، مشاهده شد؛ درحالی‌که چهار سویه R4S2، LbS2، RF1 و WT19 فقط توانستند رشد باسیلوس سرئوس را مهار کنند. حداکثر تولید ماده فعال ضدمیکروبی برای سویه WT6 علیه باسیلوس سرئوس و اشرشیا کلی به‌ترتیب بعد از روز سوم و چهارم به‌دست آمد، درحالی‌که سویه‌ی R4A20 ماده‌ی فعال را پس از ۵ روز به تولید بهینه رساند. در اندازه شعاع هاله عدم رشد در غلظت‌های متفاوت آگارِ موجود در لایه‌ی پایه، تفاوت معناداری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: باکتری‌های هالوفیل یا هالوتالرنت تولیدکننده آندوسپور جداشده از نقاط مختلف ایران به عنوان میکروارگانیسم‌های ضدباکتریایی جالب، ارزش بررسی و تحقیق بیشتری دارند.

واژگان کلیدی: ماده فعال ضدباکتریایی، باکتری‌های تولیدکننده‌ی آندوسپور، هالوفیل‌ها، تحمل شوری، ایران

***نویسنده مسئول:** ایران، مشهد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده داروسازی

Email: DaneshA@mums.ac.ir

مقدمه

امروزه باتوجه به مقاومت پیش‌رونده باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های موجود در بازار یک نگرانی جدی در بخش سلامت ایجاد شده است (۱). به عنوان مثال، مقاومت باکتری سینه‌پهلو (استرپتوکوک پنومونیه) به پنی‌سیلین هم‌چنان رو به افزایش است (۲). به‌طورکلی، در سال ۲۰۱۵، تعداد افراد مبتلا به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک (MDR-TB)، ۴۸۰۰۰۰ تخمین زده شده‌است که بیشتر از ۱۰۰۰۰۰ نفر مبتلا به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین وکاندید دریافت درمان هستند (۱). در آمریکا، سالیانه حدود ۶۳۰۰۰ نفر در اثر ابتلا به میکروب‌های مقاوم بیمارستانی می‌میرند (۳). به گزارش سازمان بهداشت جهانی، ۴۴۰۰۰۰ نفر در جهان سالیانه به سل مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها مبتلا می‌شوند که ۱۵۰۰۰۰ نفر از آن‌ها جان خود را از دست می‌دهند (۴). اهمیت موضوع تا آن‌جا پیش رفته است که روز بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۱ به نام مبارزه با میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک نام‌گذاری شد (۵). اگرچه پدیده ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها یک پدیده طبیعی است، ولی دو عامل به گسترش آن شتاب بخشیده‌است: استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها و عدم وجود روش‌های تشخیصی سریع که منجر به استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف به منظور اطمینان از اثربخشی آن شده است. اکنون با گسترش مقاومت به داروهای ضدمیکروبی و هشدار سازمان بهداشت جهانی، کشف و تولید داروهای ضدمیکروبی جدید مورد تأکید است (۶).میکروارگانیسم‌هایی که برای رشد در محیط‌هایی با شرایط ویژه، سازگاری پیدا کرده‌اند نظیر باکتری‌های نمک‌دوست یا باکتری‌هایی که نمک را تحمل می‌کنند، قابلیت‌های زیادی برای مطالعه و تحقیق از جهت تولید مواد دارای فعالیت‌زیستی و به خصوص آنتی‌بیوتیک‌ها دارند (۷).

آنتی‌بیوتیک‌ها محصولات متابولیسم ثانویه هستند. اگرچه محصول آن‌ها در اغلب تخمیرهای صنعتی نسبتا کم است، ولی به دلیل فعالیت درمانی بالا و ارزش اقتصادی بالای آن‌ها، این مواد در مقیاس تجارتی می‌توانند از طریق تخمیر میکروبی تولید شوند (۸).

میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در تولید ماده ضدمیکروبی شامل باکتری‌ها (۹)، قارچ‌ها (۱۰، ۱۱) ، جلبک‌ها و اکتینومسیت‌ها هستند(۱۲). پسودوموناس‌ها و باسیلوس‌ها که به عنوان مهم‌ترین تولیدکننده آنتی‌بیوتیک‌هایی از نوع پلی‌پپتیدی هستند را می‌توان در دسته‌ی باکتری‌ها قرار داد (۱۳). پسودوموناس‌ها مواد فعال ضدمیکروبی پلی‌پپتیدی، ترکیبات هتروسیکلی و مشتقات فنازینی تولید می‌کنند (۱۴).

برای جداسازی میکروارگانیسم‌های صنعتی از محیط‌های طبیعی مانند خاک، آب، مواد غذایی، میوه‌جات گندیده و فاضلاب استفاده می‌شود و ممکن است در ادامه تغییراتی در ژنتیک و ماشین مولکولی میکروب داده شود (۱۵).

راه اصلی که منجر به کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید می‌شود غربال کردن است. طی این عمل، میکروارگانیسم‌هایی که قادر به تولید مواد فعال ضدمیکروبی باشند از جمعیت میکروبی موجود در منابع طبیعی جدا می‌شوند. تولید ماده قابل نفوذ در محیط‌کشت که از رشد میکروب‌های شناخته‌شده جلوگیری می‌نماید، دلیل وجود مواد فعال ضدمیکروبی می‌باشد. میکروب‌هایی که غالبا برای تست ضدمیکروبی مورد آزمایش قرارمی‌گیرند از میان میکروب‌های آزمایشگاهی چون باسیلوس سوبتیلیس و اشریشیاکلی و میکروب‌های حائز اهمیت از جنبه پزشکی انتخاب می‌گردند. برحسب این‌که جداسازی اولیه انجام گرفته‌است یا خیر، از روش‌های انتشار در آگار و روش متقاطع جهت غربال‌گری اولیه استفاده می‌شود (۱۶، ۱۷).

در غربال‌گری‌ثانویه شناسایی خانواده و جنس انجام می‌شود و سپس وارد مراحل بعدی می‌شویم که شامل تهیه

نمونه خام، کروماتوگرافی و تشخیص ساختمان ماده فعال ضدمیکروبی و تولید آن به شکل انبوه می‌باشد (۱۸).

