تحقیقی

دارای رتبه علمی-پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

فعالیت ضد میکروبی سویه *آلکالی ژنز فکالیس* جداشده از خاک های آلوده به ترکیبات نفتی

محمد یعقوبی آوینی
دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

محمد دارایی
کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

غلامحسین ابراهیمی پور
دانشیار میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

نویسنده مسئول: غلامحسین ابراهیمی پور

پست الکترونیک: G-Ebrahimi@sbu.ac.ir

تلفن :۰۹۱۲۳۸٤۱۷۸۳

آدرس: تهران، اوین، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی

دریافت: ۹۳/۱/۱٦
ویرایش پایانی: ۹۳/۲/۱۲
پذیرش: ۹۳/۲/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: *یکی از مهم ترین تولیدکنندگان ترکیبات ضد میکروبی باکتری های مناطق با شرایط خاص اکولوژیک می باشد. هدف از این پژوهش یافتن باکتری های دارای فعالیت ضد میکروبی از خاک های آلوده به مواد نفتی بود.*

روش بررسی: *نمونه برداری از خاک های آلوده به نفت در مناطق نفتی دزفول استان خوزستان انجام شد. جداسازی باکتری های دارای فعالیت ضد میکروبی به روش های انتشار دیسک و کشت خطی صورت گرفت. پس از انتخاب بهترین باکتری، اثر ضد میکروبی آن برروی میکروارگانیسم های شاخص بررسی گردید. شناسایی باکتری جداسازی شده نیز به روش های بیوشیمیایی و فیلوژنتیک انجام شد.*

یافته ها: *نتایج آزمایش بیشترین فعالیت ضد میکروبی باکتری جدا شده را روی باسیلوس سوبتیلیس، اشرشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه، کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس نایجر نشان داد. فعالیت ضد میکروبی علیه سراشیا مارسسنس، استافیلوکوکوس ارئوس و سودوموناس آئروژینوزا در حد متوسط ارزیابی شد. با این وجود نتایج آزمایش ها برای سه گونه انتروکوکوس منفی بود. نتایج آزمایش های شناسایی به روش بیوشیمیایی و فیلوژنتیک 16S rDNA نشان دهنده شباهت این سویه با آلکالی ژنز فکالیس بود.*

نتیجه گیری: *این باکتری فعالیت ضد میکروبی وسیع الطیفی در کنترل رشد انواع میکروارگانیسم ها را از خود نشان داد. علاوه براین با مقایسه فعالیت ضد میکروبی باکتری جداشده با سایر ترکیبات ضد میکروبی جدا شده از گونه های آلکالی ژنز احتمال جدید بودن این ترکیب ضد میکروبی وجود دارد.*

واژه های کلیدی: *ماده ضد میکروبی، خاک های آلوده به نفت، آلکالی ژنز فکالیس*

آدرس مقاله
یعقوبی آوینی م، دارایی م، ابراهیمی پور غ" فعالیت ضد میکروبی سویه *آلکالی ژنز فکالیس* جداشده از خاک های آلوده به ترکیبات نفتی" مجله علوم آزمایشگاهی، زمستان ۱۳۹۳، دوره هشتم (شماره ۵):۴۹-۵۶

مقدمه

امروزه پیدایش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های موجود در بازار در بین میکروارگانیسم‌های بیماری زا به مرحله هشدار رسیده است. از آغاز شیمی درمانی با استفاده از آنتی بیوتیک ها، شمار نژادهای مقاوم افزایش یافته است که در نتیجه آن در برخی از موارد مقاومت چندگانه و متقابل نیز پدید آمده است(۱). علت اصلی این پدیده مصرف بی رویه داروهای ضد میکروبی می باشد، هر چند که انتقال مقاومت به طور خودبخودی اما به آهستگی نیز در بین میکروارگانیسم ها رخ می دهد و همچنین بیمارستان ها به دلیل وجود سویه های مختلف بیماری زا و تجویز انبوهی از آنتی بیوتیک‌ها مکان های مناسبی را برای ظهور مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در میکروارگانیسم‌های بیماری زا فراهم می‌سازند (۳،۲). اگر چه تولید آنتی‌بیوتیک‌های نیمه سنتزی بخشی از مشکلات را حل کرده است، اما به دلیل اینکه برخی از باکتری‌ها مانند *سودوموناس آئروژینوزا* به طور ذاتی به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دهند و همچنین عدم وجود آنتی‌بیوتیک‌های موثر علیه بعضی از باکتری‌ها و قارچ‌ها، تنها راهکار مبارزه با این میکروارگانیسم ها یافتن آنتی بیوتیک های جدید می باشد(۴). زیستگاه های طبیعی میکرو ارگانیسم های تولید کننده مواد فعال بیولوژیک بخصوص آنتی بیوتیک ها در طبیعت بسیار متنوع هستند. تاکنون از میکروارگانیسم های موجود در خاک، آب، سطح بافت های گیاهان و جانوران و از میکرو ارگانیسم های مناطق با شرایط خاص ترکیبات فعال بیولوژیک زیادی جدا شده است (۵). این تحقیق به منظور دستیابی به باکتری های دارای خواص ضد میکروبی از خاک های آلوده به نفت که منطقه اکولوژیک خاص هستند انجام شد.

