

جداسازی باکتریهای ممانعت کننده از رشد باکتریهای پاتوژن از خاک

نویسنده: دکتر جمیله نوروژی^۱

خلاصه

گروه متنوعی از میکروارگانیسمهای موجود در خاک قادرند آنتی بیوتیکهایی را در کشت های آزمایشگاهی تولید کنند. در این بررسی، روشی جهت ایزوله اینگونه باکتریها ارائه شده است. در این روش، مقداری از خاک بایر در روی محیط غذایی دارای آگار حاوی نیستاتین پخش شد و در حرارت اتاق نگهداری گردید. این عمل حدود ۲۵ تا ۵۰ بار تکرار شد و بالاخره چندین کلنی متمایز که اطراف آن را هاله ای شفاف احاطه کرده بود بدست آمد. در بررسیهای بعدی مشخص گردید که این کوکسی گرم مثبت (میکروکوک) قادر است از رشد برخی از باکتریهای پاتوژن نظیر سالمونلا، شیگلا، استافیلوکوک اورئوس، کلیسیلا، پروتئوس، اشریشیا کلی و باسیلوس سویتیلیس جلوگیری کنند. باکتری های ایزوله شده بر اساس تست های استاندارد باکتریولوژی و بیوشیمیایی به عنوان میکروکوک شناسایی گردید.

کلید واژه: باکتریهای ممانعت کننده - باکتریهای پاتوژن خاک

مقدمه:

میکروارگانیسمهای موجود در طبیعت به صورت پراکنده و انفرادی نبوده بلکه اغلب گروههای دوتایی یا چندتایی را تشکیل می دهند. لذا برحسب شرایط محیطی می توانند با هم روابطی به صورت همزیست، تشریک مساعی، آنتاگونیسم و غیره داشته باشند (۲، ۱).

در سال ۱۸۸۹ اولین بار، Vullemin اصطلاح آنتی بیوز یعنی تضاد بین یک میکروارگانیسم و فرآورده میکروارگانیسم دیگر را که موجب از بین رفتن میکروارگانیسم دیگر را که موجب از بین رفتن میکروارگانیسم اولی

می شود، بکار برد. این امر رقابت طبیعی در اجتماعات بیولوژی را نشان می دهد. مدتهای مدیدی مشاهده شده بود که از رشد برخی از کلنی های کشت داده شد، آزمایشگاهی در اثر آلودگی با میکروارگانیسمهای موجود در خاک یا هوا جلوگیری می شود. کم کم این تصور بوجود آمد، ممکن است موادی که این ارگانیسمها تولید می کنند، برای درمان بیماریها مفید باشد. لو (Low) و امریش (Emmerich) در سال ۱۸۹۹ دریافتند که پایوسیاناز حاصل از پسودوموناس آئروژینوزا (P.aeruginosa)، برخی از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی را در آزمایشگاه نابود می سازد اما متأسفانه این ماده

برای حیوانات سمی است.

پنی سیلین اولین آنتی بیوتیکی بود که در سال ۱۹۲۹ توسط الکساندر فلمینگ (A.Fleming) ضمن آلودگی کشت استافیلوکوک با کبکی بنام پنی سیلیوم نوتاتوم (P.notatum) ارائه گردید. در سال ۱۹۴۴، واکس من (Waksman) و همکاران او، استریتومایسین را از استریتومایسین گریزوس (St.griseus) موجود در خاک ایزوله کردند که بر روی عامل بیماری سل مؤثر بوده است.

Biskupiak و همکارانش در سال ۱۹۸۸، نشوبرینامایسین را که آنتی بیوتیک جدیدی است از میکروکوک لوتوس (M.luteus) بدست

آوردند (۳).

جستجو برای یافتن آنتی بیوتیک های دیگر از میکروارگانیزمهای موجود در خاک هنوز ادامه دارد. هدف از این تحقیق، یافتن باکتریهایی از خاک بوده که مواد آنتاگونیستی تولید می کنند و از رشد باکتریهای پاتوژن جلوگیری می نمایند.

