

ORIGINAL ARTICLE

*Antimicrobial Activities of Natural Products from *Bacillus* Species Isolated from the Caspian Sea*

Mojtaba Mohseni¹,
Mina Tavasoli²

¹ Assistant Professor, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
² MSc Student in Microbiology, Faculty of Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

(Received January 3, 2014 ; Accepted February 15, 2015)

Abstract

Background and purpose: Research for discovery and development of new and effective antimicrobial agents has been raised due to increasing rate of numerous multi-drug resistant pathogens. Marine bacteria especially *Bacillus* species are a rich source of potentially versatile secondary metabolites with antimicrobial activities. In this study, sediments of the Caspian Sea were screened for natural products obtained from *Bacilli* spp. with antimicrobial activities.

Materials and methods: Marine sediments were collected from different locations of the Caspian Sea shores. To isolate *Bacillus*, diluted samples were inoculated on rich medium and incubated at 30 °C. Preliminary screening of the isolates was performed using cross streak method against Gram positive and Gram negative bacteria. In addition, crude extracts of the selected *Bacillus* spp. were screened for antimicrobial activity using Kirby-Bauer disc diffusion method by determining the growth inhibition zone.

Results: Of the sediments, 19 *Bacillus* spp. were isolated and screened for antimicrobial activities. In preliminary screening, seven *Bacillus* spp. showed good antibacterial activity against test bacteria and identified as selective isolates. Results in the secondary screening of the crude extract from cultures demonstrated good antibacterial and antifungal activities in active isolates. *Bacillus* spp. MT18 and MT24 exhibited more antimicrobial activities than the others.

Conclusion: According to this study the sediments of the Caspian Sea are potentially rich in *Bacillus* spp. that are capable of producing secondary metabolites with antimicrobial activities and this requires further research.

Keywords: Marine *Bacillus*, natural products, antimicrobial activity, Caspian Sea

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(121): 152-160 (Persian).

بررسی فعالیت ضد میکروبی فرآورده‌های طبیعی گونه‌های باسیلوس جدا شده از رسوبات بستر دریای مازندران

مجتبی محسنی^۱

مینا توسل^۲

چکیده

سابقه و هدف: با افزایش مقاومت دارویی چند جانبه در میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، مطالعه برای جستجو و یافتن ترکیبات ضد میکروبی جدید و موثر در حال افزایش است. باکتری‌های دریازی به ویژه گونه‌های باسیلوس، منبع غنی از متabolیت‌های ثانویه‌ی مناسب با فعالیت ضد میکروبی هستند. در پژوهش حاضر رسوبات بستر دریای مازندران برای جستجوی گونه‌های باسیلوس تولید کننده فرآورده‌های طبیعی ضد میکروبی، بررسی شد.

مواد و روش‌ها: رسوبات مناطق مختلف سواحل دریای مازندران جمع‌آوری شد. برای جداسازی باسیلوس، نمونه‌های رقیق شده در محیط کشت غنی تلخیح شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرم‌گذاری شد. غربالگری اولیه جدایه‌های باکتریایی به روش کشت متقطع علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی انجام شد. هم‌چنین فعالیت ضد میکروبی عصاره خام استخراج شده از جدایه‌های منتخب باسیلوس به روش انتشار در دیسک کربی-بائز و تعیین هاله توقف رشد انجام شد.

یافته‌ها: از رسوبات دریا، تعداد ۱۹ جدایه باسیلوس، جداسازی شد و برای فعالیت ضد میکروبی، بررسی شدند. در غربالگری اولیه، تعداد هفت جدایه باسیلوس، فعالیت ضد باکتریایی خوبی علیه باکتری‌های آزمایش نشان دادند و به عنوان جدایه‌های منتخب شناسایی شدند. نتایج غربالگری ثانویه عصاره خام محیط‌های رشد باکتری‌ها نشان داد که جدایه‌های منتخب، فعالیت خوب ضد باکتریایی و ضد قارچی داشتند. این نتایج نشان داد که باسیلوس جدایه MT18 و جدایه MT24، فعالیت ضد میکروبی بهتری نسبت به سایر جدایه‌ها داشتند.