روش بررسی

نمونه برداری از سطوح بالایی خاک در مناطق آلوده به نفت واقع در دزفول استان خوزستان انجام شد. بدین منظور نمونه های خاک توسط یک قاشق درون ظروف پلاستیکی استریل جمع آوری شده و تا زمان رسیدن به آزمایشگاه بر روی یخ قرار گرفته و تا پایان مراحل جداسازی باکتری در دمای $4^{\circ}C$ نگهداری گردید. به منظور جداسازی باکتری ها ابتدا ۱ گرم از خاک در ۹ میلی لیتر آب مقطر استریل حل گردید و به مدت ۵ دقیقه بر روی همزن در ۱۴۰ rpm قرار گرفت و سپس اجازه داده شد تا ذرات معلق ته نشین گردد. از این نمونه تا رقت 10^{-6}، سریال رقت در محیط نوترینت براث تهیه گشت و از هر رقت، ۰/۱ میلی لیتر برروی محیط نوترینت آگار با کمک میله شیشه ای دریگالسکی پخش شد. پلیت ها در دمای $35^{\circ}C$ تحت شرایط هوازی گرما گذاری شدند و از کلنی های بدست آمده بصورت مجزا آزمون ضد میکروبی انجام گرفت.

فعالیت ضد میکروبی باکتری جداسازی شده به دو روش انجام گرفت. در روش اول که برای تعیین میکروارگانیسم تولید کننده صورت گرفت، یک کشت خطی متراکم از باکتری بر روی یک قسمت از محیط مولر هینتون آگار دارای کشت چمنی میکروارگانیسم های *Bacillus subtilis* ATCC 465، *Escherichia coli* ATCC 25922، ATCC 10231 *Candida albicans* و *Aspergillus niger* ATCC 16404 کشت شد و محیط کشت ها جهت تولید ماده ضد میکروبی به مدت ۲۴ ساعت در دمای $35\ ^{\circ}C$ گرما گذاری شدند. روش دوم با استفاده از انتشار دیسک صورت پذیرفت در این روش ۲ ml محیط کشت مایع حاوی باکتری جدا شده را در ۳۷۰۰×g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ کرده و pH محلول رویی بدست آمده، بر روی ۷ تنظیم و سپس بر روی دیسک های سلولزی با قطر ۶/۶ میلی متر تغلیظ گشت، سپس به روش CSLI آزمون ضد میکروبی بر روی میکرو ارگانیسم های استاندارد ذکر شده در بالا صورت گرفت (۶).

شناسایی باکتری مورد نظر با استفاده از ویژگی های مورفولوژی و بیوشیمیایی انجام شد (۷). به منظور شناسایی فیلوژنیک باکتری جداشده، قرابت این باکتری از طریق مقایسه توالی ژن 16S rDNA با توالی های موجود در پایگاه داده های GenBank در NCBI و SEQMATCH در Ribosomal Database project (RDP) به کمک نرم افزار BLAST مورد بررسی قرار گرفت. در این مرحله ابتدا DNA ژنومی با استفاده از کیت Metabion (Cat. No mi-BD100) استخراج گردید، سپس PCR به کمک