روش کار:

در این بررسی، کمی از خاکی را که کشت نشده بود (خاک بایر) در روی محیط غذایی دارای آگار حاوی نیستاتین پخش شد و در حرارت اتاق نگهداری گردید. سپس پلیت ها بعد از دو تا سه روز مورد بررسی قرار گرفتند. در بین رشد مخلوطی از ارگانیزمها که در سطح محیط کشت رشد کرده بودند، چندین کلنی متمایز مشاهده شد که اطراف آن را هاله ای شفاف، احاطه کرده بود و نشان می داد که باکتریهای دیگری در اطراف آن کلنی رشد نکرده اند. با استفاده از این توانایی و انتخاب دقیق کلنی ها، کشت خالص با برداشتن کلنی های مزبور و انتقال آنها به محیط غذایی تازه بدست آمد. جهت رشد بهتر این باکتریها از انواع مختلفی از محیطهای کشت استفاده شد و در حرارتهای متفاوت (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۳۷ درجه سانتیگراد) نگهداری گردید. برای نشان دادن اینکه این باکتریها مواد آنتاگونیستی تولید می کنند، یک میلی لیتر از محیط حاوی باکتریهای پاتوژن را با سواب در سطح محیط کشت nutrient agar پخش کردیم. پس از چند دقیقه با به کار بردن لوپ استریل، یک کلنی از باکتری ایزوله شده را در سطح پلیت گذاشته و پلیت ها بعد از ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج:

عمل ایزوله کردن باکتریها حدود ۴۵ تا ۵۰

بار تکرار شد و بالاخره یک باکتری دلخواه ایزوله گردید. جهت رشد این باکتریها، انواع مختلفی از محیطهای کشت با یا بدون Yeast extract آزمایش گردید. اما بهترین نتایج با محیط غذایی دارای آگار (Nutrient agar) بدست آمد. کوششهایی جهت نشان دادن حرارت مناسب انجام شد و دریافت گردید که این باکتریها در حرارت ۱۸ تا ۲۲ درجه سانتیگراد، رشد بهتری دارند.

باکتریهای ایزوله شده گرم مثبت و کروی شکل می باشند که از نظر شکل ظاهری به استافیلوکوک شباهت دارند اما کمی بزرگتر از آن، به صورت بسته های چهارتایی (تتراد) بوده و پیگمان زرد متمایل به نارنجی تولید می کنند. کلنی های آن بزرگتر از کلنی های استافیلوکوک هستند. این باکتریها بدون اسپور و بدون حرکت می باشند.

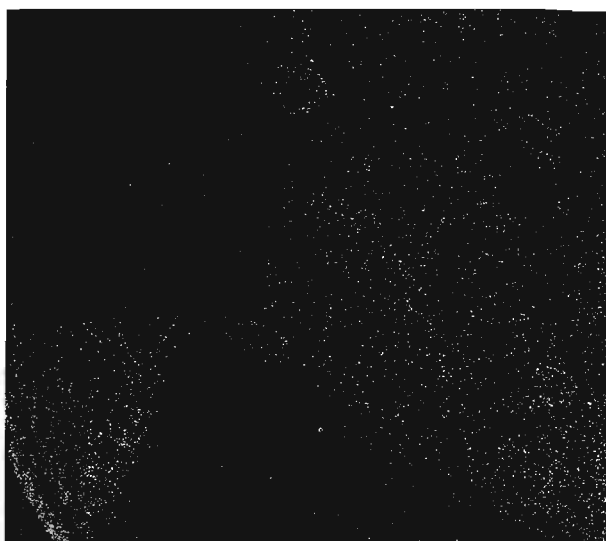
خون را همولیز نموده و کاتالاز تولید نمی کنند، کوآگولاز منفی و اکسیداز منفی هستند. این باکتریها در انواع مختلفی از محیط های کشت نظیر تیوگلیکولات و تلوریت پتاسیم با تشکیل کلنی سیاه و در محیط مولر رشد کرده اما قادر به رشد در محیط مک کانکی، اوره وچاپمن نیستند. این باکتریها مانیتول و لاکتوز را تخمیر نکرده و قادر به تولید اندول و هیدروژن سولفور نیستند. نتایج فوق نشان می دهد که باکتریهای ایزوله شده احتمالاً میکروکوک هستند.

نتایج نشان داد که باکتریهای ایزوله شده از رشد باکتریهای E.Coli، پروتئوس، کلبسیلا،

شیگلا، سالمونلا (تیفی و پاراتیفی)، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوک اورئوس بطور کامل جلوگیری می کنند. تصویر شماره ۱ نشان می دهد که میکروکوک ایزوله شده از رشد باسیلوس سوبتیلیس ممانعت بعمل می آورد.

