مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری

دوره ۱۰، شماره ۱، بهار ۱۴۰۳

صفحات ۲۲۴-۲۱۳

Online ISSN: ۴۴۹۳-۲۴۷۶

Print ISSN: ۲۰۲۰-۲۵۳۸

www.irijournals.com

بررسی اثر ضدمیکروبی متابولیت‌های ثانویه مورتیرلا و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* بر *اشرشیا کولای*

حامد آزاد[۱]، سید مسعود هاشمی کروئی[۲]، آرین قاسمی[۱]، عیسی غلامپور عزیزی[۲*]

[۱]دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران

[۲]استادیار گروه قارچ شناسی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران

*مسئول مکاتبات

چکیده

در این مطالعه متابولیت ثانویه، مورتیرلا و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* از خوراک دام جدا و خصوصیات ضدباکتریایی آن بر *اشریشیا کلای* بررسی شد. نتایج تحقیق نشان داد که مقدار MIC متابولیت ثانویه مورتیرلا ۱۲۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر، *آسپرژیلوس فومیگاتوس*۲۵۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر بوده است و مقدار MBC نیز برای مورتیرلا ۲۵۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* ۵۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر بوده است. متابولیت‌های کپک مورتیرلا در غلظت‌های ۲۳۰و۲۵۰و۲۷۰ میکرولیتر بر میلی لیتر به‌ترتیب هاله‌هایی به قطر ۹,۳۳ و ۱۰ و ۹,۶۷ میلی‌متر اطراف دیسک حاوی متابولیت تشکیل دادند و متابولیت‌های کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در غلظت‌های ۴۸۰ و ۵۰۰ و ۵۲۰ به‌ترتیب هاله‌هایی به قطر ۶ و ۶,۳۳ و ۷ میلی‌متر اطراف دیسک حاوی متابولیت تشکیل دادند. نتاج حاصل از آزمون هاله عدم رشد باکتری نشان داد که متابولیت‌های کپک مورتیرلا در غلظت‌های ۲۵۰ و ۲۶۰ و ۲۷۰ و ۲۸۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر به‌ترتیب هاله‌های عدم رشدی به قطر ۱۲,۶۷ و ۱۳,۳۳ و ۱۳ و ۱۴ میلی‌متر اطراف چاهک حاوی متابولیت تشکیل دادند و متابولیت‌های کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* با غلظت‌های ۵۰۰ و ۵۱۰ و ۵۲۰ و ۵۳۰ به ترتیب هاله‌هایی با قطر ۱۰ و ۱۰,۳۳ و ۱۰,۳۳ و ۱۲,۶۷ تشکیل دادند. بر اساس نتایج به‌دست آمده متابولیت ثانویه مورتیرلا و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* خصوصیات ضد باکتریایی برروی *اشریشیاکلای* داشتند و می‌توان از متابولیت آنها به‌عنوان ترکیب ضدمیکروبی جدید علیه میکروارگانیسم‌ها استفاده کرد.

واژه های کلیدی: متابولیت ثانویه، مورتیرلا، *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *اشریشیاکلای*.

۱-مقدمه

اشریشیا کلی یکی از شایع‌ترین علل چندین مورد عفونت‌های رایج باکتریایی در انسان و حیوانات است. این باکتری عامل اصلی انتریت است همچنین باعث عفونت مجاری ادراری، سپتی سمی و سایر عفونت‌های بالینی مانند مننژیت نوزادان می‌شود. همچنین با اسهال در حیوانات خانگی و مزرعه ارتباط دارد (Caruso et al., 2018). درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری با ظهور مقاومت ضدمیکروبی تهدید می‌شود. شیوع سویه‌های *اشریشیاکلای* مقاوم به چند دارو در جهان حال افزایش است. این موضوع عمدتا به‌دلیل گسترش عناصر ژنتیکی متحرک مانند پلاسمیدها می‌باشد (Caldwell et al., 2019).

قارچ ها منبع خوبی برای تولید متابولیت های ثانویه فعال بیولوژیکی هستند. قارچ ها در محدوده وسیعی از زیستگاه ها مانند آب، زمین/خاک، هوا و همچنین در روی حیوانات و گیاهان زنده می مانند، که به سادگی شامل محیط های خشکی و دریایی می شود. با این حال، اکثر آنها زمینی هستند، در روی خاک زندگی می کنند یا روی اجساد مرده موجودات چند سلولی از جمله گیاهان و حیوانات زنده می مانند و در بازیافت طبیعی اجساد مرده به ترکیبات آلی کمک می کنند(Cox et al., 2007). قارچها منابع بالقوه عوامل آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی هستند (Ashu et al., 2017) و از زمان‌های گذشته تا به امروز بشریت همواره با مشکل گسترش عفونت‌های باکتریایی مواجه بوده است در این میان قارچها به‌عنوان یک منبع متنوع ترکیبات فعال زیستی که از اهمیت درمانی برخوردارند شناخته شده‌اند. درمان عفونت‌های باکتریایی به این دلیل که باکتری‌ها توانایی زیادی در ایجاد مقاومت در برابر عوامل ضدباکتری دارند به‌طور فزاینده‌ای پیچیده است (Humphries *et al*., 2018). بنابراین نیاز به کشف عوامل ضدباکتری جدید که قادر به کنترل بیماری‌های نوظهور یا سویه‌های مقاوم باکتری‌ها باشند ضروری است. قارچها به‌عنوان گروه مهمی از میکروارگانیسم‌ها متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند که تعداد زیادی از متابولیت‌های ضدباکتریایی تولید شده توسط آنها به‌عنوان دارو تأیید شده‌اند (Manges et al., 2019).