پـرایمر های fD1 5′AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3′ و rD15′TAAGGAGGTGATCCAGCC3′ و در دستگاه ترموسایکلر Techne تحت چرخه دمایی، واسرشت شدن ابتدایی در دما C ˚ ۹۴ به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ بار تکرار واسرشت شدن در دمای C ˚ ۹۴ به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای C ˚ ۵۵ به مدت ۴۰ ثانیه، طویل شدن در دمای C ˚ ۷۲ به مدت ۱ دقـیقه و در نهـایت طـویل شـدن نهـایی در دمـای C ˚ ۷۲ بـه مدت ۱۰ دقیـقه صـورت پـذیرفت. محصول واکنش در پایان بر روی ژل آگاروز ۱ درصد در برابر GeneRuler^{TM}1 kb DNA ladder (Fermentas) الکتروفورز و وزن ملکولی آن در حدود bp ۱۵۰۰ تعیین گردید، توالی به روش سنگر توسط شرکت فزاپژوه تعیین شد. برای رسم درختچه فیلوژنی همچنین از نرم افزار Tree Builder، RPD استفاده شد (۸).

جهت تعیین قطبیت ماده ضد میکروبی از حلال های غیر قطبی و نیمه قطبی هگزان، کلروفرم و اتیل استات استفاده شد. به این صورت که محلول رویی حاصل از سانتریفوژ محیط کشت، بطور جداگانه با حجم برابر آن از حلال های فوق اضافه و بعد از هم زدن، به مدت چند دقیقه در حالت سکون قرار داده شد. بعد از جدا کردن فاز آلی از فاز آبی، فاز آبی ۲ بار دیگر توسط حلال های آلی فوق به طور جداگانه استخراج گردید، سپس بطور جداگانه از فازهای آلی و آبی به روش انتشار دیسک بر روی سویه های شاخص آزمون ضد میکروبی صورت پذیرفت. علاوه بر این، جهت تعیین ماهیت قطبی ماده ضد میکروبی مقداری از نمونه سانتریفوژ شده خشک گردید و به پودر حاصل، به طور جداگانه حلال های اتانول و متانول اضافه شد. پس از ۳ بار عصاره گیری بوسیله‌ی این حلال‌ها، به حالت سکون قرار گرفت تا رسوب ته نشین شد، سپس از لایه رویی به روش انتشار دیسک، آزمون ضد میکروبی بر روی میکروارگانیسم های شاخص صورت گرفت (۹).

جهت بررسی اثر pH، حرارت و حلال های آلی بر روی فعالیت ماده ضد میکروبی، ابتدا محیط کشت حاوی باکتری مورد مطالعه را با g×۳۷۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ کرده و مقداری از محلول رویی حاصل از آن جهت بررسی اثر حرارت بر فعالیت ماده ضد میکروبی، در دماهای مختلف ۴۰، ۶۵، ۸۰ و C°۱۰۰ در طول زمان های مختلف ۲۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه و همین طور در دمای C°۱۲۱ به مدت ۱۵ دقیقه (اتوکلاو) تیمار شدند، سپس نمونه ها را خنک کرده و آزمون ضد میکروبی بر روی آنها انجام گرفت (۱۰). همچنین جهت بررسی اثر برودت، مقداری از محلول رویی در دمای C ° ۴ به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد. جهت بررسی اثر pH های مختلف دامنه ای از pH بین ۲ تا ۱۱ بر روی ماده ضد میکروبی، با استفاده از محلول های ۰/۵ M HCl و NaOH ۰/۵M برای مدت ۱ ساعت اعمال گردید. در انتها pH تمام نمونه ها را خنثی کرده و همه نمونه ها (همچنین کنترل) توسط آب مقطر به حجم یکسان رسانده شدند (۱۲). برای بررسی پایداری ماده ضد میکروبی در برابر اثر حلال های آلی مختلف، مقداری از محلول رویی را در معرض ۱۰ درصد کلروفرم، ۵۰ درصد کلروفرم، ۱۰ درصد اتانول، ۵۰ درصد اتانول، ۱۰ درصد متانول و ۵۰ درصد متانول به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند (۱۱). در نهایت آزمون فعالیت ضد میکروبی نمونه های قبل و بعد تیمار ها، با روش انتشار دیسک بر روی *باسیلوس سوبتیلیس* صورت گرفت.

