مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری
دوره ۸، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۱
صفحات ۱۲- ۱

Online ISSN: ٤٤٩٣-٢٤٧٦
Print ISSN: ٢٠٢٠-٢٥٣٨
www.irijournals.com

بررسی اثر ضد باکتری متابولیت کپک‌های جدا شده از سیب پوسیده روی*E. coli*

سید مسعود هاشمی کروئی[۱]، فاطمه زهرا علی نیا[۲]، عیسی غلامپور عزیزی*[۳]

[۱] استادیار گروه قارچ‌شناسی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران

[۲] دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران

[۳]استادیار گروه قارچ‌شناسی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران (نویسنده مسئول مکاتبات)

چکیده

متابولیتهای ثانویه ترکیبات طبیعی شگفت‌انگیز با وزن مولکولی پایین هستند. در میان منابع مختلف برای تولید این ترکیبات، میکروارگانیسمها به‌خصوص قارچها یک منبع مهم هستند. در این تحقیق خصوصیات ضد میکروبی متابولیت ثانویه *آسپرژیلوس نایجر*، پنی سیلیوم و *آسپرژیلوس فلاووس* بر علیه باکتری *E. coli* (ATCC 25922) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که میانگین حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC)متابولیت ثانویه جدا شده آن‌ها به ترتیب۵۲/۰۸، ۶۲/۵ ، ۱۰۴/۱۶، میکروگرم در میلی‌لیتر بود و حداقل غلظت کشنده (MBC) برای *آسپرژیلوس نایجر*، پنی سیلیوم و *آسپرژیلوس فلاووس* به ترتیب ۱۰۴/۱۶، ۱۲۵، ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. آزمون انتشار دیسک هاله ممانعت از رشد *E. coli* را در مجاورت غلظت ۳۱/۲۵ ، ۶۲/۵ و۱۲۵ میکرو لیتر متابولیت ثانویه برای *آسپرژیلوس نایجر* به ترتیب ۸/۶ ، ۱۵/۴۳ و ۲۰/۷۵ میلی‌متر و پنی سیلیوم به ترتیب ۶/۳ ، ۱۳/۹ و ۱۷/۵۶ میلی‌متر نشان داد و برای *آسپرژیلوس فلاووس* به ترتیب برابر۸، ۱۳/۴، ۱۵/۵۶ میلی‌متر دیده شد. بنابراین متابولیت ثانویه جدا شده از این قارچها بر علیه باکتری *اشرشیا کلی* اثر ضد میکروبی داشتند و می‌توان از متابولیت ثانویه آن‌ها بر علیه این باکتری مورد مطالعه بیشتر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: : آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس نایجر، پنی سیلیوم، اشرشیا کلی، ضد میکروبی.