روش کار

شناسایی کپک: کپک‌های جداسازی‌شده از محیط به روش ریخت‌شناسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی بر روی محیط کشت سابرو دکستروز آگار بررسی شدند. کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* با مشخصات میکروسکوپی کنیدیوفور های صاف و به رنگ سبز مایل به قهوه ای و وزیکول گلابی شکل که حدود یک سوم تا دو سوم سطح آن بارور بود شناسایی شد. کپک مورتیرلا پس از بررسی مورفولوژیک و دیدن اسپورانژیوم های کروی شکل و اسپور های تک سلولی با دیواره ی صاف شناسایی شد.(Fallahi & Madani, 2014: Prakash 2014).

تهیه متابولیت‌های قارچی: نمونه‌های کپک به ارلن حاوی سابرودکستروز براث منتقل گردید. سپس ارلن‌ها به‌مدت ۱۴ روز در دمای ۲۵ درجه در انکوباتور شیکردار قرار داده شدند. ۷ روز اول این فرایند به‌صورت هوازی انجام شد و برای ۷ روز بعدی بر روی درب ارلن‌ها پارافیلم زده شد تا شرایط بی‌هوازی شود سپس ارلن‌ها از انکوباتور خارج شدند و برای جداسازی مایع به‌دست آمده از کپک‌های موجود در محیط برای انجام سانترفیوژ به لوله‌های مخصوص منتقل شدند (Darshit, ۲۰۱۸).

استخراج متابولیت‌ها: محتویات هر ارلن که معادل ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت سابورود دکستروز براث بود، در ۱۰ لوله آزمایش به مقادیر مساوی ریخته شد، و در ۳ نوبت ۱۰ دقیقه‌ای با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ شد. سپس با سمپلر ۱۰۰۰ لاندا، محتویات لوله، به غیر از ۱ میلی‌لیتر پایینی که دارای خود قارچ بود، به آرامی‌استخراج و در ارلن‌های جداگانه ریخته شد(Darshit, ۲۰۱۸).

تهیه باکتری: باکتری گرم‌منفی مورد مطالعه در این پژوهش *اشریشیاکلای*(ATCC 25922) بود که از کلکسیون میکروبی دانشگاه آزاد بابل اخذ شد و بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار به‌صورت خطی، کشت داده شد تا باکتری جوان به‌دست آید.

آزمون حداقل غلظت ممانعت از رشد باکتری(MIC): برای تعیین حداقل غلظت متابولیت که باعث مهار رشد باکتری شده بود به روش ۱۱ لوله عمل شد، برای این کار ابتدا سوسپانسیون میکروبی از باکتری گرم منفی با غلظت معادل کدورت نیم مک فارلند تهیه شد. ۱۱ لوله آزمایش تهیه شد که هر لوله حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت مولرهینتون براث بود. به هر لوله ۵ لاندا از سوسپانسیون نیم مک فارلند *اشریشیاکلای* اضافه شد؛ در انتها به لوله شماره ۱، به مقدار ۱ میلی‌لیتر از متابولیت کپکی اضافه شد. پس از مخلوط کردن محتویات لوله اول، مقدار ۱ میلی‌لیتر از این لوله به لوله دوم منتقل شد و این کار تا لوله ۱۰ ادامه یافت. لوله شماره ۱۱ در حکم شاهد بود و به آن متابولیت اضافه نشد. در انتها لوله‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. لوله‌ای که در آن کدورت ناشی از رشد دیده نشد به‌عنوان غلظت ممانعت از رشد در نظر گرفته شد (Migliato et al., 2010).

آزمون حداقل غلظت کشنده باکتری (MBC): پس از تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد باکتری، از لوله موردنظر و همچنین یک لوله قبل و بعد از آن به‌صورت جداگانه، هر کدام ۱۰ لاندا روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت خطی داده شد و پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند (Migliato et al., 2010).

آزمون‌هاله عدم رشد به روش دیسک: برای تهیه دیسک‌ها، متابولیت‌ها در غلظت‌های موردنظر طی چند مرحله با کمک سمپلر روی دیسک‌ها ریخته شد و بین این مراحل به‌مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا خشک شد. سوسپانسیون محلول نیم مک‌فارلند *اشریشیا کلای* به‌صورت چمنی در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس ۳ دیسک حاوی غلظت‌های معین از هر متابولیت قارچی به‌صورت جداگانه روی پلیت قرار داده شد و توسط پنس در محیط فیکس شد. پس از کشت و فیکس کردن پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند (Humphries et al., 2018).

آزمون هاله عدم رشد به روش چاهک: در این آزمون *اشریشیاکلی* توسط لوپ بر روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار به صورت سفره‌ای، یکنواخت و کامل کشت داده شد. سپس در فواصل منظم (تقریبا با فاصله ۲ سانتی‌متر از یکدیگر)، چهار عدد چاهک بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار ایجاد شد که در چاهک‌ها مقادیر به ترتیب ۲۰۰، ۲۲۰ و ۲۵۰ میکرولیتر از متابولیت قارچی ریخته شد. سپس پلیت‌ها بی‌حرکت نگه داشته شدند تا متابولیت کاملاً در داخل محیط و اطراف چاهک‌ها نفوذ کند و بعد از آن پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و درنهایت رشد یا عدم رشد در اطراف چاهک‌ها بر حسب میلی‌متر بررسی شدند (Darshit, ۲۰۱۸).