یافته ها

از چندین باکتری جداسازی شده از خاک های آلوده به مواد نفتی واقع در دزفول، یک سویه دارای فعالیت ضد میکروبی مطلوبی در برابر میکروارگانیسم های شاخص بود. این سویه انتخاب شده نه تنها بر علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی شاخص آزمایشگاهی، بلکه در برابر قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و مخمر *کاندیدا آلبیکنس* نیز دارای فعالیت ضد میکروبی بود. نتایج آزمایش ها و مشاهدات اولیه نشان داد که این باکتری کوکوباسیل گرم منفی، هوازی، متحرک، اکسیداز و کاتالاز مثبت است(جدول۱). آنالیز توالی 16S rDNA برای تائید و تکمیل شناسایی باکتری انجام شد و نتایج نشان دهنده قرابت باکتری با *آلکالی ژنز فکالیس* بود. با توجه به اینکه *آلکالی ژنز فکالیس* دارای دو زیر گونه *فکالیس* و *پارافکالیس* می باشد، بعضی خصوصیات باکتری جداشده با ایـــن دو زیر گونـــه جهت تعیین زیر گونه آن مورد بررسی قرار گرفتند(جدول ۲). در نهایت باکتری جدا شده تحت عـــنوان *آلـــکالی ژنز فکالیس* زیـر گونه *فکالیس* شناسایی شد.

جدول۱- مقایسه خصوصیات مورفولوژی و بیوشیمیایی باکتری جدا شده با استفاده از آزمون های استاندارد آزمایشگاهی شناسایی باکتری ها

خصوصیات	نتیجه	خصوصیات	نتیجه	خصوصیات	نتیجه
شکل میکروسکوپی	کوکوباسیل	تولید اسید از گلوگز	-	مصرفD - فروکتوز	-
واکنش گرم	-	تولید اسید از زایلوز	-	مصرفD - آرابینوز	-
حرکت	+	تولید اسید از لاکتوز	-	مصرفD - مانوز	-
تولید پیگمان	-	نیتریفیکاسیون	+	مصرف سوکروز	-
pH بهینه رشد	۹-۷	احیای نیتریت (دنیتریفیکاسیون)	+	مصرف سیترات	+
رنگ کشت مایع در شرایط هوازی	کرم رنگ	احیای نیترات به نیتریت	-	مصرف L- مالات	+
ذخیره پلی بتا هیدروکسی بوتیرات	+	تولید H_2S در TSI	-	مصرف L- پرولین	+
شکل کلنی	زرد کمرنگ	اکسیداز	+	مصرف بنزوآت	+
هیدرولیز ژلاتین	-	کاتالاز	+	مصرف L- فنیل آلانین	+
رشد در شرایط اتوتروفی	-	مصرفD - گلوکز	-	مصرف مانیتول	-
رشد در شرایط بی هوازی	-	مصرف D- زایلوز	-	مصرف گلیسرول	-

جدول۲- مقایسه خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری جدا شده با *آلکالی ژنز فکالیس* زیرگونه های *فکالیس* و *پارافکالیس*

خصوصیات بیوشیمیایی	باکتری جداشده	*آلکالی ژنز فکالیس* زیرگونه *فکالیس*	*آلکالی ژنز فکالیس* زیرگونه *پارافکالیس*
احیای نیتریت	+	+	-
هیدرولیز ژلاتین (۳۵ ^oC)	-	-	+
مصرف L- هیستیدین	+	+	-
مصرف L- تریپتوفان	+	+	-
مصرف بنزوآت	+	+	-