استنتاج: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که رسوبات بستر دریای مازندران دارای پتانسیل بالقوه‌ای از تنوع گونه‌های باسیلوس تولید کننده فرآورده‌های طبیعی با فعالیت ضد میکروبی می‌باشد و نیازمند مطالعات بیشتر است.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس دریایی، فرآورده‌های طبیعی، فعالیت ضد میکروبی، دریای مازندران

مقدمه

پنسیلین توسط الکساندر فلمنگ، آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان تنها راه مؤثر در کنترل شیوع بیماری‌های عفونی به شمار می‌رفت^(۱). به موازات استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، ظهور و گسترش بیماری‌های عفونی به علت مقاومت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا انسانی به دارو، مشکل بزرگ جهانی در قرن ۲۱ است. پس از کشف

E-mail: m.mohseni@umz.ac.ir

مؤلف مسئول: مجتبی محسنی - باپلسر: دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی

۱. استادیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، باپلسر، ایران

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، باپلسر، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۱۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۳/۱۰/۱۳ تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۱/۱۹

و ایزوکومارین‌ها تولید می‌کنند. این متابولیت‌های طبیعی طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی از قبیل فعالیت ضد باکتری، ضد قارچ و ضد سرطان را دارا می‌باشند^(۱۱). میکروارگانیسم‌های دریازی از لحاظ متابولیکی و فیزیولوژیکی با میکروارگانیسم‌های خاکری متفاوت می‌باشند. از این جهت می‌توانند ترکیباتی تولید کنند که در همتایان خاکری یافت نمی‌شود^(۱۲). در پژوهش حاضر برای اولین بار باسیلوس‌های فعال تولید کننده فرآورده‌های طبیعی از رسوبات بستر دریای مازندران جداسازی شد و فعالیت ضد میکروبی آن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی و شناسایی باکتری‌ها برای جداسازی باکتری‌های اسپوردار تولید کننده ترکیبات طبیعی با فعالیت ضد میکروبی، رسوبات بستر دریای مازندران در سواحل بابلسر جمع آوری شد و در ظروف پلاستیکی استریل به آزمایشگاه منتقل شد. برای حذف باکتری‌های بدون اسپور و سلول‌های رویشی، نمونه‌های جمع آوری شده به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم ۸۰ درجه سانتی گراد، تیمار شدند^(۱۳). پس از رقیق‌سازی نمونه‌ها در سرم فیزیولوژی (محلول ۰/۹ درصد نمک سدیم کلرید)، رقت‌های 10^{-5} - 10^{-3} نمونه‌ها روی محیط کشت مغذی نوترین آگار (مِرک^۱، آلمان) تلقیح شد. پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌گذاری شدند. کلنی‌های رشد کرده بر سطح پلیت آگاردار از نظر مروف‌لوژی کلنی، مروف‌لوژی سلول‌ها، واکنش گرم و ایجاد اندوسپور بررسی شدند. هم‌چنین برای شناسایی باکتری‌ها، صفات فیزیولوژیکی جدایه‌ها بررسی شد. آزمون‌های بیوشیمیابی شامل فعالیت کاتالازی، مصرف گلوکز از مسیر تخمیر بوتاندیول (وززپروسکوثر^۲، توانایی مصرف سیترات و هیدرولیز نشاسته مطابق جداول شناسایی کتاب

میکروارگانیسم‌ها با استفاده از استراتژی‌های مختلف نسبت به این داروها مقاوم شدند؛ بنابراین تحقیقات برای جستجو و تولید ترکیبات ضد میکروبی جدید با سرعت بیش‌تری در حال انجام است^(۲). میکروارگانیسم‌ها یک منبع نامحدود برای تولید انواع آنتی‌بیوتیک‌ها و فرآورده‌های ضد میکروبی به شمار می‌آید و غربالگری فرآورده‌های طبیعی میکروبی باعث توسعه عوامل درمانی جدید و ترکیبات مؤثر دارویی می‌شود^(۳). لذا استفاده از متابولیت‌های ثانویه میکروارگانیسم‌ها، گزینه مناسبی جهت کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا محسوب می‌شود^(۴). سطح وسیعی از کره زمین را آب پوشانده، بنابراین دریا می‌تواند منبع عظیمی از میکروارگانیسم‌های متنوع باشد^(۵). عقیده بر این است که محیط دریایی در مجموع حاوی تقریباً $3,67 \times 10^{30}$ میکروارگانیسم است^(۶). در سال‌های اخیر به دلیل نیاز به داروهای جدید، میکروارگانیسم‌های دریایی به عنوان منبع جدید با پتانسیل تولید متابولیت‌های منحصر به فرد، مورد توجه قرار گرفتند^(۷). علاوه بر قارچ‌ها و اکینومیست‌ها، باسیلوس‌ها نیز از منابع مهم تولید کننده فرآورده‌های طبیعی با فعالیت ضد میکروبی به شمار می‌آیند. در میان تنوع میکروبی موجود در دریا، جنس باسیلوس دریایی شامل باکتری‌هایی با صفات فیلوزوتیکی و فنوژنتیکی ناهمگن است^(۹). باکتری‌های جنس باسیلوس که متعلق به خانواده باسیلاس می‌باشد، به صورت میله‌ای شکل، گرم مثبت، کاتالاز مثبت و بی‌هوایی اختیاری بوده و به واسطه تولید اندوسپور می‌توانند در زیستگاه‌های متفاوت گسترش یابند. اندوسپور باسیلوس‌ها اشکال مقاومی هستند که می‌توانند شرایط سخت محیطی مانند خشکی، تابش شدید آفتاب و گرمای شدید را تحمل کرده و زنده بمانند^(۱۰). باسیلوس‌های دریایی متابولیت‌های ثانویه‌ی متنوع شامل لیوپلییدها، پلی‌پتیدها، ماکرولاکتون‌ها، اسیدهای چرب، پلی‌کتیدها