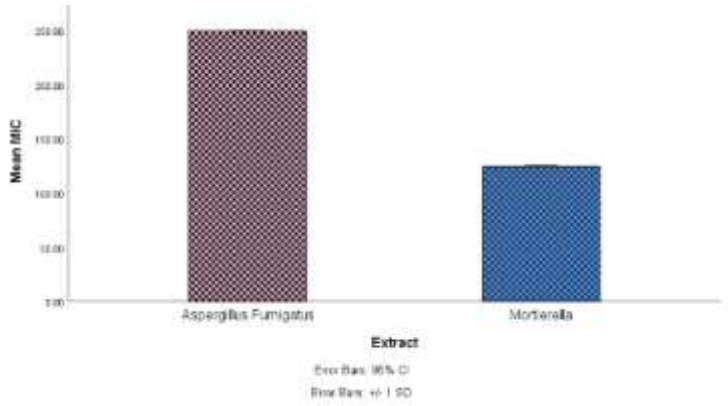
۳-یافته های تحقیق

نتایج جداسازی قارچ

نتایج ازمون قارچ‌شناسی تأیید کردند که بیش از یک کپک بر روی خوراک دام رشد کرده بود که شامل آسپرژیلوس فومیگاتوس و مورتیرلا بود. حداقل غلظت ممانعت از رشد اشریشیاکلی در مجاورت متابولیت قارچ‌های گونه‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس و مورتیرلا نشان داد که متابولیت‌های قارچی خصوصیت ممانعت از رشد باکتری اشریشیاکلی را داشتند (جدول ۲). در این مطالعه حداقل غلظت ممانعت از رشد *اشریشیاکلای* در مجاورت متابولیت حاصل از *آسپرژیلوس فومیگاتوس* بر *اشریشیا کلی* ۲۵۰ میکرولیتر بود و حداقل غلظت ممانعت از رشد *اشریشیاکلای* در مجاورت متابولیت حاصل از مورتیرلا ۱۲۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر بود.

جدول ۱- حداقل غلظت ممانعت از رشد *اشریشیاکلی* در مجاورت متابولیت کپکی (میلی‌لیتر)

متابولیت	MIC
آسپرژیلوس فومیگاتوس	µl/ml ۲۵۰
مورتیرلا	µl/ml ۱۲۵



نمودار ۱-حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد متابولیت مورتیرلا و آسپرژیلوس فومیگاتوس بر باکتری ای کلای

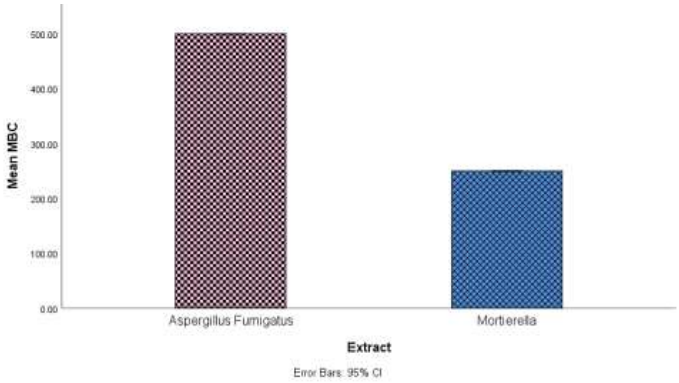
نتایج آزمون تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری(MBC) در مجاورت متابولیت های مورد مطالعه

طبق آزمون حداقل ممانعت کنندگی از رشد که در مورتیرلا در غلظت ۱۲۵ میکرولیتر در میلی لیتر (لوله شماره ۳) و در *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در غلظت ۲۵۰ میکرولیتر در میلی لیتر (لوله ی شماره ۲) لوله ی MIC به همراه یک لوله قبل و دو

لوله بعد MIC را مورد بررسی قرار دادیم و در این بررسی حداقل غلظت کشنده *اشریشیاکلی* در مجاورت متابولیت قارچهای گونه های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* ml/µl ۵۰۰ و مورتیریلا ml/µl ۲۵۰ بود(جدول ۳)

جدول ۲- حداقل غلظت کشندگی باکتری *اشریشیاکلی* در مجاورت متابولیت کپکی (میلی‌لیتر)

متابولیت	MBC
آسپرژیلوس فومیگاتوس	µl/ml 500
مورتیرلا	µl/ml 250



نمودار۲- حداقل غلظت کشدنگی متابولیت مورتیرلا و آسپرژیلوس فومیگاتوس بر باکتری‌ای کلای

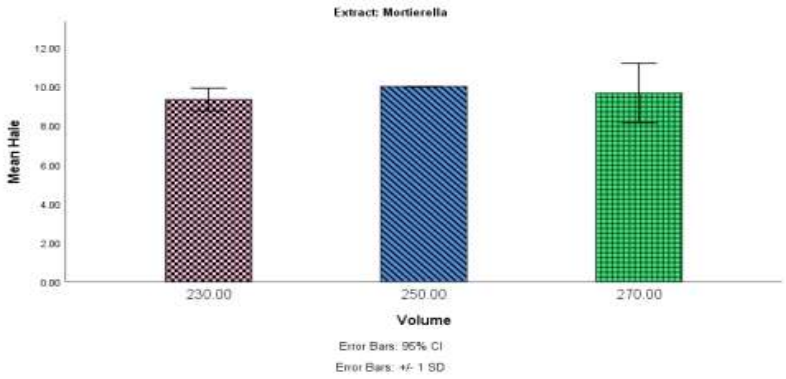
نتایج آزمون تعیین هاله عدم رشد *اشریشیاکلی* به روش دیسک