تعیین توالی قطعه تکثیر شده که ۱۴۴۱ نوکلئوتید بود در NCBI وارد شد و توسط نرم افزار BLAST رابطه یا قرابت باکتری را با *آلکالی ژنز فکالیس* نشان داد. این باکتری ۹۹ درصد به ۲۲ سویه *Alcaligenes sp.*، ۱۲ سویه *Alcaligenes faecalis* و ۱ سویه دریایی *Alcaligenaceae* bacterium RS.Sph.001 را نشان داد. توالی نوکلئوتیدی بدست آمده در GenBank با شماره دستیابی GQ495222 در دسترس قرار گرفت. همچنین قرابت باکتری جداشده با سویه های موجود در پایگاه داده ژن RDP با رسم درختچه فیلوژنی آنها قابل مشاهده است. عصاره اتانولی و فاز آلی استخراج محلول رویی با حلال های هگزان، کلروفرم و اتیل استات فاقد فعالیت ضد میکروبی بر متانولی دارای نیمی از فعالیت بیولوژیک نسبت به محلول رویی در آزمون بر روی میکروارگانیسم های شاخص بود که نشان دهنده ماهیت بسیار قطبی ماده ضد میکروبی است. آزمون پایداری ماده ضد میکروبی در دامنه pH بین ۲ تا ۱۱ مشخص کرد که کاهشی در فعالیت ماده ضد میکروبی در دامنه pH بین ۷ تا ۱۱ ایجاد نشد ولی در pH ۵ تا ۶ فعالیت ماده ضد میکروبی به میزان قابل توجهی کاهش یافت و در pH زیر ۵ هیچ هاله عدم رشدی مشاهده نشد. تیمار نمونه ها در دماهای مختلف ۴۰، ۶۵، ۸۰ و ۱۰۰ $^{\circ}C$ در زمان های ۲۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه و همچنین نگهداری نمونه در دمای ۴°C به مدت ۲۴ ساعت، اثری بر روی فعالیت ضد میکروبی آنها نداشت ولی تیمار در دمای ۱۲۱ $^{\circ}C$ به مدت ۱۵ دقیقه (اتوکلاو) حدود نیمی از فعالیت ماده ضد میکروبی را از بین برده بود. همچنین در فعالیت ضد میکروبی نمونه های تیمار شده در حلال های آلی مختلف، تغییری نسبت به نمونه کنترل مشاهده نشد(جدول۳).

جدول ۳- اثر pH، دما و حلال های آلی بر روی پایداری ماده ضد میکروبی.

تیمار با حرارت					
٤°C (٢٤ ساعت)	٤٠°C (٦٠ دقیقه)	٦٥°C (٦٠ دقیقه)	٨٠°C (٦٠ دقیقه)	١٠٠°C (٦٠ دقیقه)	١٢١°C (١٥ دقیقه)
+	+	+	+	+	w
تیمار با حلالهای آلی					
١٠٪ کلروفرم	٥٠٪ کلروفرم	١٠٪ اتانول	٥٠٪ اتانول	١٠٪ متانول	٥٠٪ متانول
+	+	+	+	+	+
تیمار با pH					
٢ – ٤		٥ – ٦		٧ – ١١	
-		w		+	

(+) هاله عدم رشد مشابه کنترل بدون تیمار، (w) هاله عدم رشد زیر mm ۱۲ و (-) بدون هاله عدم رشد

جدول ٤- اثر ضد میکروبی باکتری جدا شده بر روی میکروارگانیسم های استاندارد با استفاده از روش انتشار دیسک بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار در دمای ۳۷°C به مدت ٢٤ ساعت

سویه های میکروبی استاندارد	هاله عدم رشد	سویه های میکروبی استاندارد	هاله عدم رشد
باسیلوس سوبتیلیس ATCC ٤٦٥	++	*انتروکوکوس فکالیس* ATCC ٢٩٧٣٧	-
استافیلوکوکوس اورئوس ATCC٢٥٩٢٣	+	*انتروکوکوس فکالیس* PTCC١٢٣٨	-
اشریشیا کلی ATCC ٢٥٩٢٢	++	*انتروکوکوس فکالیس* IE٣	-
کلبسیلا پنومونیه ATCC ١٠٠٣١	++	*کاندیدا آلبیکنس* ATCC ١٠٢٣١	+++
سراشیا مارسسنس	+	*آسپرژیلوس نایجر*	+++
سودوموناس آئروژینوا ATCC ٨٥٣٢٧	+		

(+++) هاله عدم رشد قوی (mm ۱۷ ≤)، (++) هاله عدم رشد خوب (mm ۱۷-۱۲)، (+) هاله عدم رشد ضعیف (mm ۱۲ ≤)، (-) بدون هاله عدم رشد

فعالیت ضد میکروبی باکتری تحت مطالعه بر ضد میکروارگانیسم های *باسیلوس سوبتیلیس* ATCC 465، *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923، *اشریشیاکلی* ATCC 25922، *سودوموناس آئروژینوا* ATCC 85327، *کلبسیلا پنومونیه* ATCC 10031، *سراشیا مارسسنس*، *کاندیدا آلبیکنس* ATCC 10231 و *آسپرژیلوس نایجر* با استفاده از روش انتشار دیسک بر روی کشت های چمنی میکروارگانیسم های استاندارد، با ایجاد هاله عدم رشد مورد بررسی قرار گرفت(جدول۴). همانطور که مشاهده می شود ۳ سویه *انتروکوکوس فکالیس* ATCC 29737، IE3 و PTCC 1238 در برابر اثر ضد میکروبی باکتری جدا شده فاقد حساسیت بودند، در حالی که *کاندیدا آلبیکنس* و *آسپرژیلوس نایجر* حساسیت بیشتری در مقایسه با دیگر سویه های استاندارد داشتند.