1. Merck
2. Voges-Proskauer

یون) تلقیح شدند. ارلن‌ها در گرمخانه شیکردار با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و ۱۸۰ دور در دقیقه، به مدت ۷۲-۴۸ ساعت قرار داده شد. سپس محیط رشد با سرعت ۶۰۰۰ دور دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی با فیلتر قطر منفذ ۰/۲۲ میکرومتر، صاف شد(۱۵). با توجه به حلالیت ترکیبات ضد میکروبی در حلال‌های آلی، محلول صاف شده به نسبت یک به یک با اتیل استات مخلوط شد(۱۶، ۱۷). پس از جدا کردن فاز حلال از فاز آبی، اتیل استات اضافی در حمام ۶۰ درجه سانتی گراد تبخیر شد(۱۷). عصاره خام استخراج شده تا انجام بررسی فعالیت ضد میکروبی در دمای چهار درجه سانتی گراد نگهداری شد.

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره خام استخراج شده فعالیت ضد میکروبی عصاره خام جدایه‌ها به روش انتشار از دیسک^{۱۰} بررسی شد(۱۸). میکروارگانیسم‌های استاندارد شامل دو باکتری گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس و استافیلکوکوس اورئوس و پنج باکتری گرم منفی اشریشیا کلی، سالمونولا تیفی، شیگلا سونه‌ای، سودوموناس آنروژینوزا^{۱۱}، کلبسیلا پنومونیه و قارچ کاندیدا آلبیکنس^{۱۲} بود. باکتری‌ها در محیط کشت مایع مولر-هیتون^{۱۳} و قارچ در محیط کشت مایع سابورو دکستروز رشد داده شدند. کشت متراکم و یکنواختی از باکتری‌ها و قارچ به کمک سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک‌فارلن^{۱۴} توسط سوآب پنبه‌ای استریل در سطح مولر-هیتون آنگار و سابورو دکستروز آنگار^{۱۵} تهیه شد. سپس دیسک‌های کاغذی استریل با قطر ۶ میلی‌متر (پادتن طب، ایران) و آغشته به ۳۰ میکرولیتر عصاره خام استخراج شده، به طور مجزا در سطح آنگار قرار داده شد. از دیسک‌آغشته به ۳۰ میکرولیتر اتیل استات، به عنوان شاهد منفی استفاده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷

سیستماتیک باکتریولوژی برگی^۱ مطالعه شد(۱۴). تمام آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شد. جدایه‌های باکتریایی تا انجام مراحل بعدی آزمایش، در گلیسروول ۱۵ درصد و دمای ۸۵-درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