میکروارگانیسم‌ها همواره در معرض محرک‌های محیطی قرار دارند. باکتری‌ها معمولاً به‌صورت گروهی زندگی می‌کنند و به منظور پاسخ هماهنگ به تحریکات و تنش‌های محیطی، فرآیندهای مختلف زیستی خود را با استفاده از سیستم حد نصاب احساس و تولید مولکول‌های پیام‌رسان کوچک به نام خودالقاگرها تنظیم می‌کنند و با فعال‌سازی یا مهار ژن‌ها به آن‌ها پاسخ می‌دهند. ساخت خودالقاگرها، گیرنده آن‌ها، تنظیم‌کننده‌های پاسخ به آن‌ها و ژن‌های تنظیم‌شونده با آن‌ها از ویژگی‌های کلیدی سیستم حد نصاب احساس هستند (۱۹).

باکتری‌های تولیدکننده آندوسپور کاربرد مهمی در صنعت و پزشکی دارند. به عنوان مثال، جنس باسیلوس کاربرد وسیعی در تولید آنزیم‌های مورد استفاده در صنعت و بیوکنترل های مورداستفاده در کشاورزی دارند. هم چنین، گزارشات علمی متعددی درباره تولید مواد فعال ضدمیکروبی توسط جنس باسیلوس وجود دارد (۲۰).

به‌طورکلی، مطالعات کمتری در زمینه‌ی باکتری‌های اکسترموفیل در جهان نسبت به باکتری‌هایی که در شرایط عادی رشد می‌کنند صورت گرفته است (۶). میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست یا تحمل‌کننده نمک گروهی از اکسترموفیل‌ها هستند که قادر به رشد در محیط واجد نمک هستند و برای زندگی در محیط‌های شور تطابق یافته‌اند. هالوفیل‌ها با متراکم‌کردن مولکول‌های زیستی (که خود سنتز کرده‌اند و یا از محیط گرفته‌اند) در سیتوپلاسم، غلظت آن‌ها را در درون خود با محیط برابر می‌کنند. و دوم این‌که آن‌ها با استفاده از نفوذپذیری انتخابی یون پتاسیم (K^+) به داخل سیتوپلاسم سعی می‌کنند که خود را با محیط سازگار کنند.

از آن‌جایی که روی میکروارگانیسم‌های موجود در ایران (مربوط به اکوسیستم‌های مختلف ایران) کار زیادی انجام نشده است، احتمال کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید زیاد است. هدف از این تحقیق، شناسایی سویه‌های گرم‌مثبت تولیدکننده آندوسپور اکسترموفیل است که از دریاچه‌های شور نقاط مختلف ایران جداشده و مواد فعال ضدباکتریایی تولید می‌کنند.

مواد و روش‌ها

محیط‌های کشت

در این پژوهش، از محیط کشت‌های مختلفی مانند محیط کشت SNA (Sea Nutrient Agar) وSWN (Sea Water Nutrient Agar) برای کشت برخی از باکتری‌های هالوفیل تولیدکننده آندوسپور استفاده شد که هر دو محتوی پپتون گوشت (شرکت QueLab) به‌مقدار ۵ گرم، عصاره قارچ (شرکت PROMEdiA) به‌مقدار ۱ گرم، عصاره گوشت (شرکت Merk) به‌مقدار ۲ گرم، نمک کلرید سدیم به مقدار ۲۰ گرم، سولفات‌منیزیم هفت‌آبه به‌مقدار ۵ گرم، کلریدمنیزیم شش‌آبه ۳ گرم، کلریدپتاسیم به‌مقدار ۰/۵ گرم و آگار (شرکت Himedia) به‌مقدار ۱۵ گرم در یک لیتر آب‌مقطر می‌باشند، با این تفاوت که مقدار نمک کلریدکلسیم در محیط کشت SNA ۰/۵ گرم بر لیتر است و در SWN ۰/۰۵ گرم بر لیتر می‌باشد.

برای رشد و تکثیر برخی از هالوفیل‌های تولیدکننده آندوسپور از محیط‌کشت‌های MH (Moderate halophilic medium) و MH ۲/۵ درصد استفاده شد که اجزای تشکیل‌دهنده این محیط‌های کشت در جدول ۱ آورده شده‌است.

برای رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌های اندیکاتور در مراحل مختلف از محیط کشت‌های Tryptone Soya Broth (TSB)، Tryptone Soya Agar (TSA) و Nutrient Agar (NA) از شرکت Himedia استفاده شد.

جدول ۱. اجزای تشکیل‌دهنده محیط کشت‌های MH و MH 2.5%

محیط کشت MH ۲/۵ درصد		محیط کشت MH	
اجزای تشکیل‌دهنده	مقدار (برحسب‌گرم)	اجزای تشکیل‌دهنده	مقدار (برحسب‌گرم)
پپتون	۵	پپتون	۵
عصاره قارچ	۱۰	عصاره قارچ	۱۰
کلرید سدیم	۲۵/۲۵	کلرید سدیم	۱۰۰
سولفات منیزیم	۲/۴	سولفات منیزیم ۷ آبه	۹/۶
کلرید منیزیم	۱/۷۵	کلرید منیزیم ۶ آبه	۷
کلرید کلسیم	۰/۰۹	کلرید پتاسیم	۲
هیدروژن کربنات سدیم	۰/۰۱۵	کلرید کلسیم ۲ آبه	۰/۳۶
برمیدسدیم	۰/۰۰۶۵	هیدروژن کربنات سدیم	۰/۰۶
گلوکوز	۱	برمیدسدیم	۰/۰۲۶
آگار	۱۵	گلوکوز	۱
آب مقطر	تا ۱۰۰۰ میلی‌لیتر	آگار	۱۵
		آب مقطر	تا ۱۰۰۰ میلی‌لیتر

میکروارگانیسم‌ها

میکروارگانیسم‌هایی که در این پروژه مورد غربال-گری قرار گرفتند، باکتری‌هایی هستند که از دریاچه‌های پرشور مناطق مختلف ایران از جمله دریاچه ارومیه، دریاچه حوض‌سلطان قم، دریاچه نمک آران‌وبیگدل، دریاچه اینچه برون و تالاب کم‌شور گمیشان جداسازی و خالص‌سازی شدند (۲۱). نمونه‌های جمع‌آوری شده شامل آب، خاک و بلورهای نمک بودند که پس از جمع‌آوری در شرایط سترون به آزمایشگاه منتقل شده و تا زمان بررسی در دمای چهار درجه‌ی سانتیگراد نگه‌داری شدند و جداسازی با استفاده از روش سریال رقت بر روی محیط جامد انجام گرفت (۲۲).