بر اساس نتایج آزمون غلظت ممانعت کننده از رشد متابولیت ثانویه مورتیرلا بر *اشریشیاکلی* که نتیجه آن نشان داد که غلظت ۱۲۵ میکرولیتر از متابولیت مورتیرلا در یک میلی لیتر سوسپانسیون حاوی 10^6 کلنی تشکیل دهنده باکتری *اشریشیا کلی* بود قادر به ممانعت از رشد آن شد و آزمون حداقل غلظت کشندگی مورتیرلا که نشان داد حداقل غلظت کشندگی در ۲۵۰ میکرولیتر است ، آزمون هاله عدم رشد به روش دیسک طراحی شد و در ۳ غلظت ۲۳۰ ،۲۵۰ و ۲۷۰ مورد بررسی قرار گرفت که، نتایج حاصل از آزمون تعیین هاله عدم رشد باکتری نشان داد که متابولیت‌های کپک مورتیرلا در غلظت‌های ۲۳۰ و ۲۵۰ و ۲۷۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر به‌ترتیب هاله‌هایی به قطر ۹,۳۳ و۱۰ و۹,۶۷ میلی‌متر اطراف دیسک حاوی متابولیت تشکیل دادند و بر اساس نتایج آزمون غلظت ممانعت کننده از رشد متابولیت ثانویه *آسپرژیلوس فومیگاتوس* بر باکتری *اشریشیاکلی* که نتیجه آن نشان داد که غلظت ۲۵۰ میکرولیتر از متابولیت *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در یک میلی لیتر سوسپانسیون حاوی 10^6 کلنی تشکیل دهنده باکتری *اشریشیا کلی* بود قادر به ممانعت از رشد آن شد و آزمون حداقل غلظت کشندگی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* که نشان داد حداقل غلظت کشندگی در ۵۰۰ میکرولیتر است ، آزمون هاله عدم رشد به روش دیسک در غلظت های ۴۸۰ ، ۵۰۰ و ۵۲۰

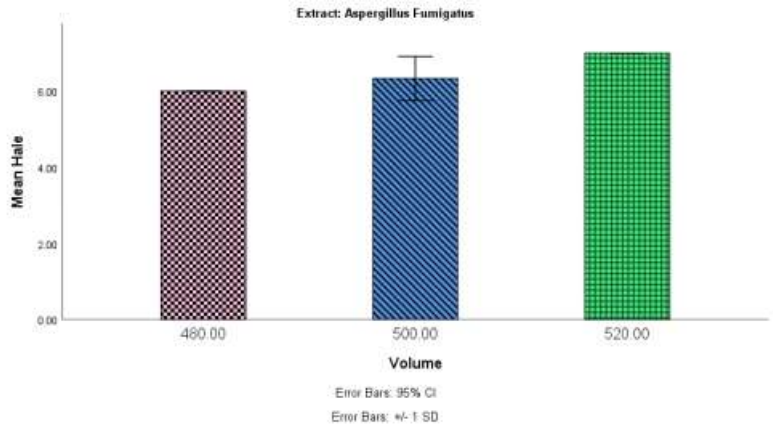
طراحی شد ومتابولیت‌های کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در غلظت‌های ۴۸۰ و ۵۰۰ و ۵۲۰ به‌ترتیب هاله‌هایی به قطر ۶ و ۶,۳۳ و ۷ میلی‌متر اطراف دیسک حاوی متابولیت تشکیل دادند.

جدول ۳- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های *Aspergillus Fumigatus* و Mortierella بر هاله عدم رشد بر *اشریشیا کلی* به روش دیسک

	۲۳۰	۲۵۰	۲۷۰	p-Value
Mortierella	9.33±0.58	10.00±0.00	9.67±1.53	0.496
	۴۸۰	۵۰۰	۵۲۰	
Aspergillus Fumigatus	6.00±0.00	6.33±0.58	7.00±0.00	0.061



نمودار ۳-اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های Mortierella بر هاله عدم رشد به روش دیسک



نمودار ۴-اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های *Aspergillus Fumigatus* بر هاله عدم رشد به روش دیسک