بررسی اولیه فعالیت ضد باکتریایی جدایه‌ها تولید فرآورده‌های ضد میکروبی توسط جدایه‌های باکتریایی به روش کشت مقاطع^۲، مورد بررسی قرار گرفت(۸). در این روش هر جدایه به صورت یک خط مستقیم، در مرکز پلیت نوتربین آنگار کشت داده شد. پلیت‌های آنگار به مدت ۲ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرم‌گذاری شد. سپس باکتری‌های استاندارد شامل باسیلوس سوبتیلیس^۳، استافیلکوکوس اورئوس^۴، اشریشیا کلی^۵، سودوموناس آنروژینوزا^۶، سالمونولا تیفی^۷، شیگلا سونه‌ای^۸ و کلبسیلا پنومونیه^۹ به صورت یک خط عمود بر کشت جدایه رشد کرده در مرحله قبل، تلقیح شد. پلیت‌های آنگار مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، گرم‌گذاری شدند. سپس هاله عدم رشد در حد فاصل دو خط رشد جدایه و باکتری استاندارد، اندازه‌گیری شد. جدایه‌ها با ایجاد هاله عدم رشد در برابر حداقل ۳ باکتری با بیش از ۸ میلی‌متر هاله، برای آزمایش مرحله بعد انتخاب شدند.

استخراج متابولیت‌های ضد میکروبی جدایه‌ها برای بررسی فعالیت ضد میکروبی جدایه‌های منتخب، متابولیت‌های ثانویه با فعالیت ضد میکروبی، استخراج شد. جدایه‌های باکتریایی انتخاب شده در مرحله اولیه، به طور مجزا در محیط کشت مایع LB (شامل ۱۰ گرم تریپتون، ۵ گرم عصاره مخمر، ۵ گرم سدیم کلرید و ۱ گرم گلوکز در یک لیتر آب بدون

1. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology

2.- Cross streak

3. *Bacillus subtilis* PTCC 1156

4. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

5. *Escherichia coli* PTCC 1533

6. *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1074

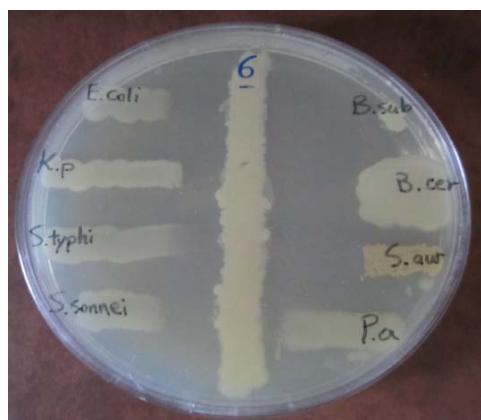
7. *Salmonella typhi* ATCC 14028

8. *Shigella sonnei* ATCC 9290

9. *Klebsiella pneumoniae*

10. Disc diffusion
 11. *Candida albicans* PTCC 5027
 12. Muller-Hinton broth
 13. McFarland
 14. Sabouraud dextrose agar

غربالگری اولیه جدایه‌ها با فعالیت ضد باکتریایی برای غربالگری اولیه باکتری‌های تولید کننده ترکیبات طبیعی، فعالیت ضد میکروبی جدایه‌ها به روش کشت متقطع در سطح آگار انجام شد. پس از تلقیح باکتری‌های استاندارد به صورت عمود بر خط رشد جدایه‌ها در سطح آگار، تولید فرآورده‌های طبیعی با فعالیت ضد میکروبی توسط جدایه‌ها به صورت هاله توقف رشد مطالعه شد. نتایج غربالگری اولیه ۱۹ جدایه نشان داد که تعداد ۷ جدایه شامل MT6، MT4، MT7، MT15، MT18، MT20 و MT24 توانایی مهار رشد حداقل سه باکتری استاندارد با هاله عدم رشد بیش تراز ۸ میلی‌متر را داشتند. فعالیت ضد میکروبی جدایه‌ها در



تصویر شماره ۱: تولید فرآورده‌های ضد باکتریایی جدایه MT6 به صورت هاله توقف رشد در روش کشت متقطع. ۶. جدایه E.coli؛ MT6، اشیشیا کلی؛ K.p، کلبسیلا پنومونیه؛ S.typhi، سالمونلا تیفی؛ S.sonnei، شیگلا سونهای؛ B.sub، باسیلوس سوتیلیس؛ B.cer، باسیلوس سرئوس؛ S.aur، استافیلوکوکوس اورئوس؛ Pa، سودوموناس آنروژینوزا.

درجه سانتی گراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرم‌گذاری شدند. فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های خام با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) سنجیده شد.