تولید آندوسپور در سویه های خالص‌سازی شده با روش رنگ‌آمیزی آندوسپور با استفاده از رنگ مالاشیت گرین مورد بررسی قرارگرفت. شناسایی تکمیلی تعداد ۶۲ سویه تولیدکننده آندوسپور با استفاده از توالی‌یابی ژن ۱۶S rRNA انجام گرفت. جهت تکثیر ژن ۱۶S rRNA از سویه‌های مورد بررسی توده‌زیستی تهیه شده و استخراج DNA ژنومی انجام گرفت(۲۳) و تکثیر ژن زیرواحد کوچک ریبوزومی با استفاده از پرایمرهای عمومی 27F و 1492R به ترتیب با توالی‌های AGAGTTTGATCMTGGCTCAG و CGGTTACCTTGTTACGACTTCACC و با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام گرفت (۲۴). محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز پس از تایید تکثیر با استفاده از الکتروفورز ژلِ آگاروز برای تعیین ترادف مورد استفاده قرارگرفت (شرکت ماکروژن، کره‌جنوبی). توالی‌های دریافت شده با استفاده از نرم‌افزار Chromas Pro ویرایش شده و با استفاده از نرم افزار BLAST با توالی‌های معتبر ثبت شده در درگاه EZbiocloud مقایسه و نزدیک‌ترین سویه استاندارد ثبت شده از نظر توالی ژنی ۱۶S rRNAمشخص شد (۲۵).

باکتری‌های باسیلوس سرئوس (ATCC 14579) و اشریشیا کلی (PTCC 1330) به‌عنوان اندیکاتور تست‌های ضدمیکروبی استفاده شدند.

بهینه‌سازی نمک محیط کشت

محیط کشت‌های SNA، SWN و MH هرکدام به‌ترتیب دارای ۲۰، ۲۰ و ۱۰۰ گرم‌برلیتر نمک کلرید سدیم در فرمول محیط‌کشت می‌باشند. ازآن‌جایی‌که تست غربال-گری به روش دولایه باید انجام می‌شد، بهینه‌سازی غلظت نمک در لایه پایه برای عدم تاثیرگذاری منفی بر روی باکتری

های اندیکاتور (باسیلوس سرئوس و اشریشیا کلی) که در لایه بالایی قرار داشتند، ضروری به‌نظر می‌رسید. ابتدا از باکتری‌های اندیکاتور در محیط‌کشت مایع TSB تلقیح شد و پس از رسیدن کدورت رشد میکروبی در طول‌موج ۶۲۰ نانومتر به حدود ۰/۷ تا ۰/۸، حدود ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی با ۸ میلی‌لیتر از محیط کشت TSA مذاب در دمای ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌طوری مخلوط شد که غلظت نهایی میکروبی حدود نیم مک‌فارلند شود و بلافاصله بر روی لایه پایه که از قبل با غلظت‌های متفاوتی از نمک کلریدسدیم تهیه شده‌بود، ریخته شد. سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد و پس از گذشت ۱۲ تا ۱۶ ساعت چگونگی تاثیر غلظت نمک کلریدسدیم موجود در لایه پایه بر روی رشد باکتری‌های اندیکاتور موجود در لایه بالایی بررسی شد. غلظت‌های مختلف نمک کلریدسدیم در لایه پایه در محیط کشت‌های SWN و SNA به میزان ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرم بر لیتر و برای محیط کشت MH به میزان ۱۵، ۲۰، ۵۰، ۸۰ و ۱۰۰ گرم بر لیتر در نظرگرفته شد.

تست‌ها به صورت دوبار تکرار انجام شد. مقدار بهینه نمک کلریدسدیم مقداری است که از یک طرف باکتری‌های اندیکاتور بتوانند در لایه بالایی رشد کنند و از طرف دیگر باکتری هالوفیل اصلی ما هم بتواند در لایه پایینی رشد کرده و اثرات متابولیکی خود را نشان دهد.

انجام تست غربال‌گری ضدمیکروبی

جهت انجام تست غربال‌گری، ابتدا باکتری‌های گرم‌مثبت تولیدکننده آندوسپور جداشده، بر روی محیط کشت اختصاصی خود در لایه پایه که دارای مقدار بهینه‌شده‌ای از نمک کلریدسدیم بود، به‌صورت دایره‌وار با قطر مشخص تلقیح شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری انجام شد. پس از گذشت ۳ تا ۴ روز از رشد سویه و اسپورسازی، کلنی‌های رشدیافته هالوفیل‌ها با ۲۰ میکرولیتر ایزوپروپانل تر شد و پس از اندک زمانی محیط کشت لایه بالایی که محتوی باکتری‌های اندیکاتور است در حالت مذاب و به‌طریقی که قبلا شرح داده شد بر روی لایه پایه ریخته شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. وجود یا عدم وجود هاله عدم رشد در اطراف ناحیه رشد یافته پس از ۱۲ تا ۱۶ ساعت بررسی شد. از هر گروه سویه‌هایی که فعالیت ضدمیکروبی قابل ملاحظه‌ای از خود نشان دادند، برای مرحله بعد انتخاب شدند. پلیت کنترل منفی دقیقا مانند تست انتخاب و طراحی شد، فقط با این تفاوت که تلقیحی روی لایه پایه انجام نشده بود.

اثر زمان بر تولید ماده فعال ضدمیکروبی

برای بررسی اثر زمان بر روی تولید ماده (مواد) فعال ضدمیکروبی توسط سویه‌های منتخب، بررسی تولید ماده فعال ضدمیکروبی به‌صورت دوبار تکرار مانند بالا انجام شد، با این تفاوت که سویه‌ها در پلیت‌های مختلف و در بازه‌های زمانی ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۷ روزه کشت داده‌شدند و تست ضدمیکروبی انجام شد و شعاع هاله عدم‌رشد از هشت جهت با کولیس اندازه‌گیری شد.

اثر غلظت آگار بر انتشار ماده فعال ضدمیکروبی

به منظور بررسی اثر غلظت آگار محیط‌کشت بر انتشار و نفوذ ماده‌ی فعال ضدمیکروبی تولید شده توسط باکتری‌های منتخب، اثر چهار غلظت متفاوت از آگار در لایه پایه (۰/۷، ۱، ۱/۲ و ۱/۵ درصد) مورد مطالعه قرارگرفت.