۱-مقدمه

میکروارگانیسم ها تقریباً منبع نامحدودی از ترکیبات جدید هستند. در میان آن‌ها، قارچ‌ها وضعیت بالایی را به دلیل توانایی تولید متابولیت های ثانویه متنوع، شامل آنتی بیوتیک ها، عوامل ضد توموری و آنزیم ها نگه داشته اند. هزاران آنتی بیوتیک برای ممانعت و درمان بیماری های به وجود آمده توسط میکروب ها در محیط های کلینیکی در طول نیم قرن گذشته به کاررفته است. جای تعجب نیست که هر چه بیشتر و بیشتر سلول های سرطانی و باکتریایی توسعه یابند، مقاومت ضدمیکروبی و یا حتی مقاومت چندگانه دارویی آن‌ها افزایش می یابد (Loqman et al. , 2009). قارچ‌ها تولیدکننده دوسوم متابولیت های ثانویه با فعالیت زیستی گسترده هستند. متابولیت های ثانویه در انتهای فاز لگاریتمی رشد میکروارگانیسم تشکیل می‌شود و اهمیت آشکاری در رشد یا متابولیسم ارگانیسم ندارد. اصطلاح متابولیسم ثانویه به معنای فرآیندهای بیوشیمیایی زمینه ساز تشکیل متابولیت های قارچی است. از جمله آنتی بیوتیک ها، توکسین ها، سرکوب کننده سیستم ایمنی، مهار کننده آنزیم ها و سایر اثرات بیولوژیکی شناخته شده اند، ترکیبات بیواکتیو و نمونه های شیمیایی تولید شده در این قارچ‌ها خاصیت ضد باکتری و ضد ویروسی دارند و شامل مایکوتوکسین های قوی است که باعث کنترل بیولوژیک بسیاری از بیماری های گیاهی می شود و گاهی در رشد گیاه نیز موثرند. همچنین تولید کننده ی ترکیبات ضد تومور و آنتی بیوتیک های سودمند هستند که در درمان بسیاری از بیماری‌های انسانی و حیوانی نقش دارند. در حالیکه برخی از این متابولیت ها برای بشر و حیوانات سمی هستند (امینی خوئی و همکاران، ۱۳۹۴). متابولیتهای ثانویه تنوع وسیعی را از نظر ساختارهای شیمیایی نشان میدهند که این ساختارهای شیمیایی شامل گروه های آمینوگلیکوزیدی (آمینوسیکلیتول)، آنسامابسین، آنتروسایکلین ها، بتالاکتام‌ها، ماکرولیدها، نوکلئوزیدها، پپتیدها و پلی آن‌ها، تتراسایکلین ها) و دیگر آنتی بیوتیک های خارج از این گروه های تعریف شده میباشند (Hayakawa, 2008). متابولیت اولیه مستقیماً در رشد و متابولیسم درگیر هستند و شامل کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند (Abedini et al. , 2018). متابولیت های ثانویه ترکیبات آلی هستند که مستقیماً در مراحل رشد و نمو یا تولید مثل یک ارگانیسم زنده شرکت نمی‌کنند. بر خلاف متابولیت‌های اولیه، غیبت متابولیت‌های ثانویه به مرگ فوری یاخته منجر نمی‌شود، اما ممکن است در دراز مدت سبب اختلال در بقای موجود زنده، باروری یا ویژگی‌های ظاهری آن گردد یا ممکن است هیچ تغییر مشهودی را سبب نشود (Vasisht et al. , 2016). جنس آسپرژیلوس از نظر اتیولوژیکی (سبب شناسی)، دارویی و تجاری از اهمیت بالایی برخوردار هستند برخی گونه ها می‌توانند باعث ایجاد بیماری در انسان و حیوانات شوند و همچنین می‌توانند به عنوان عوامل بیماریزای گیاهی عمل کنند. علاوه بر تولید تعداد زیادی آنزیم خارج سلولی مفید و اسیدهای آلی، این قارچ‌ها همچنین متابولیت های ثانویه مهمی در بیوتکنولوژی تولید می کنند. محصولات طبیعی همچنان از مهم ترین عوامل درمانی و پزشکی بوده و از اهمیت ویژه ای در درمان بیماری هایی از جمله سرطان، مالاریا، کاهش کلسترول خون، عفونت های باکتریایی و قارچی، بیماری های عصبی و قلبی-عروقی و بیماری های خود ایمنی برخوردار بوده اند (Bills et al. , 2017). اکنون، پس از حدود ۱۰۰ سال از "عصر آنتی بیوتیک"، آنتی بیوتیک های جدید کمتری شناسایی شده و مقاومت آنتی بیوتیکی قابل توجهی پدیدار شده است سازمان بهداشت جهانی معتقد است که استفاده بی سابقه از آنتی بیوتیک ها و متعاقب آن مقاومت ضد میکروبی در حال حاضر یکی از بزرگترین تهدیدها برای سلامت جهانی، امنیت غذایی و توسعه انسانی است. مقاومت پاتوژن های مهم باکتریایی به درمان های رایج ضد میکروبی و ظهور باکتری های مقاوم به چند دارو با سرعت نگران کننده ای در حال افزایش است. چالش‌هایی در مبارزه با عفونت‌های باکتریایی و

بیماری‌های همراه وجود دارد و کمبود فعلی داروهای مؤثر، فقدان اقدامات پیشگیرانه موفق و تنها چند آنتی‌بیوتیک جدید در درمان بالینی نیاز به توسعه گزینه‌های درمانی جدید و درمان‌های ضد میکروبی جایگزین دارد (Mühlen, 2016) و در این مسیر جداسازی و شناسایی متابولیت های قارچی که دارای اثر ضد باکتریایی وسیع باشند یکی از راه های مبارزه با مقاومت آنتی بیوتیکی می باشد که در این پژوهش به بررسی این مهم خواهیم پرداخت.

۲- روش تحقیق

جمع آوری نمونه ها: ابتدا سیب پوسیده در پاییز ۱۴۰۰ از بازار میوه شهرستان بابل جمع آوری شده و جهت جداسازی کپک، آن‌ها را در محیط کشت سابورودکستروز آگار در دمای ۲۸ درجه به مدت یک هفته کشت داده شد.