یافته‌ها

جداسازی و شناسایی باکتری‌ها

برای جداسازی باکتری‌های تولید کننده ترکیبات طبیعی، رسوبات جمع آوری شده از بستر دریای مازندران در محیط کشت نوترین آگار رشد داده شد. مرفلوژی کلندی‌های معجزاً ایجاد شده در سطح آگار بررسی شد. پس از حذف کلندی‌های اکتینومیست با ظاهر خشک و پودری، مرفلوژی بقیه کلندی‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. سپس رنگ آمیزی گرم انجام شد و مرفلوژی سلولی و واکنش گرم جدایه‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد تعداد ۱۹ جدایه به صورت باکتری‌های گرم مثبت، میله‌ای شکل و کاتالاز مثبت بودند. هم‌چنین تولید اندوسپور در جدایه‌ها، با روش رنگ آمیزی افتراقی سبز مالاشیت تأیید شد. مشخصات کلندی، مرفلوژی سلولی و ویژگی‌های فیزیولوژی جدایه‌های منتخب با فعالیت ضد میکروبی در جدول شماره ۱ خلاصه شده است. تمام جدایه‌ها به غیر از جدایه‌های MT6 و MT18 هیدرولیز نشاسته را داشتند و هم‌چنین جدایه‌های MT6 و MT18 قادر به مصرف گلوكز از مسیر تخمیر بوتاندیول نبودند. جدایه‌های MT7، MT15، MT20 و MT24 در سیترات رابه عنوان تنها منبع کربن مصرف کردند، در حالی که سایر جدایه‌ها قادر این توانایی بودند.

جدول شماره ۱: مشخصات کلندی، مرفلوژی سلولی، واکنش گرم و نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی جدایه‌های منتخب

جهایه	مشخصات کلندی	مرفلوژی	واکنش گرم	کاتالاز	VP	سیترات	آمیلاز	آزمون‌های بیوشیمیایی
MT4	موکوئیدی، بزرگ، حاشیه صاف	میله‌ای	+	+	-	-	+	E.coli
MT6	نرم، کوچک، حاشیه صاف	میله‌ای	+	+	-	-	-	K.p
MT7	بزرگ، فرورفه در آگار، حاشیه نامنظم	میله‌ای	+	+	+	+	+	B.sub
MT15	بزرگ، فرورفه در آگار، حاشیه چین دار	میله‌ای	+	+	+	+	+	S.typhi
MT18	نرم، کوچک، حاشیه صاف	میله‌ای	+	+	-	-	-	S.sonnei
MT20	بزرگ، فرورفه در آگار، حاشیه نامنظم	میله‌ای	+	+	+	+	+	B.cer
MT24	بزرگ، فرورفه در آگار، حاشیه نامنظم	میله‌ای	+	+	+	+	+	Pa

آئروزینوزا ($19/7 \pm 0/5$)، جدایه MT20 علیه باسیلوس سوتیلیس ($18/3 \pm 0/5$) و شیگلا سونه‌ای ($17/0 \pm 1/0$)، جدایه‌های MT6 و MT7 علیه باسیلوس سوتیلیس (به ترتیب $16/0 \pm 1/0$ و $15/3 \pm 0/5$) و جدایه MT24 علیه کلبسیلا پنومونیه ($19/3 \pm 0/5$) بود (تصویر شماره ۲). هم‌چنین بیشترین فعالیت ضد قارچی علیه کاندیدا آلیکنکس مربوط به جدایه MT15 ($19/7 \pm 0/5$) بود.



تصویر شماره ۲: فعالیت ضد میکروبی عصاره خام جدایه‌های MT18 (۱۸)، MT20 (۲۰) و MT24 (۲۴) به صورت هاله توقف رشد علیه شیگلا سونه‌ای به روش انتشار از دیسک

جدول شماره ۲ خلاصه شده است. نتایج نشان داد که ۵ جدایه فاقد هرگونه فعالیت ضد میکروبی بودند و ۷ جدایه نیز فعالیت ضد میکروبی علیه حداقل یک باکتری استاندارد داشتند. نتایج جدول شماره ۲ نشان می‌دهد که جدایه 6 از رشد تمام باکتری‌های استاندارد ممانعت کرد (تصویر شماره ۱). هم‌چنین جدایه‌های MT20، MT4 و MT24 دارای بیشترین فعالیت علیه باکتری‌های گرم منفی اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه و شیگلا سونه‌ای و باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سوتیلیس، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس بودند.