تحلیل آماری

تحلیل آماری براساس میانگین تغییرات شعاع هاله عدم‌رشد و اندازه‌گیری انحراف‌معیار از میانگین انجام شد. در تست آماری تحلیل واریانس یک-طرفه با آزمون تعقیبی توکی مقدار ارزش p کمتر از ۰/۰۵، معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

شناسایی باکتری

در این پژوهش، از نمونه‌های جداشده از مناطق شور ایران، تعداد ۶۲ گونه باکتری جداسازی شدند که پس از

رنگ‌آمیزی مالاشیت‌گرین به عنوان باکتری‌های گرم‌مثبت تولیدکننده آندوسپور شناسایی شدند. سویه‌های جداشده با استفاده از آنالیز ۱۶S rRNA تعیین گونه شدند و در دو گروه باکتری‌های گرم‌مثبت تولیدکننده آندوسپور هالوفیل یا هالوترانت متعلق به جنس باسیلوسی (۳۱ گونه) و باکتری‌های گرم‌مثبت تولیدکننده آندوسپور غیرباسیلوسی (۳۱ گونه) طبقه‌بندی شدند که نام و مشخصات آن‌ها به‌همراه نزدیک‌ترین سویه از لحاظ فیلوژنی در جداول ۲ و ۳ آورده شده‌است.

جدول ۲. نتایج تست غربال‌گری برای سویه‌های گرم‌مثبت تولیدکننده آندوسپور هالوفیل یا هالوتالرنت مربوط به جنس‌های باسیلوسی جداشده از نقاط مختلف ایران

ردیف	نام جدایه	نام نزدیک‌ترین سویه بر اساس الگوی 16SrRNA	محیط کشت مورد استفاده	ظهور هاله عدم رشد	
				B.cereus	*E.coli*
۱	DB9	*Bacillus vietnamensis 15-1(T)*	MH	_	_
۲	WT1	*Bacillus clausii KSM-K16*	SWN	±	_
۳	BH6	*Bacillus halmapalus DSM 8723(T)*	SWN	±	_
۴	WT4	*Bacillus vallismortis DSM 11031(T)*	SWN	±	-
۵	BG3	*Bacillus horikoshii DSM 8719(T)*	SWN	±	-
۶	BH50	*Bacillus pseudofirmusDSM 8715(T)*	SWN	-	-
۷	BB6	*Bacillus niabensis 4T19(T)*	SWN	-	-
۸	WT6	*Bacillus safensis FO-036b(T)*	MH	+	+
۹	BH20	*Bacillus daliensis DLS13(T)*	SWN	-	-
۱۰	R4A19	*Bacillus clausii KSM-K16*	MH	+	+
۱۱	W4S21	*Bacillus vietnamensis 15-1*	SNA	±	-
۱۲	R2S12	*Bacillus mojavensis IFO 15718*	SWN	-	-
۱۳	M16	*Bacillus sonorensis*	SWN	+	-
۱۴	M36	*Bacillus jeotgali*	SWN	+	-
۱۵	F2	*Bacillus safensis FO-036b(T)*	SWN	+	-
۱۶	C3	*Bacillus safensis FO-036b(T)*	SWN	±	-
۱۷	GB2	*Bacillus safensis FO-036b(T)*	SWN	-	-
۱۸	I1	*Bacillus aerophilus 28k*	SWN	-	-
۱۹	K4	*Bacillus safensis FO-036b(T)*	SWN	+	-
۲۰	RC1	*Bacillus atrophaeus*	MH	-	-
۲۱	I6	*Bacillus safensis FO-036b(T)*	MH	±	-
۲۲	M8	*Bacillus thuringiensis*	SWN	±	-
۲۳	B7sub	*Bacillus hwajinpoensis*	MH	-	-
۲۴	GA5	*Bacillus aryabhatti*	MH	-	-
۲۵	G7	*Bacillus safensis FO-036b(T)*	SWN	-	-
۲۶	S27-3	*Bacillus cereus ATCC 14579(T)*	NA	-	-
۲۷	S10-4	*Bacillus safensis FO-036b(T)*	NA	-	-
۲۸	-	*Bacillus sp. GASY1*	MH2.5%	-	-
۲۹	-	*Bacillus sp.GASYg*	MH2.5%	-	-
۳۰	-	*Bacillus sp. GASx21*	MH2.5%	-	-
۳۱	-	*Bacillus sp. GASx6*	MH2.5%	-	-

جدول۳. نتایج تست غربال‌گری برای سویه‌های گرم‌مثبت تولیدکننده آندوسپور هالوفیل یا هالوتالرنت مربوط به جنس‌های غیرباسیلوسی جداشده از نقاط مختلف ایران

ردیف	نام جدایه	نام نزدیک‌ترین سویه بر اساس الگوی 16SrRNA	محیط کشت مورد استفاده	ظهور هاله عدم رشد	
				B.cereus	*E.coli*
۱	BH3	*Alkalibacterium* putridalgicola	MH	–	–
۲	DA2	*Pontibacillus marinus* BH030004 (T)	MH	–	–
۳	DB2	*Thalassobacillus hwangdonensis* AD-1(T)	MH	–	–
۴	DB8	*Halobacillus profundi* IS-Hb4 (T)	MH	–	–
۵	DC2	*Alkalibacterium putridalgicola* T129-2-1 (T)	MH	–	–
۶	BE1	*Oceanobacillus picturae* LMG 19492 (T)	MH	–	–
۷	WT20	*Gracilibacillus dipsosauri* DD1(T)	MH	–	–
۸	R4A20	O*ceanobacillus oncorhynchi*	MH	–	+
۹	R4S2	*Virgibacillus olivae* E308	SNA	+	–
۱۰	LbS2	*Virgibacillus salaries* SA-VB1	SNA	+	–
۱۱	R2A12	*Halobacillus alkaliphilus* FP5 (T)	MH	–	–
۱۲	WT16	*Piscibacillus salipiscarius* RBU1-1 (T)	MH	–	–
۱۳	R4A11	*Halobacillus profundi* IS-Hb4	MH	–	–
۱۴	W1B8	*Oceanobacillus picturae* LMG 19492	MH	–	–
۱۵	R4A39	*Virgibacillus necropolis* LMG 19488	MH	–	–
۱۶	R3A11	*Halomonas fontilapidosi* 5CR	MH	–	–
۱۷	MB5	*Terribacillus aidingensis*	SWN	–	–
۱۸	M47	*Oceanobacillus picturae* LMG 19492 (T)	SWN	–	–
۱۹	RF1	*Psychrobacter faecais*	SWN	+	–
۲۰	BD5	*Ornithinibacillus scapharcae*	SWN	–	–
۲۱	H10	*Oceanobacillus picturae* LMG 19492 (T)	MH	–	–
۲۲	SE2	*Virgibacillus necropolis* LMG 19488	SWN	–	–
۲۳	M47sub	*Oceanobacillus pictura* LMG 19492 (T	MH	–	–
۲۴	KB1	*Virgibacillus byunsanensis*	MH	–	–
۲۵	N7	*Pontibacillus chungwensis*	MH	–	–
۲۶	B16	*Piscibacillus halophilus*	MH	–	–
۲۷	-	*Nesiotobacter sp.* GBW_{X7}	MH2.5%	–	–
۲۸	-	*Cyclobacterium sp.* GBP_{X2}	MH2.5%	–	–
۲۹	-	*Marinobacter sp.* GAW_{Y5}	MH2.5%	–	–
۳۰	-	*Marinobacter sp.* GBW_{X8}	MH2.5%	–	–
۳۱	WT19	-	MH	+	–

-: عدم مهار رشد باکتری اندیکاتور در لایه بالایی. +: مهار رشد باکتری اندیکاتور در لایه بالایی به شک هاله عدم رشد.±: هاله عدم رشد مشاهده شد اما واضح نبود.