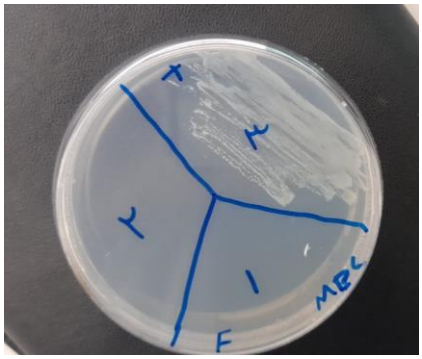
تهیه متابولیت های قارچی: بعد از جداسازی و شناسایی کپک ها در زیر میکروسکوپ نوری، متابولیت ثانویه آن‌ها با روش تخمیر مایع تهیه گردید و برای جداسازی اسپور و میسلیوم، هر نمونه را با مقداری آب مقطر استریل موجود در لوله آزمایش مخلوط شده و سپس۵۰۰ لاندا محلول پلی اکسی اتیلن سوربیتان با نام تجاری توئین ۸۰ با سمپلر به نمونه اضافه شده و سانتریفیوژ شد. سپس با سمپلر ۱۰۰۰ لاندا از اسپور باقی مانده در پایین محلول گرفته شد و به محیط کشت سابرودکستروز براس منتقل شده و با انکوبه کردن در انکوباتور تکان دهنده به مدت ۵ تا ۷ روز متابولیت تهیه شد. سپس برای جداسازی متابولیت های ثانویه هر نمونه به صورت ۳ مرتبه با فاصله زمانی ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد و در مرحله بعد فیلتراسیون محلول حاوی هر نمونه با استفاده از فیلتر های سر سرنگی انجام شد.

تهیه باکتری: باکتری مورد بررسی (*E. coli* ATCC 25922) بود. از باکتری مورد نظر سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند تهیه و برای تست های مورد نظر استفاده شد.

تعیینMIC: در این مرحله برای تعیین اثر ضد باکتریایی کپک‌های جدا شده از سیب ابتدا MICو سپسMBC و در انتها انتشار دیسک انجام شد. در تعیینMIC، ابتدا رقت های متوالی متابولیت های ثانویه از کپک ها با استفاده از ۱۱ لوله آزمایش استریل در نظر گرفته شد و به لوله های مورد نظر۱ سی سی از محیط کشت تریپتیک سوی براث افزوده و اتوکلاو شد. سپس بعد از آماده شدن محیط کشت، برای تهیه رقت های یک دوم با سمپلر µl ۱۰۰۰ از متابولیت تهیه شده به لوله شماره ۱ که حاوی تریپتیک سوی براث افزوده شده و آن را کاملا تکان داده و به این طریق رقت یک دوم از متابولیت مورد نظر در لوله ۱ تهیه شد و بر همین اساس مقدار متابولیت در لوله اول ml/µl ۵۰۰ بدست آمد و سپس با استفاده از سمپلر µl ۱۰۰۰ از لوله شماره ۱ برداشته شده و به لوله شماره ۲ افزوده می شود و این عمل تا لوله شماره ۱۰ تکرار شده و در لوله شماره ۱۰مقدار µl ۱۰۰۰ برداشته و محلول دور ریخته شد. با این عمل در لوله ۱ تا ۱۰ به ترتیب مقدار ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶، ۷/۸، ۳/۹، ۱/۹، ۰/۹ و صفر میکرو لیتر بر میلی‌لیتر متابولیت وجود خواهد داشت. سپس مقدار ۱۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند تهیه شده به لوله های شماره یک تا یازده افزوده شد لوله شماره ۱۱ نیز به عنوان لوله کنترل مثبت و شاهد که حاوی محیط کشت و سوسپانسیون باکتریایی *E. coli* می باشد در نظر گرفته شد. سپس تمام لوله ها در انکوباتور ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد و پس از آن، لوله ها برای تعیین MIC بررسی شدند. برای تعیین MIC ابتدا لوله کنترل مثبت بررسی شده و پس از تایید کدورت حاصل از رشد باکتری، سایر لوله ها نیز به منظور یافتن کدورت حاصل از رشد باکتری بررسی شدند. لوله ای که دارای کمترین

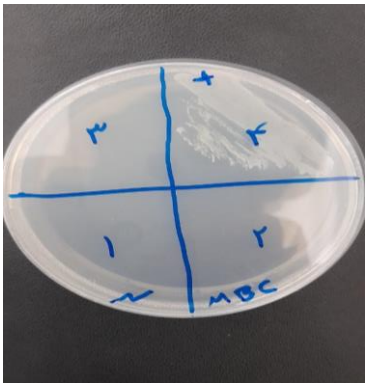
غلظت از متابولیت کپک بوده و در آن کدورتی دیده نشد به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی تعیین شد. برای تعیینMIC تمام مراحل ۳ بار تکرار شدند.