فعالیت ضد میکروبی عصاره خام جدایه‌ها عصاره خام ۷ جدایه منتخب با حلال آلی اتیل استات استخراج شد و فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها به روش انتشار از دیسک بررسی شد. نتایج حاصل از غربالگری تأثیری در جدول شماره ۳ نشان می‌دهد که عصاره‌های خام استخراج شده علیه تمامی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و نیز مخمیر کاندیدا آلیکنکس مؤثر بودند (جدول شماره ۳). نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت ضد میکروبی جدایه MT4 علیه اشریشیا کلی ($19/3 \pm 2/0$)، جدایه MT18 علیه کلبسیلا پنومونیه و سودوموناس

جدول شماره ۲: فعالیت ضد باکتریایی جدایه‌ها به روش سنجش هاله توقف رشد در کشت متقطع (میلی‌متر)

جدایه	اشریشیا کلی	کلبسیلا پنومونیه	سالمونولا تیفی	شیگلا سونه‌ای	باسیلوس سوتیلیس	باسیلوس سرئوس	استافیلوکوکوس اورئوس	سودوموناس آئروزینوزا	باکتری‌های استاندارد
ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت
ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	MT1
۲۰	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	>۲۵	MT2
۱۶	۱۵	۱۸	۲	۸	۳	۷	۱۰	MT4	MT6
۹	۹	۱۳	ب ت	۲	ب ت	ب ت	ب ت	۴	MT7
ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	۲	ب ت	ب ت	ب ت	۳	MT8
ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	MT10
۳	۸	۱۰	ب ت	۶	۲	۱۰	۷	MT15	MT18
۲۰	۱۸	۱۶	ب ت	۲۲	ب ت	۵	۱۷	MT21	MT22
۲۱	۱۷	>۲۵	ب ت	>۲۵	ب ت	۳	>۲۵	MT23	MT24
۲	۶	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	۲	MT26
ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	MT27
ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	MT32
۱۵	۴	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	MT41
۴	۵	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	ب ت	MT61

ب ت: بدون تاثیر

جدول شماره ۳: فعالیت ضد میکروبی عصاره خام جدایه‌ها علیه باکتری‌های استاندارد به صورت هاله توقف رشد (میلی‌متر)

جنایه‌ها	اشرشیاکلی	کلبیلا پنومونی	سالمونلا تیفی	شیگلا سونهای	سودوموناس آنژوپیوزا	باسیلوس سوتیلیس	استافیلکوکوس اورئوس	کالندیدا آرکیکس
MT4	۱۹/۳±۲/۰	۵/۰±۱۳/۷	۱/۰±۱۴/۰	۱/۰±۱۵/۷	۱/۰±۱۴/۳	۱/۰±۱۵/۰	۱/۰±۱۴/۰	۰/۰±۴/۷
MT6	۱/۰±۱۵/۰	۵/۰±۱۳/۳	۱/۰±۱۳/۰	۱/۰±۱۳/۷	۱/۰±۱۴/۳	۱/۰±۱۶/۰	۱/۰±۱۴/۰	۰/۰±۱۵/۰
MT7	۵/۰±۱۳/۳	۵/۰±۱۲/۳	۰/۰±۱۱/۰	۵/۰±۱۱/۷	۵/۰±۱۵/۳	۱/۰±۱۱/۷	۱/۰±۱۱/۷	۰/۰±۱۴/۳
MT15	۱/۰±۱۷/۰	۵/۰±۱۲/۷	۱/۰±۱۷/۰	۵/۰±۱۴/۳	۵/۰±۱۲/۷	۰/۰±۱۲/۳	۰/۰±۱۲/۳	۰/۰±۱۴/۷
MT18	۱/۰±۱۸/۰	۵/۰±۱۹/۷	۱/۰±۱۸/۰	۵/۰±۱۹/۷	۱/۰±۱۶/۷	۱/۰±۱۶/۷	۰/۰±۱۵/۷	۰/۰±۱۴/۷
MT20	۱/۰±۱۵/۰	۵/۰±۱۲/۰	۱/۰±۱۲/۰	۵/۰±۱۸/۳	۱/۰±۱۴/۳	۱/۰±۱۴/۳	۱/۰±۱۴/۰	۱/۰±۱۴/۰
MT24	۱/۰±۱۷/۰	۵/۰±۱۹/۳	۱/۰±۱۷/۰	۵/۰±۱۸/۳	۱/۰±۱۸/۰	۵/۰±۱۷/۷	۰/۰±۱۶/۳	۰/۰±۱۷/۳
Tet.	۱/۰±۱۸/۶	۶/۰±۱۴/۳	۶/۰±۱۴/۳	۶/۰±۱۹/۳	۶/۰±۲۳/۶	۶/۰±۲۴/۰	۱/۰±۲۴/۰	۰/۰±۱۵/۰
Nyst.	۱/۰±۱۸/۶	۱/۰±۱۸/۶	۱/۰±۱۸/۶	۱/۰±۱۸/۶	۱/۰±۱۸/۶	۱/۰±۱۸/۶	۱/۰±۱۸/۶	۱/۰±۱۸/۰

(30 µg/disc) تتراسایکلین (Tet.