نتایج تست بهینه‌سازی محیط کشت

در بهینه‌سازی مقدار نمک کلریدسدیم موجود در محیط کشت‌های SWN و SNA، میکروارگانیزم‌های اندیکاتور باسیلوس‌سرئوس و اشریشیاکلی به‌خوبی در لایه بالایی رشد کردند و اثری منفی از کلریدسدیم موجود در لایه پایه مشاهده نشد. ولی در محیط کشت MH در غلظت ۱۰۰

گرم‌برلیتر باسیلوس سرئوس اصلا رشد نکرد که نتایج مطابق جدول ۴ می‌باشد. در نهایت غلظت ۸۰ گرم‌برلیتر نمک کلریدسدیم انتخاب شد، زیرا در این غلظت باسیلوس سرئوس و اشریشیا کلی تا حدی که بتوان تست غربال‌گری را انجام داد و هاله عدم رشد را مشاهده کرد، رشد کردند.

جدول ٤. بهینه‌سازی مقدار نمک کلرید سدیم موجود در محیط‌کشت MH لایه پایه و بررسی اثر آن بر رشد باکتری‌های اندیکاتور در لایه بالایی

Indicator bacteria	NaCl Concentration (g/l)				
	۱۵	۲۰	۵۰	۸۰	۱۰۰
Bacillus cereuse	++++	++++	+++	+++	-
Escherichia coli	++++	++++	++++	++++	+++

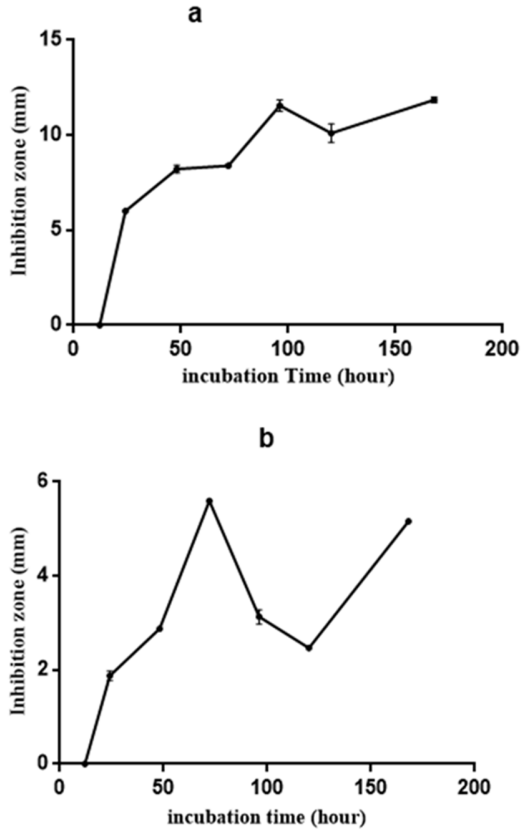
نتایج تست غربال‌گری

از بین ۳۱ سویه باکتری‌های جنس باسیلوسی که غربال‌گری شدند، چهارده سویه باعث مهار رشد باکتری‌های اندیکاتور در لایه بالایی شدندکه از این چهارده سویه، دوازده سویه توانستند فقط رشد باکتری باسیلوس سرئوس را مهار کنند، درحالی‌که دو سویه WT6 و R4A19 باعث مهار هر دو باکتری باسیلوس سرئوس و اشریشیا کلی شدند (جدول ۲).

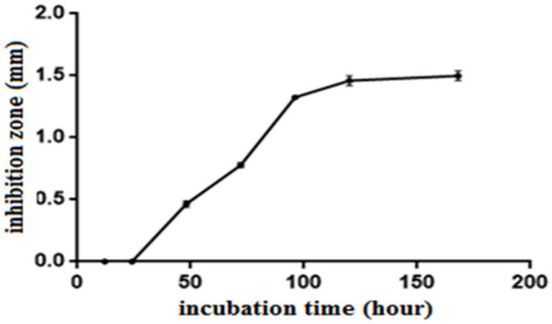
از بین ۳۱ سویه باکتری‌های جنس غیرباسیلوسی، چهار سویه‌ی R4S2، LbS2، RF1 و WT19 توانستند فقط رشد باکتری اندیکاتور باسیلوس سرئوس موجود در لایه‌ی بالایی را با تولید ماده فعال ضدمیکروبی مهار کنند و اثری بر روی اشریشیا کلی نداشتند، درحالی‌که فقط یک سویه‌ی R4A20 با تولید ماده فعال ضدمیکروبی باعث ایجاد هاله عدم رشد در کشت باکتری اندیکاتور اشریشیا کلی شد (جدول ۳).

نتایج بررسی اثرزمان انکوباسیون برتولید ماده فعال ضدمیکربی

باکتری‌ها در یک بازه‌ی زمانی هفت‌روزه کشت داده شدند و حداکثر تولید ماده فعال ضدمیکروبی علیه باکتری‌های اندیکاتور توسط شعاع هاله عدم‌رشد اندازه‌گیری شد. حداکثر تولید ماده فعال ضدمیکروبی توسط سویه WT6 علیه باکتری باسیلوس سرئوس بعد از روز سوم وعلیه باکتری اشریشیاکلی بعد از روز چهارم ایجاد شد، درحالی‌که تولید ماده فعال ضدمیکروبی توسط سویه R4A20 بعد از پنج روز به بیشترین میزان خود رسید که به‌ترتیب در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است.