تعیین MBC:در مرحله بعد جهت تعیینMBC با توجه به نتایج MIC پلیت های حاوی تریپتیک سوی آگار تقسیم بندی شده و از لوله یMIC و لوله های قبل از آن توسط سمپلر به میزان ۱۰ ml نمونه گرفته شده و به پلیت ها منتقل و از آن کشت خطی تهیه شد. سپس این پلیت ها در انکوباتور ۳۷درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. و پس از آنMBC برابر است با کمترین غلظتی که باعث از بین رفتن ۹۹ ٪ باکتری های موجود می شود و بر اساس اینکه تعداد *E. coli* کشت داده شده بر روی پلیت به میزان $۱۰^{۴}$ باکتری بود، آن دسته از مواردی که تعداد کلنی *E. coli* کمتر از ۱۰ عدد و همچنین کمترین غلظت متابولیت ثانویه کپک را شامل می شدند به عنوان MBC تعیین شدند. برای تعیینMBC تمام مراحل ۳ بار تکرار شدند (شکلهای ۱، ۲ و ۳)(غلامپور و همکاران ۱۴۰۰).

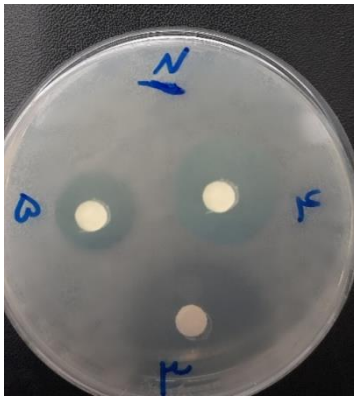


شکل ۱- پلیت تعیین MBC متابولیت *آسپرژیلوس فلاووس* روی *E. coli*

شکل ۲-روش دیسک دیفیوژن متابولیت *آسپرژیلوس فلاووس* روی *E. coli*

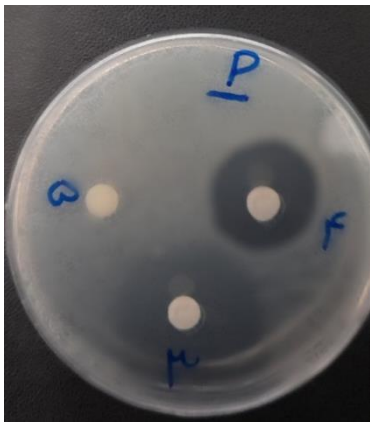


شکل ۳- پلیت تعیین MBC متابولیت *آسپرژیلوس نایجر* روی *E. coli*



شکل ۴-روش دیسک دیفیوژن متابولیت *آسپرژیلوس نایجر* روی *E. coli*

شکل ۵- پلیت تعیین MBC متابولیت *پنی سیلیوم* روی *E. coli*



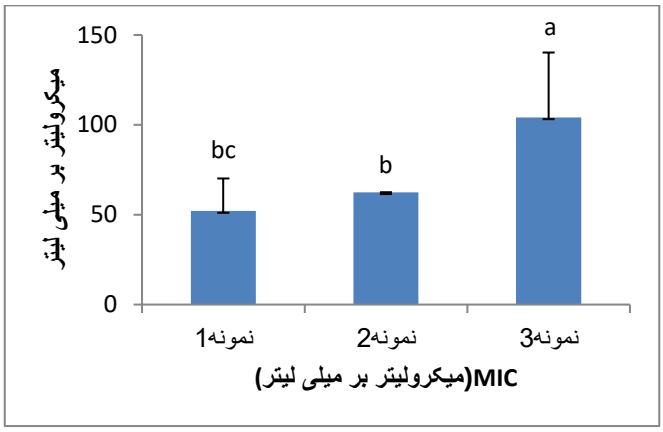
شکل ۶-روش دیسک دیفیوژن متابولیت *پنی سیلیوم* روی *E. coli*

تعیین اثر ضد باکتریایی متابولیت تهیه شده از کپک ها روی *E. coli* به روش انتشار دیسک: ابتدا با استفاده از سوسپانسیون ۰. ۵ مک فارلند، میزان ۱۰ ml از سوسپانسیون باکتریایی *E. coli* توسط سمپلر برداشته شده و کشت با سواپ استریل روی محیط کشت سابرودکستروز آگار انجام شد. سپس برای هر متابولیت با توجه به نتیجه MIC ، ۳ دیسک در نظر گرفته شد. با استفاده از سمپلر یک دیسک با توجه به نتیجه MIC بعنوان دیسک اصلی تلقیح شد و برای کنترل، به میزان ۱۵ µl رقت های بالاتر و پایین تر از نتیجه MICدر دو دیسک دیگر تلقیح شده سپس در سطح پلیت های حاوی سابرودکستروز آگار و باکتری مورد نظر قرار داده شد. سپس تمام پلیت های حاوی دیسک در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار انکوبه شدند. در مرحله بعد قطر هاله های ممانعت از رشد متابولیت ثانویه کپک ها اندازه گیری شدند و نتایج حاصل از آن بررسی شدند. تمام مراحل ۳ بار تکرار شد (شکلهای ۴، ۵ و ۶)(قربان نیا دلاور ۱۴۰۱).