بحث

چندین گزارش مربوط به جنس *آلکالی ژنز* منتشر شده است که حاکی از فعالیت علیه میکروبی بر ضد عوامل بیماری زا مختلف بوده اند. از مهم ترین مطالعات صورت گرفته می توان به تحقیقات Mare و Coetzee در سال ۱۹۶۴ اشاره نمود که دو سویه *Alcaligenes* تولید کننده باکتریوسین با طیف وسیع را گزارش نمودند. این دو سویه اثرات ضد میکروبی خود را بر ضد *اشریشیاکلی*، *سراشیا مارسسنس*، *استافیلوکوکوس ارئوس* و باسیل های هوازی گرم مثبت اعمال می کردند. این ماده ضد میکروبی در دمای ۸۵°C به مدت ۳۰ دقیقه از بین می رود. باکتری جداشده در این پژوهش پس از مطابقت با پایگاه داده ها در Genbank، RDP و همچنین با مقایسه پروفایل بیوشیمیایی آن با دیگر باکتری ها به عنوان *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* strain persicum شناسایی گردید. ماده ضد میکروبی حاصل از این باکتری دارای طیف وسیع اثر ضد میکروبی است و بیشترین اثر را بر روی *Candida albicans* و *Aspergillus niger* از خود نشان می دهد. این ماده ضد میکروبی در حالیکه بر روی *Entrococcus* sp. اثری ندارد. ماده ضد میکروبی تولید شده توسط این باکتری در دمای ۱۰۰°C به مدت ۱ ساعت پایدار می ماند (۱۲).Tokunaga و همکاران در سال ۱۹۹۶ باکتری *Alcaligenes sp.* YL-02632S را شناسایی نمودند که تولید

کننده آنتی بیوتیک های جدیدی به نام های کالیمانتاسین A، B و C بود. این مواد بر ضد *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر مطلوبی نشان دادند(۱۳). برخلاف ماده ضد میکروبی تولید شده توسط باکتری جداشده در این پژوهش این آنتی بیوتیک ها در آب غیر محلول ولی در حلال های آلی محلول هستند.