بحث:

میکروارگانیزمهای تولیدکننده آنتی بیوتیکها را می توان از مواد گوناگونی



شکل شماره ۱

انتر مهارکننده میکروکوکوس بر علیه باسیلوس در شرایط آزمایشگاهی

مانند خاک، تفاله های فاسد شده گیاه، جانور، آب دریاچه ها، رودخانه ها، هوا و منابع دیگر بدست آورد. خاک از نظر داشتن میکروارگانیزمهایی که آنتی بیوتیک تولید می کنند، نظیر آکتینومیسیت ها، باکتریها و قارچها غنی می باشد. از زمانی که آکتینومایسین در سال ۱۹۴۰ و استرپتومایسین در سال ۱۹۴۴ توسط Waksman بدست آمد، ایزوله میکروارگانیزمهای تولیدکننده آنتی بیوتیک از خاک مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است.

آنتی بیوتیکها فرآورده های متابولیتی باکتریها و قارچها هستند که طی چرخه های بیولوژیکی به عنوان فرآورده های ثانویه

بیمار سمی بوده یا ناپایدار هستند و یا غوارضی را در بیمار بوجود می آورند. جهت بررسی خاصیت سیتوتوکسیک، فارماکولوژی و فارماکودینامیک (۴، ۵، ۶، ۷، ۸) ماده حاصل از این باکتری، طرحی به یکی از شرکت های دارویی ارائه گردیده است، به امید آنکه ماده تولید شده از این باکتری، توکسین نبوده و بتوان به عنوان آنتی بیوتیک درمانی مورد استفاده قرار داد.

تست های استاندارد باکتریولوژی و بیوشیمیایی به عنوان میکروکوک شناسایی گردید. امید است که مواد حاصل از باکتریهای ایزوله شده را بتوان خالص نمود و در درمان استفاده نمود. تاکنون صدها فرآورده متابولیتی تولید شده است، اما تعداد معدودی از آنها در درمان مورد استفاده قرار می گیرد. دلیل این امر آن است که اکثر آنتی بیوتیکهای حاصل از باکتریها در بدن

متابولیتی توسط این میکروارگانیسمها تولید می شوند. در این بررسی، کوکسیهای گرم مثبتی از خاک بدست آمده است که در آزمایشگاه قادرند موادی تولید نمایند که از رشد بسیاری از باکتریهای پاتوژن نظیر سالمونلا، شیگلا، اشریشیاکلی، استافیلوکوک اورثوس، کلبسیلا، پروتئوس و باسیلوس سوبتیلیس به طور کامل جلوگیری می کند. باکتری ایزوله شده بر اساس

REFERENCES:

- 1- Alexander N., *Microbial Ecology*. wiley, NewYork, 1991,
- 2- Alexanser N., *Soil Microbiology*, wiley, NewYork, 1993.
- 3- Bell R. C., Preparative high performance liquid chromatographic separation and isolation of bacitracin components and their relationship to microbiological activity. *Journal of chromatography*, 1992, 500: 163-168.
- 4- Biskupiak J. E., Meyers E., Gillum A. M., Dean L., Trejo W. H., Kirsch: Neoberminamycin, A new antibiotic produced by *Micrococcus luteus*, 1988, 41: 684-7.
- 5- Byron L. C., Arison H., Monaghan R. L., Springer J. P., Smith J. L., and zimmerman S. B., A new antibiotic fermentation, isolation and characterization. *The journal of antibiotics*, 1984, 207-210.
- 6- Hikoji T., A novel method for determination of B-lactamase using the agar dilution method., *Chemotherapy*, 1983, 29: 401-407.
- 7- Qmura S., Mamada H., wang N. J., Imamura N., Qiwa R., Iwai Y., Takaokamycin, A new peptide antibiotic produces by streptomyces sp. *Journal of antibiotics*, 1984, 700-705.
- 8- Singh. S. S., Gurusiddaiah P. S. Sunkara, and whalen; P-5-urification, characterization and antimicrobial properties of an antibiotic (Wassumycin) from streptomyces species 215, *Microbios.*, 1991, 7-20.