نتایج آزمون تعیین‌هاله عدم رشد*اشریشیاکلی* به روش چاهک

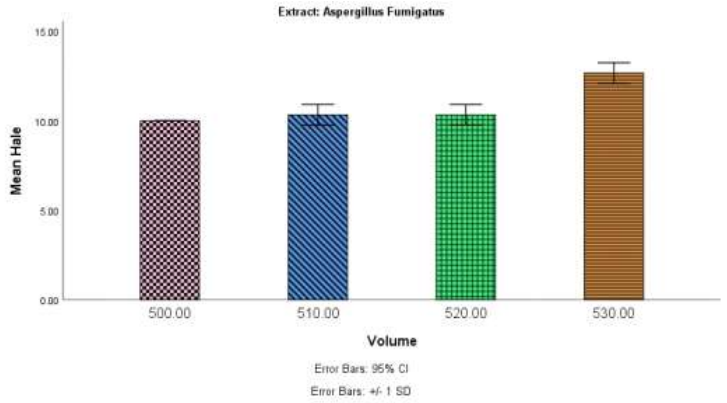
طبق نتایج آزمون غلظت ممانعت کننده از رشد متابولیت ثانویه مورتیرلا بر *اشریشیا کلی* که نتیجه آن نشان داد که غلظت ۱۲۵ میکرولیتر از متابولیت مورتیرلا در یک میلی لیتر سوسپانسیون حاوی 10^6 کلنی تشکیل دهنده باکتری اشریشیا کلی بود قادر به ممانعت از رشد آن شد و آزمون حداقل غلظت کشندگی مورتیرلا که نشان داد حداقل غلظت کشندگی در ۲۵۰ میکرولیتر است ، آزمون هاله عدم رشد به روش چاهک طراحی شد و در ۵ غلظت ۲۵۰ ،۲۶۰ ،۲۷۰ و ۲۸۰ مورد بررسی قرار گرفت. نتیاج حاصل از آزمون هاله عدم رشد باکتری نشان داد که متابولیت‌های کپک مورتیرلا در غلظت‌های ۲۵۰ و ۲۶۰ و ۲۷۰ و ۲۸۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر به‌ترتیب هاله‌های عدم رشدی به قطر ۱۲,۶۷ و ۱۳,۳۳ و ۱۳ و ۱۴ میلی‌متر اطراف چاهک حاوی متابولیت تشکیل دادند و بر اساس نتایج آزمون غلظت ممانعت کننده از رشد متابولیت ثانویه *آسپرژیلوس فومیگاتوس* بر باکتری *اشریشیا کلی* که نتیجه آن نشان داد که غلظت ۲۵۰ میکرولیتر از متابولیت *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در یک میلی لیتر سوسپانسیون حاوی 10^6 کلنی تشکیل دهنده باکتری *اشریشیا کلی* بود قادر به ممانعت از رشد آن شد و آزمون حداقل غلظت کشندگی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* که نشان داد حداقل غلظت کشندگی در ۵۰۰ میکرولیتر است ، آزمون هاله عدم رشد به روش چاهک در غلظت های ۵۰۰ ، ۵۱۰ ،۵۲۰ و ۵۳۰ طراحی شد و متابولیت‌های کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* با غلظت‌های ۵۰۰ و ۵۱۰ و ۵۲۰ و ۵۳۰ به‌ترتیب هاله هایی با قطر ۱۰ و ۱۰,۳۳ و ۱۰,۳۳ و ۱۲,۶۷ تشکیل دادند.

تأثیر غلظت‌های ۵۰۰، ۵۱۰، ۵۲۰ و ۵۳۰ برای عصاره *Aspergillus Fumigatus* و غلظت‌های ۲۵۰، ۲۶۰، ۲۷۰ و ۲۸۰ برای عصاره Mortierella بر هاله عدم رشد به روش چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۴-۳ و نمودارهای ۵-۴ و ۴-۶). از آنجائی که گروه‌های موردبررسی از واریانس همگنی برخوردار نبودند از آزمون نتایج آنالیز آماری کریسکال والیس برای بررسی تفاوت میانگین هاله‌های عدم رشد استفاده شد. نتایج آنالیز آماری نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مورداستفاده در تست آنتی‌باکتریال به روش چاهک برای عصاره *Aspergillus Fumigatus* وجود دارد ($p=0.041$). آنالیز تعقیبی نشان داد که هاله عدم رشد برای غلظت‌های ۵۰۰، ۵۱۰ و ۵۲۰ از عصاره *Aspergillus Fumigatus* تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند. ازسوی دیگر غلظت ۵۳۰ از عصاره *Aspergillus Fumigatus* بزرگترین هاله عدم رشد را در مقایسه با ۳ غلظت دیگر نشان داد که از نظر آماری نیز معنی‌دار بود.

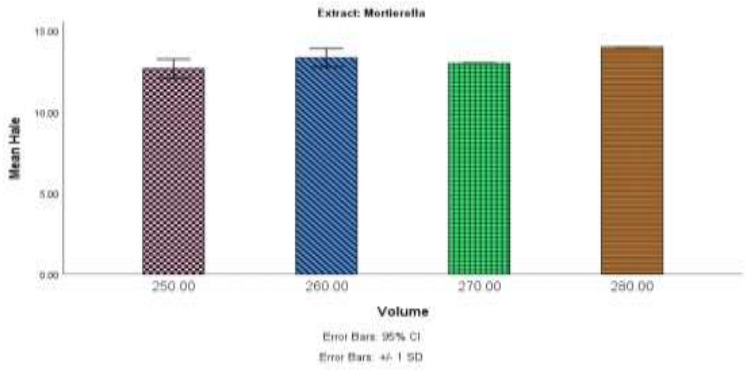
نتایج آنالیز آماری نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مورداستفاده در تست آنتی‌باکتریال به روش چاهک برای عصاره Mortierella وجود دارد ($p=0.048$). آنالیز تعقیبی نشان داد که هاله عدم رشد برای غلظت‌های ۲۵۰، ۲۶۰ و ۲۷۰ از عصاره Mortierella تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند. از سوی دیگر غلظت ۲۸۰ از عصاره Mortierella بزرگترین هاله عدم رشد را در مقایسه با ۳ غلظت دیگر نشان داد اما این افزایش قطر هاله عدم رشد تنها با غلظت ۲۵۰ از نظر آماری تفاوت معنی‌دار داشت.