Bacic و Yoch (۲۰۰۱) گزارش دادند سویه *آلکالی ژنز فکالیس* M3A جدا شده از دریا، تولید آنتی بیوتیک M3A می کند و بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین، *سودوموناس آئروژنیوزا* مقاوم به جنتامایسین، *انتروکوکوس* مقاوم به وانکومایسین، *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و *مایکوباکتریوم آویوم* مقاوم به چند دارو اثر ضد میکروبی دارد(۱۴). در صورتی که باکتری تولید کننده ماده ضد میکروبی در این پژوهش، از خاک های آلوده به مواد نفتی جدا شده و بر روی سویه های *انتروکوکوس* فکالیس PTCC 1238، IE3 و ATCC 29737 اثری ندارد. آنتی بیوتیک M3A که یک آنتی بیوتیک قطبی است در pH های بین ۳ تا ۱۲ به مدت ۳۰ دقیقه پایدار است. در صورتیکه فعالیت ماده ضد میکروبی قطبی تولید شده در این پژوهش در رنج pH بین ۷ تا ۱۱ تغییری نمی کند. فعالیت ضد میکروبی آنتی بیوتیک M3A در دمای ۸۵°C به مدت ۱۰ دقیقه پایدار بوده، ولی در دمای جوش و اتوکلاو (۱۲۱°C) به مدت ۱۰ دقیقه به میزان خیلی کم کاهش می یابد. در صورتی که فعالیت ماده ضد میکروبی تولید شده در این پژوهش در دمای ۱۰۰°C به مدت ۱ ساعت پایدار بوده و در دمای اتوکلاو ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه مقداری از فعالیت آن کاهش می یابد. Zahir و همکاران در سال ۲۰۱۳ یک سویه از *آلکالی ژنز فکالیس* را از پساب کارخانه چرم سازی جداسازی کردند که فعالیت ضد میکروبی بر ضد *مایکوباکتریوم آویوم*، *استافیلوکوکوس ارئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوا* و *اروینیا کریزانتامی* را نشان دادند (۱۵). مواردی از جداسازی باکتری های تولید کننده مواد ضد میکروبی از خاک های آلوده به نفت نیز گزارش شده است. در این خصوص می توان به گزارش Korenblum و همکاران در سال ۲۰۰۵ اشاره نمود. این گروه تحقیقاتی ۳ باکتری *Bacillus subtilis* LFE-1، *Bacillus Firmus* H_2O-1 و *Bacillus licheniformis* T6-5 از مخازن نفت در برزیل جداسازی کردند که تولید مواد ضد میکروبی می کردند (۱۰). با توجه با نتایج بدست آمده از فعالیت ضد میکروبی باکتری تحت بررسی به نظر می رسد که ترکیب فعال ضد میکروبی تولید شده توسط این باکتری به صورت خارج سلولی می باشد، زیرا محلول رویی کشت باکتری به روش انتشار دیسک دارای خاصیت ضد میکروبی بود. طبق تعریفی که Abada و همکاران در سال ۲۰۰۸ از وسیع الطیف بودن ماده ضد میکروبی ارائه نمودند، خاصیت ضد میکروبی این سویه از *آلکالی ژنز* به دلیل اثر بر بعضی از باکتری های گرم منفی و گرم مثبت و همچنین بر روی قارچ ها از نوع فعالیت ضد میکروبی وسیع الطیف است(۱۶). با مقایسه اثرات ضد میکروبی سویه جداسازی شده در این پژوهش با سایر تحقیقات شباهت زیاد آن را با سویه AE 1.16 جدا شده از باقیمانده کمپوست که بر روی قارچ ها اثر آنتاگونیستی دارد نشان می دهد(۱۷).

نتیجه گیری

مطالعه مناطق آلوده ترکیبات نفتی و مواد آلی شانس یافتن میکروارگانیسم هایی با خصوصیات ویژه را افزایش می دهد. در این پژوهش یک سویه جدیدی از *آلکالی ژنز فکالیس* از خاک های آلوده به نفت جداسازی شد. این سویه با داشتن فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری های گرم مثبت و منفی و همچنین قارچ ها اثر آنتاگونیستی وسیعی بر روی انواع میکروارگانیسم ها را نشان می دهد. بنابراین استفاده از این سویه برای کنترل بیولوژیک عوامل بیماری زا در خاک های کشاورزی و گیاهان ممکن است موثر باشد. همچنین با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش احتمال اینکه ماده ضد میکروبی تولید شده توسط این سویه *آلکالی ژنز* ترکیب جدید باشد بسیار محتمل به نظر می رسد.

تشکر و قدردانی

این طرح تحقیقاتی منتج از پایان نامه دکتری رشته میکروبیولوژی دانشگاه شهید بهشتی به شماره طرح تصویب شده ۵/۹۲۰/۷۷۴۸ می باشد نویسندگان مراتب احترام و قدردانی خود را از آقای مهندس فخاری به دلیل کمک های بی دریغ ایشان در انجام این تحقیق اعلام می دارند.

Refrences

1. Witte W. *International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens*. Infection, Genetics and Evolution. 2004; 4 (3): 187–91.

2. Haber M, Levin BR, Kramarz P. *Antibiotic control of antibiotic resistance in hospitals: a simulation study*. BMC Infectious Diseases. 2010; 10: 254.

3. Pootoolal J, Neu J, Wright G. *Glycopeptide antibiotic resistance*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 2002; 42: 381-408.

4. Yoneyama H, Katsumata R. *Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 2006; 70(5):1060-1075.

5. Krishna PS, Samatha B, Prasad MR, Nidadavolu SH, Charya MAS. *Isolation and screening of marine bacteria for antimicrobial activity along Vishakapatanam Coast*. Journal of Microbiology and Biotechnology Research. 2011; 1(2): 86-89.

6. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; sixteenth informational supplement*. M100-S16. 2006; 309–317.

7. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore, MD, USA: Williams & Wilkins; 1994.

8. Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, et al. *The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis*. Nucleic Acids Research. 2009; 37(Database issue): D141-5.