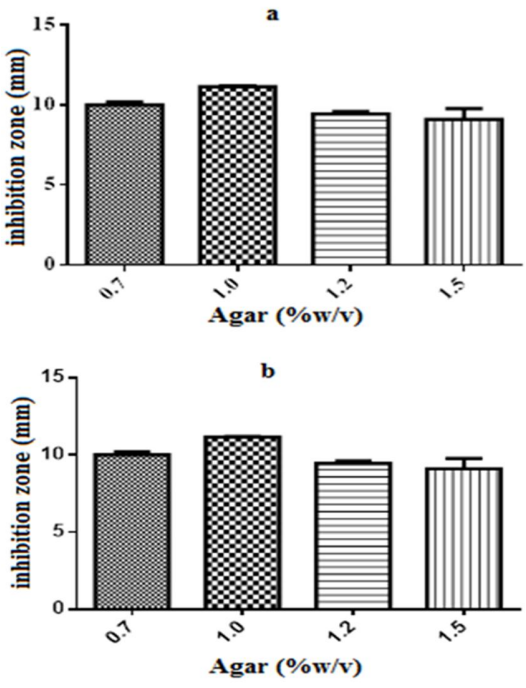


نمودار۱. بررسی اثر زمان انکوباسیون بر تولید ماده فعال ضدمیکروبی توسط سویه WT6 علیه (a) باکتری اشرشیاکلی (p : ۰/۰۰۲۶) و (b) باکتری باسیلوس‌سرئوس (p < ۰/۰۰۰۱).

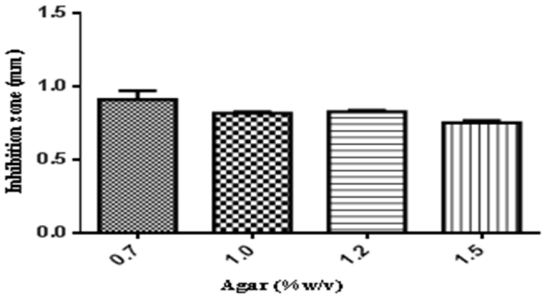


نمودار۲. تغییرات شعاع هاله عدم‌رشد در بازه زمانی هفت‌روزه برای ماده فعال ضدمیکروبی تولیدشده توسط سویه R4A20 ($p < ۰/۰۰۰۱$).

تاثیر غلظت آگار بر نفوذ ماده فعال ضدمیکروبی سویه‌های R4A20 و WT6 بر روی محیط‌کشت اختصاصی خود (MH) با غلظت‌های متفاوت از آگار کشت داده شدند و همان‌طور که در نمودار ۳ و۴ مشاهده می‌شود، تفاوت معناداری در اندازه شعاع هاله عدم‌رشد در غلظت‌های متفاوت وجود نداشت.



نمودار۳. اثر غلظت آگار در محیط‌کشت پایه‌ی MH بر نفوذ ماده فعال ضدمیکروبی تولید شده توسط سویه‌ی WT6 علیه باکتری باسیلوس سرئوس (a)($p : ۰/۳۶۸$) و باکتری اشریشیاکلی (b) ($p : ۰/۲۵$) با اندازه گیری شعاع هاله عدم‌رشد.



نمودار٤. تغییرات شعاع هاله عدم‌رشد نسبت به تغییر درصد آگار در محیط‌کشت MH برای ماده فعال ضدمیکروبی تولیدشده توسط سویه R4A20 ($p : ۰/۰۸۱۸$).

بحث

با افزایش مقاومت میکروب‌های پاتوژن به آنتی‌بیوتیک‌ها تهدید بسیار جدی برای سلامتی انسان‌ها به وجود خواهد آمد. میکروارگانیسم‌هایی که برای رشد در محیط‌هایی با شرایط ویژه سازگاری پیدا کرده‌اند، نظیر باکتری‌های نمک‌دوست یا تحمل‌کننده نمک، قابلیت‌های زیادی برای مطالعه و تحقیق از جهت تولید مواد دارای فعالیت زیستی و به‌خصوص آنتی‌بیوتیک دارند.

یک چالش جدی در انجام غربال‌گری ضدمیکروبی برای این میکروارگانیزم‌ها، تفاوت شرایط مناسب برای تولید ماده فعال ضدمیکروبی توسط این میکروارگانیسم‌های نمک دوست با شرایط مناسب برای رشد باکتری‌های اندیکاتور است. هالوفیل‌ها در غلظت بالایی از نمک در محیط کشت و یا pH متفاوتی (قلیایی یا اسیدی) رشد می‌کنند، درحالی‌که این شرایط برای باکتری‌های اندیکاتور مورد استفاده در تست‌های غربال‌گری جهت رشدشان در لایه بالایی نامطلوب می‌باشد. لایه پایه که هالوفیل‌ها بر روی آن رشد می‌کنند دارای مقادیر زیادی نمک است که پس از رشد هالوفیل‌ها و بعد از ریختن لایه‌ی بالایی بر روی آن، نمک می‌تواند در لایه‌ی بالایی انتشار یابد و بسته به مقدار آن ممکن است مانع از رشد باکتری‌های اندیکاتور موجود در لایه‌ی بالایی (اشریشیا کلی و باسیلوس سرئوس) شود، از این رو لازم بود که ابتدا مقدار نمک بهینه شود. لازم به ذکر است که مقدار نمک و

قلیای موجود در لایه‌ی پایه و نفوذ و انتشار آن در لایه‌ی بالایی و اثر منفی آن بر رشد باکتری‌های اندیکاتور در چندین تحقیق مشاهده شده است (۲۰، ۲۶) که ضروری بود مقدار نمک بهینه شود، زیرا برای مشاهده هاله عدم‌رشد نیاز به رشد مناسب باکتری‌های اندیکاتور است. در این مطالعه، محیط‌کشت باکتری‌های نمک‌دوست (لایه پایینی) حاوی غلظت‌های بالایی از نمک کلریدسدیم بود. در نتیجه، محیط‌کشت‌های مذکور برای ایجاد مقدار بهینه غلظت نمک کلریدسدیم که از یک طرف برای باکتری‌های نمک‌دوست سازگار باشد و از طرف دیگر باکتری‌های اندیکاتور باسیلوس سرئوس و ایشریشیاکلی بتوانند در آن رشد کنند، مورد آزمایش قرار گرفتند. همان‌طور که در جدول۴ آمده است برای محیط‌کشت MH، در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم از نمک کلریدسدیم برای باکتری اندیکاتور باسیلوس‌سرئوس مهار رشد وجود داشت، اما اشریشیاکلی حتی در غلظت ۱۰۰ میلی گرم از نمک کلرید سدیم به‌خوبی رشدکرد. از آن‌جایی‌که باکتری‌های گرم‌منفی مقاوم‌تر از باکتری‌های گرم‌مثبت هستند، ممکن است غلظت نمک بالا را به این دلیل تحمل کرده باشند. بنابراین در تست غربال‌گری محیط‌کشت MH با غلظت نمک کلریدسدیم ۸۰ میلی‌گرم‌بر لیتر برای تست با باکتری اندیکاتور باسیلوس‌سرئوس تهیه شد. از آن جایی که محیط‌کشت MH ۲/۵ درصد دارای غلظت نمک ۲۵ گرم برلیتر بود، نیاز به انجام مرحله بهینه‌سازی نداشت، چون محیط MH با مقدار نمک ۱۰۰ میلی‌گرم‌برلیتر که برای باسیلوس‌سرئوس مهارکننده بود، خیلی بالاتر از ۲۵ میلی‌گرم بود.