جدول ۴- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های *Aspergillus Fumigatus* و Mortierella بر هاله عدم رشد به روش چاهک

	۲۵۰	۲۶۰	۲۷۰	۲۸۰	p-Value
Mortierella	12.67±0.58 [a]	13.33±0.58 [a, b]	13.00±0.00 [a, b]	14.00±0.00 [b]	0.048
	۵۰۰	۵۱۰	۵۲۰	۵۳۰	
Aspergillus Fumigatus	10.00±0.00 [a]	10.33±0.58 [a]	10.33±0.58 [a]	12.67±0.58 [b]	0.041



نمودار ۵-اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های *Aspergillus Fumigatus* بر هاله عدم رشد به روش چاهک



نمودار ۶-اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های Mortierella بر هاله عدم رشد به روش چاهک

۴-بحث و نتیجه گیری

با توجه به افزایش مقاومت باکتریایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و عفونت‌های بیمارستانی غیر قابل درمان ضرورت کشف و تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید حس می‌شود و تحقیقات گسترده‌ای در این زمینه در حال انجام است. در تحقیقی که در سال۲۰۱۱ توسط Adetunji صورت گرفت دو گونه باکتری *اشریشیا کولای* جدا شده از تخته ی بریدن گوشت بر روی ۱۰ آنتی بیوتیک مختلف تست شد و بیش از ۶۰ درصد آنتی بیوتیک های مورد استفاده قادر به مهار رشد این باکتری نبوده اند از جمله Ciprofloxacin، Tetracycline، Amoxillin، Chloramphenicol، Ampicillin، و Gentamicin بی اثر بوده اند و دیگر آنتی بیوتیک ها توانایی کم و معمولی در مهار این باکتری داشته اند تنها آنتی بیوتیک که باکتری حساسیت زیادی به آن نشان داد cefuroxim با هاله ممانعت از رشد به قطر ۱۰ میلی متر بوده که ما در این تحقیق در متابولیت مورتیرلا با غلظت ۲۵۰ میکرولیتر در میلی لیتر هاله ممانعت از رشدی به همین اندازه ایجاد نمودیم (Adetunji *et al.*, 2011). متابولیت‌های قارچی به‌دلیل دارا بودن مواد ضدباکتریایی قابلیت نابودسازی و جلوگیری از رشد باکتری‌ها را دارا هستند. خوراک دام به مواد غذایی مخصوص حیوانات اهلی اطلاق می‌شود، که با هدف دامپروری تولید می‌گردد و نیازهای روزانه و خاص دام را برطرف می کنند. این ماده غذایی به‌دلیل غنی بودن از مواد مغذی؛ مستعد رشد میکروارگانیسم‌هایی نظیر کپک است. وجود کپک در خوراک نه‌تنها ارزش غذایی آن را پایین می‌آورد باعث ایجاد مایکوتوکسین‌های خطرناک برای سلامتی دام نیز می‌شود. در این تحقیق کپک موجود در خوراک دام جداسازی شد و متابولیت کپکی برای مطالعه اثرات ضدمیکروبی علیه باکتری *اشریشیاکلی* مورداستفاده قرار گرفت تا از این ماده غذایی فاسد شده به‌عنوان منبع جدید و البته طبیعی آنتی‌بیوتیکی بهره‌برداری شود. نتایج آزمون قارچ‌شناسی تأیید کردند که بیش از یک کپک بر روی خوراک دام رشد کرده بود که شامل *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و مورتیرلا بود. در تحقیقات قبلی نیز وجود انواع مختلف کپک در خوراک دام به اثبات رسیده بود. در تحقیق قانعیان و همکاران در سال ۱۳۹۴ مشخص شده بود که گونه‌های پنی‌سیلیوم و آسپرژیلوس عمده‌ترین آلودگی قارچی خوراک دام در گاوداری‌های شیری شهر یزد بودند (قانعیان و همکاران، ۱۳۹۴) که مشابه تحقیق ما بود. در تحقیق Binupriya و همکاران (۲۰۱۰) مشخص شده بود که این متابولیت قارچی قادر به مهار رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت ۴۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر شده است. این نتایج به نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی دارد. با این وجود در تحقیق Binupriya و همکاران اثر باکتری‌کشی از متابولیت دیده نشد که برخالف نتایج تحقیق ما بوده است. احتماال دلیل این تفاوت به‌دلیل گونه آسپرژیلوس مورد مطالعه بوده است؛ زیرا در تحقیق 1 Binupriyaو همکاران *آسپرژیلوس اوریزه* موردمطالعه بوده است (Binupriya *et al.*, ۲۰۱۰). در تحقیق Corral و همکاران (۲۰۱۸) یک نمونه آسپرژیلوس از نمونه آب دریای سرد جداسازی شد و مورد آنالیز ترکیبات تولیدکننده قرار گرفت، نتایج این تحقیق نشان داد که آسپرژیلوس موردمطالعه 2 توانایی ساخت ترکیبی دارد که از خانواده سوربیسیلیونید است و خاصیت ضدمیکروبی قویی دارد. این ماده بر روی بیش از ۹ گونه میکروبی شامل کپک و باکتری جدا شده از رسوبات دریایی قرار گرفت و مشخص شد که بر روی همه آنها اثر ضدمیکروبی داشته است به‌خصوص روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* که با غلظت ناچیز ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث مهار رشد آن شده بود (corral *et al.*, 2018). در تحقیقات Hameed و همکاران (۲۰۱۵) این ادعا به اثبات رسید، زیرا در این تحقیق مشخص شد که متابولیت‌های قارچی دارای ساختمان شیمیایی مشابه با ترکیبات ضدمیکروبی هستند و به همین دلیل باعث مهار رشد یا مرگ باکتری‌ها می‌شوند (Hameed *et al.*,۲۰۱۵). در تحقیق Liu و همکاران (2015) ترکیبات مشابه و از خانواده 3 سوربوسیلیکوناید از متابولیت مستخرج از کپک پنیسیلیوم ترستره جدا شد که علت اصلی خصوصیات ضدمیکروبی متابولیت پنیسیلیوم نیز به آن نسبت داده شده بود (Liu *et al.*, 2015).در این تحقیق