(100 U/disc) نیستاتین (Nyst.

ب: ت: بدون تأثیر

تعداد ۲۹ گونه باسیلوس را از خاک جدا کردند که فعالیت ضد باکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت استافیلکوکوس اورئوس، باسیلوس مگاتریوم، باسیلوس تورنیجنسیس و باسیلوس سرئوس و نیز باکتری گرم منفی سودوموناس فلورسنس داشتند(۲۲). هم چنین زاغیان و همکاران در سال ۲۰۱۳ توانستند ۱۵ جدایه باسیلوس ثبت کننده نیتروژن و دارای فعالیت ضد میکروبی از خاک جدا کنند(۲). در تحقیق مشابهی محسنی و همکاران در سال ۲۰۱۳ ضمن بررسی خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی اکتینومیست‌های دریایی نشان دادند که رسبویات بستر دریایی مازندران می‌تواند منبع غذی از باکتری‌های تولید کننده ترکیبات ضد میکروبی باشد. در این تحقیق، تعداد ۲۴ جدایه اکتینومیست از رسبویات بستر دریا جداسازی و شناسایی شد که فعالیت ضد میکروبی خوبی علیه باکتری‌ها و قارچ‌ها نشان دادند(۸,۷).

پژوهش حاضر، اولین گزارش از فعالیت ضد میکروبی باسیلوس‌های دریایی جدا شده از رسبویات بستر دریایی مازندران به شمار می‌آید. در این تحقیق جدایه‌های باسیلوس توانایی تولید فرآورده‌های طبیعی با فعالیت ضد میکروبی را نشان دادند. نتایج مطالعه فعالیت ضد میکروبی عصاره خام استخراج شده نشان داد که جدایه‌های باسیلوس دارای فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی بودند. این نتایج نشان می‌دهد که رسبویات بستر دریایی مازندران دارای پتانسیل بالقوه از تنوع

در سال‌های اخیر به دلیل کاهش کارایی آنتی‌بیوتیک‌های متداول و افزایش مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، دانشمندان به برنامه‌های غربالگری میکروارگانیسم‌ها به منظور تولید فرآورده‌های ضد میکروبی جدید و قادر تمند برای کنترل باکتری‌های مقاوم به دارو توجه زیادی کرده‌اند. هم چنین بسیاری از بیماری‌های قارچی، باکتریایی، ویروسی و انگلی وجود دارند که داروی مؤثر برای درمان آن‌ها شناخته نشده است. از این رو مطالعه و جستجوی متابولیت ثانویه میکروارگانیسم‌ها به عنوان فرآورده‌های طبیعی، می‌تواند زمینه مناسبی برای تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید به شمار آید(۷).

باسیلوس‌ها باکتری‌های گرم مثبت و میله‌ای شکل بوده که به واسطه تولید اندوسپور قادر به رشد در شرایط مختلف هستند(۱۹). در اکوسیستم دریا، گونه‌های باسیلوس متنوعی زندگی می‌کنند که به عنوان تولید کننده ترکیبات ضد میکروبی و ضد سلطان شناخته شده‌اند(۲۰). متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط باسیلوس‌ها دارای ساختار شیمیایی متنوعی بوده و کاربرد آن‌ها در کنترل بیماری‌های عفونی از اهمیت زیادی برخوردار است(۲۱). در اغلب مطالعات قبلی، فعالیت ضد میکروبی باسیلوس‌های جدا شده از خاک بررسی شده است. Yilmaz و همکاران در سال ۲۰۰۵

بحث

و به عنوان منبع آنتی بیوتیک های جدید برای کنترل و مهار بیماری های عفونی ناشی از میکرووار گانیسم های مقاوم، مورد مطالعه بیش تر قرار گیرند.