9. Augustine SK, Bhavsar SP, Kapadnis BP. *A non-polyene antifungal antibiotic from Streptomyces albidoflavus PU 23*. Journal of Biosciences. 2005; 30(2): 201–211.

10. Korenblum E, der Weid I, Santos AL, Rosado AS, Sebastián GV, Coutinho CM, et al. *Production of antimicrobial substances by Bacillus subtilis LFE-1, B. firmus H2O-1 and B. licheniformis T6-5 isolated from an oil reservoir in Brazil.* Journal of Applied Microbiology. 2005; 98(3): 667-675.

11. El-Adawy TA. *Optimum production, stability, partial purification and inhibitory spectrum of antimicrobial compounds produced by Pediococcus pentosaceus DI*. Nahrung. 2001; 45(2): 118-124.

12. Maré IJ, Coetzee JN. *Antibiotics of Alcaligenes faecalis.* Nature. 1964; 203: 430-431.

13. Tokunaga T, Kamigiri K, Orita M, Nishikawa T, Shimizu M, Kaniwa H. *Kalimantacin A, B and C, novel antibiotics produced by Alcaligenes faecalis sp. Yl-02632S: physic-chemical properties and structure elucidation*. Journal of Antibiotic (Tokyo). 1996; 49(2): 140-144.

14. Bacic MK, yoch DC. *Antibiotic composition from Alcaligenes species and method for making and using the same*. United states patent, US. 2001; 6: 224.

15. Zahir I, Houari A, Bahafid W, Iraqui M, Ibnsouda S. *A novel Alcaligenes faecalis antibacterial-producing strain isolated from a Moroccan tannery waste*. African Journal of Microbiology Research. 2013; 7(47): 5314-5323.

16. Abada EAE. *Isolation and characterization of an antimicrobial compound from Bacillus coagulans*. Animal cells and systems. 2008; 12(1): 41-46.

17. Kavroulakis N, Ntougias S, Besi MI, Katsou P, Damaskinou A, Ehaliotis C, et al. *Antagonistic bacteria of composted agro-industrial residues exhibit antibiosis against soil-borne fungal plant pathogens and protection of tomato plants from Fusarium oxysporu f. sp. radicis-lycopersici*. Plant Soil. 2010; 333(1-2): 233–247.

Antimicrobial Activity of an *Alcaligenes faecalis* Strain Isolated from Oil Contaminated Soil

Yaghoobi Avini, M. (MSc)
PhD Student of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Daraei, M. (MSc)
MSc of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Ebrahimipour, GH. (PhD)
Associate Professor of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Corresponding Author: Ebrahimipour GH.

Email: G-Ebrahimi@sbu.ac.ir

Received: 26 Mar 2014
Revised: 2 May 2014
Accepted: 11 May 2014

Abstract

Background and Objective: The bacteria living in the specific ecological conditions are among the most promising antimicrobial producers. This study aimed at isolating antimicrobial producing bacteria from soils contaminated with crude oil.

Material and Methods: the samples were obtained from crude oil contaminated soils around Dezful located in Khuzestan province, Iran, and antimicrobial producing bacteria were isolated using disc diffusion and cross streak culture. Then, the best bacterium was selected and its antimicrobial potency was studied against indicator microorganisms. The isolate was also characterized based on biochemical properties and phylogenetic analysis.

Results: based on the results, the highest antimicrobial activity of isolated bacterium was related to *Candida albicans, Aspergillus niger, Bacillus subtilis, E. coli* and *Klebsiella pneumonia*. An intermediate effect was determined against *Serratia marcesens* and *Staphylococcus aureus*, whereas no effect was observed against three strains of *Enterococcus*. Using biochemical characteristics and phenotypic traits, the isolate was identified as *Alcaligenes faecalis*.

Conclusion: given that the isolate has broad spectrum activity against a various range of microorganisms and in comparison with some antimicrobial compounds produced by other *Alcaligenes* species, it seems the novelty of this antimicrobial compound.

Keywords: Antimicrobial Compound, Oil Contaminated Soil, *Alcaligenes faecalis*

This paper should be cited as: Yaghoobi Avini M, Daraei M, Ebrahimipour GH. [Antimicrobial Activity of an *Alcaligenes faecalis* Strain Isolated from Oil Contaminated Soil]. mljgoums. 2015; 8(5): 49-56[Article in Persian]