حداقل غلظت ممانعت از رشد *اشریشیا کلی* در مجاورت متابولیت قارچ‌های مورتیرلا ۱۲۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر بوده و در *آسپرژیلوس فومیگاتوس* ۲۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر بوده است و درمورد قارچ‌های دیگر اثر ضدمیکروبی قابل‌توجهیی مشاهده نشد. در مطالعه Skanda و همکاران (۲۰۲۱) ابتدا کپک آسپرژیلوس از خاک جدا شد، نتایج نشان داد که این قارچ آسپرژیلوس آرکووردنسیسبود. آنالیز ترکیبات متابولیات آن نشان داد که وجود ترکیبات شیمیایی متعدد در متابولیت آسپرژیلوس عاملی برای ایجاد خصوصیات ضدمیکروبی متابولیت نیز می‌تواند باشد (Skanda *et al.*, 2021). نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان داد که متابولیت قارچ‌های گونه‌های مورتیرلا و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* جدا شده از خوراک دام قادر به مهار رشد باکتری *اشرشیا کولای* بودند. نتایج تحقیق نشان داد که مقدار MIC متابولیت ثانویه مورتیرلا ۱۲۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* ۲۵۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر بوده است و مقدار MBC نیز برای مورتیرلا ۲۵۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* ۵۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر بوده است. متابولیت‌های کپک مورتیرلا در غلظت‌های ۲۳۰ و۲۵۰ و۲۷۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر به‌ترتیب هاله‌هایی به قطر ۹,۳۳ و۱۰ و ۹,۶۷ میلی‌متر اطراف دیسک حاوی متابولیت تشکیل دادند و متابولیت‌های کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در غلظت‌های ۴۸۰ و ۵۰۰ و ۵۲۰ به‌ترتیب هاله‌هایی به قطر ۶ و ۶,۳۳ و ۷ میلی‌متر اطراف دیسک حاوی متابولیت تشکیل دادند. نتاج حاصل از آزمون هاله عدم رشد باکتری نشان داد که متابولیت‌های کپک مورتیرلا در غلظت‌های ۲۵۰ و ۲۶۰ و ۲۷۰ و ۲۸۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر به‌ترتیب هاله‌های عدم رشدی به قطر ۱۲,۶۷ و ۱۳,۳۳ و ۱۳ و ۱۴ میلی‌متر اطراف چاهک حاوی متابولیت تشکیل دادند و متابولیت‌های کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* با غلظت‌های ۵۰۰ و ۵۱۰ و ۵۲۰ و ۵۳۰ به ترتیب هاله‌هایی با قطر ۱۰ و ۱۰,۳۳ و ۱۰,۳۳ و۱۲,۶۷ تشکیل دادند. براساس نتایج به‌دست آمده متابولیت ثانویه مورتیرلا و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* خصوصیات ضد باکتریایی بر روی *اشریشیا کلای* داشتند و می‌توان از متابولیت آنها به‌عنوان ترکیب ضدمیکروبی جدید علیه میکروارگانیسم‌ها استفاده کرد.

منابع

۱. جمالی امام قیس, معینی. مطالعه وضعیت آلودگی آفلاتوکسین در شیر و خوراک دام گاوداری‌های استان کرمانشاه با استفاده از روش الایزا. تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک. ۲۰۱۰ Jun 22;23(2):25-31.

۲. قانعیان محمدتقی، جعفری عباسعلی، جمشیدی سارا، احرام پوش محمدحسن، مومنی حبیبه، جمشیدی امید، قوه محمدعلی. بررسی میزان و نوع آلودگی قارچی خوراک دام در گاوداری های شیری شهر یزد. پژوهش های علوم دامی ایران .[Internet] 1394؛۷(۴):۴۲۲-۴۲۷.

۳. گندمی نصرآبادی حسن, میثاقی علی, آخوندزاده بستی افشین, خسروی علیرضا, بکایی سعید, عباسی فر آرش. اثر اسانس آویشن شیرازی روی آسپرژیلوس فلاووس.

4. Ashu EE, Hagen F, Chowdhary A, Meis JF, Xu J. Global population genetic analysis of Aspergillus fumigatus. MSphere. 2017 Feb 22;2(1):10-128.

5. Barnett HL, Hunter BB. Illustrated genera of imperfect fungi.

6. Bhatta UK. Alternative management approaches of citrus diseases caused by Penicillium digitatum (green mold) and Penicillium italicum (blue mold). Frontiers in Plant Science. 2022 Feb 22;12:833328.