میکروار گانیسم های تولید کننده فرآورده های طبیعی است. هم چنین گونه های باسیلوس دریازی می توانند گزینه خوبی برای استخراج متابولیت های ضد میکروبی باشند

References

- Kuta FA, Nimzing L, Orka'A PY. Screening of *Bacillus* species with potentials of antibiotics production. *Appl Med Inform* 2011; 24(1,2): 42-46.
- Zaghian S, Emteazi G, Shokri D. A Bacteriocin with Broad Antimicrobial Activity Produced by Newly Isolated Nitrogen-Fixing *Bacillus* Strains. *Journal of Isfahan Medical School* 2013; 30(218): 2260-2269.
- Chandra Sekhar M, Krishna ER, Kumar PS, Mohan C. Isolation and Screening of Antimicrobial Activity of Marine Sediment Bacteria from Bay of Bengal coast, Visakhapatnam. *J Pharm Research* 2012; 5(3): 1318-1319.
- Kumar SN, Siji J, Ramya R, Nambisan B, Mohandas C. Improvement of antimicrobial activity of compounds produced by *Bacillus* sp. associated with a Rhabditid sp. (entomopathogenic nematode) by changing carbon and nitrogen sources in fermentation media. *J Microb Biotech Food Sci* 2012; 1(6): 1424-1438.
- Kennedy J, Marchesi JR, Dobson AD. Marine metagenomics: strategies for the discovery of novel enzymes with biotechnological applications from marine environments. *Microb Cell Fact* 2008; 7(1): 27-28.
- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority. *PNAS* 1998; 95(12): 6578-6583.
- Mohseni M, Norouzi H. Antifungal Activity of Actinomycetes Isolated from Sediments of the Caspian Sea. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2013; 23(104): 80-87 (Persian).]
- Mohseni M, Norouzi H, Hamed J, Roohi A. Screening of antibacterial producing actinomycetes from sediments of the Caspian Sea. *Int J Mol Cell Med* 2013; 2(2): 64-71.
- Ivanova EP, Vysotskii MV, Svetashev VI, Nedashkovskaya OI, Gorshkova NM, Mikhailov VV, et al. Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *Int Microbiol* 2010; 2(4): 267-271.
- Alcaraz LD, Moreno-Hagelsieb G, Eguiarte LE, Souza V, Herrera-Estrella L, Olmedo G. Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC Genomics* 2010; 11(1): 332-349.
- Hamdache A, Lamarti A, Aleu J, Collado IG. Non-peptide metabolites from the genus *Bacillus*. *J Nat Prod* 2011; 74(4): 893-899.
- Jensen PR, Fenical W. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: ecological perspectives. *Annu Rev Microbiol* 1994; 48(1): 559-584.
- Berić T, Kojić M, Stanković S, Topisirović L, Degrazi G, Myers M, et al. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. *Food Technol Biotechnol* 2012; 50(1): 25-31.
- De Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 3,

-
- 2nd ed. USA: Springer; 2009.
15. Valli S, Suvathi SS, Aysha OS, Nirmala P, Vinoth KP, Reena A. Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2(6): 469-473.
 16. Ahamed N. Isolation and identification of secondary metabolites producing organisms from marine sponge. *Discovery* 2012; 1(1): 14-17.
 17. Parthasarathi S, Sathya S, Bupesh G, Samy RD, Mohan MR, Kumar GS, et al. Isolation and characterization of antimicrobial compound from marine Streptomyces hygroscopicus BDUS 49. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 2012; 4(3): 268-277.
 18. Boyle VJ, Fancher ME, Ross RW. Rapid, modified Kirby-Bauer susceptibility test with single, high-concentration antimicrobial disks. *Antimicrob Agents Chemother* 1973; 3(3): 418-424.
 19. Motta AS, Cannavan FS, Tsai SM, Brandelli A. Characterization of a broad range antibacterial substance from a new *Bacillus* species isolated from Amazon basin. *Arch Microbiol* 2007; 188(4): 367-375.
 20. Mondol MA, Kim JH, Lee Ma, Tareq FS, Lee HS, Lee YJ, et al. Ieodomycins A-D, Antimicrobial Fatty Acids from a Marine *Bacillus* sp. *J Nat Prod* 2011; 74(7): 1606-1612.
 21. Youcef-Ali M, Chaouche NK, Dehimat L, Bataiche I, Mounira K, Cawoy H, et al. Antifungal activity and bioactive compounds produced by *Bacillus mojavensis* and *Bacillus subtilis*. *Afr J Microbiol Res* 2014; 8(6): 476-484.
 22. Yilmaz M, Soran H, Beyatli Y. Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. *Microbiol Res* 2006; 161(2): 127-131.