pH محیط‌های کشت مورد استفاده در لایه‌ی پایه حدود ۷/۵ تنظیم می‌شود و مشکلی برای رشد میکروب‌های اندیکاتور ایشریشیاکلی و باسیلوس‌سرئوس ایجاد نمی‌کند. در مطالعه ای که دانش و همکاران در سال ۲۰۱۱ در یک غربال-گری برای سویه‌های قلیادوست (آلکالیفیل) جمع‌آوری‌شده از آفریقای شرقی در دانشگاه لوند سوئد انجام دادند، سدیم کربنات موجود در محیط‌کشت پایه چالش‌زا بود که باعث مهار رشد باکتری‌های اندیکاتور در لایه بالایی شده بود. نتایج در این مورد نیز حساس‌تر بودن باسیلوس نسبت به اشریشیاکلی را نشان داده است (۲۰). تعداد ۶۲ ایزوله‌ای که از دریاچه‌های شور ایران جداشدند، توسط آنالیز ژنتیکی ۱۶S rRNA و با رسم درخت فیلوژنتیکی نزدیک‌ترین سویه که شباهت بسیاری با آن‌ها داشت مشخص شد. هرچند استفاده از این روش یکی از مطمئن‌ترین روش‌هاست (۲۷)، ولی چنان‌چه در مراحل بعد که شامل تولید در مقدار انبوه، خالص‌سازی و شناسایی ماده فعال است، سویه‌ای ماده ضدمیکروبی باارزشی تولید کند، باید به‌طور دقیق‌تری تعیین گونه انجام شود.

در جنس باسیلوسی، دو سویه‌ی WT6 و R4A19 متابولیت‌هایی تولید کردند که رشد هر دو باکتری اندیکاتور باسیلوس سرئوس (گرم مثبت) و اشریشیا کلی (گرم‌منفی) را مهار کردند. امین و همکاران در سال ۲۰۱۵ گونه‌هایی از باکتری‌های باسیلوسی از خاک جدا کردند که مواد فعالی تولید می‌کردند که اثرات ضد میکروبی بر علیه اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس داشتند (۲۸). در جنس غیرباسیلوسی سویه‌هایی که توانستند رشد باسیلوس سرئوس را مهار کنند، سویه‌های WT19، RF1، LbS2 و R4S2 می‌باشند که ممکن است به دلیل ساختار سست دیواره سلولی در باکتری‌های گرم‌مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط آن سویه‌ها بر روی باکتری‌های گرم‌مثبت بیشتر اثر کرده است، چراکه مواد آنتی‌بیوتیکی نسبتا به آهستگی به غشای خارجی نفوذ می‌کنند. سویه‌ای که برعلیه اندیکاتور اشریشیاکلی هاله عدم‌رشد ایجاد کرد، سویه R4A20 (Oceanobacillus oncorhynchi) بود که مواد فعال تولیدشده فقط برعلیه باکتری اشریشیاکلی که گرم‌منفی است موثر بود. در یک مطالعه که در سال ۲۰۱۳ توسط تامبکار و همکارانش انجام شد، سویه دیگری از این جنس به نام Oceanobacillus inehyensis مشاهده شد که خواص ضدمیکروبی برعلیه

اشریشیا کلی از خود نشان داد، ولی برعلیه باسیلوس سوبتلیس اثرات ضدمیکروبی کمتری ایجاد کرد (۲۹).

از آن‌جایی که متابولیت‌های ثانویه‌ی تولیدشده توسط میکروارگانیسم‌ها ممکن است درطول زمان متفاوت باشد، یعنی در یک زمان خاصی به حداکثر برسد، یک دوره ۷ روزه برای انجام تست غربال‌گری انتخاب شد. همان‌طور که در نمودار۲ نشان داده شده است، در این مطالعه که با سویه R4A20 انجام شد (سویه‌ای که هاله رشد بهتری نشان داده بود)، در فاصله‌زمانی ۱۲ ساعته و ۲۴ ساعته هیچ هاله‌ی عدم‌رشدی ایجاد نشد که این نشان می‌دهد ماده موثره آن از نوع متابولیت ثانویه بوده است که بعد از پنج روز به حداکثر تولید خود رسید، در حالی‌که حداکثر تولید ماده فعال ضدمیکروبی سویه WT6 موثر بر علیه باسیلوس سرئوس و اشریشیاکلی به ترتیب بعد از روز سوم و چهارم ایجاد شد (نمودار۱). این داده‌ها برای مرحله تولید وخالص‌سازی مواد فعال دارای اهمیت است. در یک مطالعه مشابه که توسط دانش و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی یک باسیلوس آلکالوفیل انجام شده‌است، تولید ماده فعال ضدمیکروبی پس از دو روز به بیشترین میزان خود رسید که پس از گذشت ۵ روز دوباره فعالیت ضدمیکروبی کم شد (۲۰).