7. Caruso G. Antibiotic resistance in Escherichia coli from farm livestock and related analytical methods: a review. Journal of AOAC International. 2018 Jul 1;101(4):916-22.

8. Darshit R, Pandya DD. Screening and characteristic study of antimicrobial actinomycetes from near-by soil of medicinal plants. Int. J. Pharm. Pharma. Sci. 2018;10:66.
9. Fallahi F, Madani M. Study of contamination of different dairy products distributed in Isfahan to saprophytic fungi. Biological Journal of Microorganism. 2014 Oct 1;3(11).
10. Fisher F, Cook NB. Fundamentals of diagnostic mycology. WB Saunders; 1998.
11. Humphries RM, Kircher S, Ferrell A, Krause KM, Malherbe R, Hsiung A, Burnham CA. The continued value of disk diffusion for assessing antimicrobial susceptibility in clinical laboratories: report from the clinical and laboratory standards institute methods development and standardization working group. Journal of clinical microbiology. 2018 Aug;56(8):10-128.
12. Liu B, Furevi A, Perepelov AV, Guo X, Cao H, Wang Q, Reeves PR, Knirel YA, Wang L, Widmalm G. Structure and genetics of Escherichia coli O antigens. FEMS microbiology reviews. 2020 Nov;44(6):655-83.
13. Manges AR, Geum HM, Guo A, Edens TJ, Fibke CD, Pitout JD. Global extraintestinal pathogenic Escherichia coli (ExPEC) lineages. Clinical microbiology reviews. 2019 Jun 19;32(3):10-128.
14. Witasari LD, Wahyu KW, Anugrahani BJ, Kurniawan DC, Haryanto A, Nandika D, Karlinasari L, Arinana A, Batubara I, Santoso D, Rachmayanti Y. Antimicrobial Activities of Fungus Comb Extracts Isolated From Indo-Malayan Termite Macrotermes Gilvus Mound.
15. Nguyen HT, Yu NH, Jeon SJ, Lee HW, Bae CH, Yeo JH, Lee HB, Kim IS, Park HW, Kim JC. Antibacterial activities of penicillic acid isolated from Aspergillus persii against various plant pathogenic bacteria. Letters in Applied Microbiology. 2016 Jun 1;62(6):488-93.
16. Prakash PY, Bhargava K. A modified micro chamber agar spot slide culture technique for microscopic examination of filamentous fungi. Journal of microbiological methods. 2016 Apr 1;123:126-9.
17. Sadrati N, Daoud H, Zerroug A, Dahamna S, Bouharati S. Screening of antimicrobial and antioxidant secondary metabolites from endophytic fungi isolated from wheat (Triticum durum). Journal of plant protection research. 2013;53(2).
18. Skanda S, Vijayakumar BS. Antioxidant and anti-inflammatory metabolites of a soil-derived fungus Aspergillus arcoverdensis SSSIHL-01. Current Microbiology. 2021 Apr;78(4):1317-23.
19. Teixeira MF, Martins MS, Da Silva JC, Kirsch LS, Fernandes OC, Carneiro AL, Da Conti R, Durán N. Amazonian biodiversity: pigments from Aspergillus and Penicillium-characterizations, antibacterial activities and their toxicities. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy. 2012;6(3):300-11.
20. Adetunji VO, Isola TO. Antibiotic resistance of Escherichia coli, Listeria and Salmonella isolates from retail meat tables in Ibadan municipal abattoir, Nigeria. African Journal of Biotechnology. 2011;10(30):5795-9.

مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری

دوره ۱۰، شماره ۱، بهار ۱۴۰۳، صفحات ۲۲۴-۲۱۳

Antibacterial effects of secondary Metabolites of *Aspergillus fumigatus* and *Mortirella* on *Escherichia coli*

Hamed Azad[1], Masoud hashemi karoii[2], Arian Ghasemi[1], Issa Gholampour Azizi[2]*

[1]*Gradated student, Faculty of Veterinary Medicine, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.*
[2]*Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.*
**Corresponding author*

Abstract

In this study, the secondary metabolite of Mortirella and *Aspergillus fumigatus* was isolated from animal feed and its antibacterial properties against *Escherichia coli* were investigated. The research results showed that the secondary metabolite MIC value of Mortirella was 125 µl/ml, *A. fumigatus* was 250 µl/ml, and the MBC value for Mortirella was 250 µl/ml, *Aspergillus fumigatus* was 500 µl/ml. Metabolites of Mortirella at concentrations of 230, 250, and 270 µl/ml formed halos with diameters of 9.33, 10, and 9.67 mm around the disc containing the metabolite, and metabolites of *A. fumigatus* at concentrations of 480, 500, and 520 formed halos with diameters of 6, 6.33, and 7 mm around the disc containing the metabolite. They formed metabolites. The result of the bacterial growth halo test showed that the metabolites of Mortirella mold at concentrations of 250, 260, 270 and 280 µl/ml of Better formed growth halos with diameters of 12.67, 13.33, 13, and 14 mm around the well containing the metabolite, and the metabolites of *A. fumigatus* with concentrations of 500, 510, 520, and 530 formed halos with diameters of 10, 10.33, 10.33, and 12.67. Based on the obtained results, the secondary metabolite of Mortirella and *A. fumigatus* had antibacterial properties against *Escherichia coli* and their metabolite can be used as a new antimicrobial compound against microorganisms.

Keyword: *Escherichia coli*, *Mortirella*, *Aspergillus fumigatus*, fungi metabolites.