نتیجه‌گیری

غلظت آگار یک فاکتور مهم در محیط‌های کشتی محسوب می‌شود که در تست‌های غربال‌گری ضدمیکروبی استفاده می‌شوند (۲۶). این‌که یک ماده ضد میکروبی تولید می‌شود یا دو ماده، انتشار آن‌ها در مقدار غلظت‌های مختلفی از آگار متفاوت خواهد بود و با افزایش غلظت آگار این تفاوت متمایزتر خواهد شد. در مطالعه‌ای که مشهدی و همکاران انجام دادند(۲۶)، چنین تفاوتی مشاهده شد و معلوم شد دو ماده‌ی فعال تولید می‌شود که یکی برعلیه اشریشیا کلی در غلظت ۱/۲ درصد بیشترین هاله عدم رشد را به‌وجود آورد و دیگری در غلظت ۱/۵ درصد بر علیه باسیلوس سوبتیلیس بیشترین عاله عدم‌رشد را ایجاد می‌کرد و در آزمایشات بعدی این یافته تثبیت شد. اما همان‌گونه که در نمودار ۳ و۴ دیده شد، در این مطالعه هاله عدم‌رشد در غلظت‌های مختلف آگار اختلاف معنی‌داری نداشت (ارزش p بیشتر ۰/۰۵ محاسبه شده است). این موضوع می‌تواند یک مزیت برای متابولیت تولیدشده در نظرگرفته شود. به‌عنوان مثال، این ماده‌فعال می‌تواند در سامانه‌های ویسکوز و دارای پروسیتی مختلف استفاده شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به خاطر حمایت مالی از این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد. این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌های خانم مریم قویدل و زینب شاه‌محمدی می‌باشد.

منابع

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2016. Geneva: World Health organization; 2016.
2. Kim SH, Bae IK, Park D, et al. Serotype Distribution and Antimicrobial Resistance of Streptococcus pneumoniae Isolates Causing Invasive and Noninvasive Pneumococcal Diseases in Korea from 2008 to 2014. BioMed Research International 2016; Article ID 6950482, 7 pages, doi:10.1155/2016/6950482
3. Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. Front Microbiol 2010; 1:134.
4. World Health Organisation. "Antimicrobial resistance". Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/.2011. [Last Accessed in 2011 Dec 5].
5. World Health Organisation. Global foodborne infections network. Available from: http://www.who.int/gfn/en/. [Last Accessed on 2011 Dec 6]
6.Wise R, Blaser M, Carrs O, et al. The urgent need for new antibacterial agents. J Antimicrob Chemother 2011; 66(9): 1939-1940.

7. Ballav S, Kerkar S, Thomas S, Augustine N. Halophilic and halotolerant actinomycetes from a marine saltern of Goa, India producing anti-bacterial metabolites. J Biosci Bioeng. 2015; 119(3): 323-30.
8. Wang YH, Feng JT, Zhang Q, Zhang X. Optimization of fermentation condition for antibiotic production by Xenorhabdus nematophila with response surface methodology. J Appl Microbiol. 2008; 104(3): 735-44.
9. Raaijmakers JM, Vlami M, De Souza JT. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. Antonie van Leeuwenhoek 2002; 81(1): 537-547.
10. Khiralla A1, Mohamed IE2, Tzanova T3, Schohn H3, Slezack-Deschaumes S4, Hehn A4, André P5, Carre G5, Spina R1, Lobstein A6, Yagi S2, Laurain-Mattar D7.Endophytic fungi associated with Sudanese medicinal plants show cytotoxic and antibiotic potential. FEMS Microbiology Letters 2016; 363(11), fnw089, https://doi.org/10.1093/femsle/fnw089
11. Nielsen JC, Grijseels S, Prigent S, et al, Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals vast potential of secondary metabolite production in Penicillium species, Nature Microbiology (2017). DOI: 10.1038/nmicrobiol.2017.44.
12. Atta HM, Ahmad MS. Antimycin-A antibiotic biosynthesis produced by Streptomyces sp. taxonomy, fermentation, purification and biological activities. Aust J Basic Appl Sci 2009; 3: 126-135.
13.Raaijmakers JM, De Bruijn I, Nybroe O, et al. Natural functions of lipopeptides from Bacillus and Pseudomonas: more than surfactants and antibiotics. FEMS Microbiol Rev 2010; 34(6): 1037-1062.
14.Mavrodi DV, Blankenfeldt W, Thomashow LS. Phenazine compounds in fluorescent Pseudomonas spp. biosynthesis and regulation. Annu Rev Phytopathol 2006; 44: 417-445.
15. Wittmann C, Liao JC. Industrial Biotechnology: Microorganisms. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2017 doi: 10.1002/9783527807796.fmatter1
16. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. Clin Infect Dis 2009; 49(11), 1749–1755.
17. VelhoPereira S, Kamat N. Antimicrobial screening of actinobacteria using a modified cross-streak method. Indian J Pharm Sci 2011; 73(2): 223–228.
18. Sharma M, Dangi P, Choudhary M. Actinomycetes Source, Identification, and Their Applications. Inter J Curr Microbiol App Sci 2014; 3: 801-832.
19.Darvishi F. Regulation of Gene Expression by Quorum Sensing in Bacteria. Genetics in the 3rd millennium 2013; 11(1): 3028-3035.
20. Danesh A. Production, purification and characterization of antibacterial biomolecules from an alkaliphilic Bacillus 2011; 136s. [PhD Thesis]. Lund University, Sweden, 2011.
21.Makhdoumi Kakhki A, Amoozegar MA, Kazemi B, PaiC L, Ventosa A. Prokaryotic diversity in Aran-Bidgol salt lake, the largest hypersaline playa in Iran. Microbios and environ 2012; (1)27: 87-93.
22.Mehrshad M, Amoozegar MA, Yakhchali B, Shahzase FSA. Biodiversity of moderately halophilic and halotolerant bacteria in the western coastal line of Urmia Lake. Diversity 2012; 1(2): 49 - 69.
23.Goto K, Omura T, Hara Y, Sadaie Y. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus Bacillus. J Gen Appl Microbiol 2000; 46(1): 1-8.
24.Darvishi F, Golbang N, Hojati Z, Motovali-bashi M. Isolation of the Streptomycin antibiotic production regulatory gene (strR) by PCR. Iranian Journal of Biol 2006; 19(3): 264-71.
25.Chun J, Lee JH, Jung Y, et al. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol 2007; 57(10): 2259-2261.

26. Mashhadi S, Moshtaghi Nikou M, Amoozegar M A, Danesh A. Isolation and Identification of a Rare Actinomycete with Antibacterial Activity from Saline Region of Iran . Res Mol Med (RMM) 2016; 4(3): 10-16.
27. Rabbani M, Sadeghi HM, Karjoo Z. Molecular detection of Streptomyces griseus isolated from Isfahan soil. Pak J Biol Sci 2007; 10(19):3374-9.
28. Amin M, Rakhisi Z, Zarei Ahmady A. Isolation and identification of Bacillus species from soil and evaluation of their antibacterial properties. Avicenna J Clin Microb Infec. 2015; 2(1): e23233.
29. Dh T, Dhundale VR. Screening of Antimicrobial potentials of haloAlkaliphilic Bacteria isolated from lonar lake. Int J Pharm Chem Biol Sci 2013; 3(3): 820-825.