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج بدست آمده با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه و آنالیز واریانس تک متغیر در سطح (P<۰/۰۵) مورد بررسی قرار گرفته و همچنین مقایسه میانگین ها با استفاده از روش آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال (P<۰/۰۵) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته است. آنالیزهای آماری از نرم افزار Spss V. 22 انجام گرفته و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel V. 2013رسم گردیده است.

۳-یافته های تحقیق

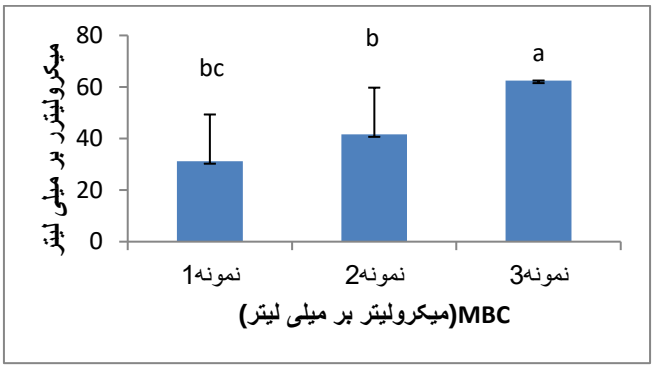
در این تحقیق از سیب های کپک زده، قارچهای *آسپرژیلوس نایجر*، پنی سیلیوم و *آسپرژیلوس فلاووس* جدا شدند. MIC متابولیت های استخراج شده از این قارچها روی *E. coli* به ترتیب۵۲/۰۸، ۶۲/۵ و ۱۰۴/۱۶ میکرو لیتر بر میلی‌لیتر بدست آمد (نمودار ۱).



نمودار۱ -آزمون تعیین غلظت ممانعت از رشد باکتری (MIC) در مجاورت متابولیت های مورد مطالعه

نمونه ۱=*آسپرژیلوس نایجر*، نمونه۲=پنی سیلیوم ونمونه۳=*آسپرژیلوس فلاووس* و حروف لاتین متفاوت (a, b,c) روی نمودار به معنی تفاوت معنی دار ($p<0.05$) در نتایج است.

MBC متابولیت های استخراج شده از قارچ *آسپرژیلوس نایجر*، پنی سیلیوم و *آسپرژیلوس فلاووس* بر روی *اشرشیا کلی* اثر کشندگی با غلظت معادل ۱۰۴/۱۶، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکرو لیتر بر میلی‌لیتر داشت (نمودار۲).



نمودار۲- آزمون تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) در مجاورت متابولیت های مورد مطالعه

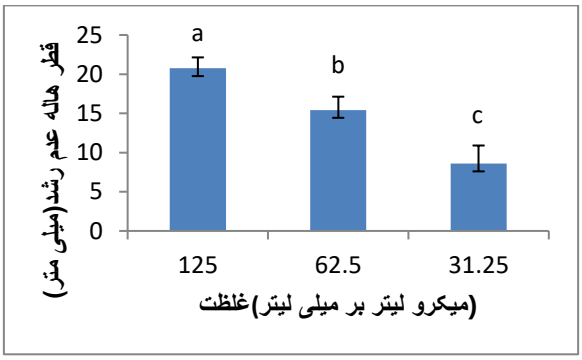
نمونه ۱=*آسپرژیلوس نایجر*، نمونه۲=پنی سیلیوم ونمونه۳=*آسپرژیلوس فلاووس* و حروف لاتین متفاوت (a, b,c) روی نمودار به معنی تفاوت معنی دار ($p<0.05$) در نتایج است.

تعیین خصوصیت ضد باکتریایی به روش دیسک

میانگین هاله عدم رشد در این مطالعه مطابق جداول۱، ۲ و ۳ و نیز نمودار ۳، ۴ و ۵ بدست آمدند.

جدول ۱ -میانگین هاله عدم رشد ناشی از متابولیت *آسپرژیلوس نایجر* (میلی‌متر)

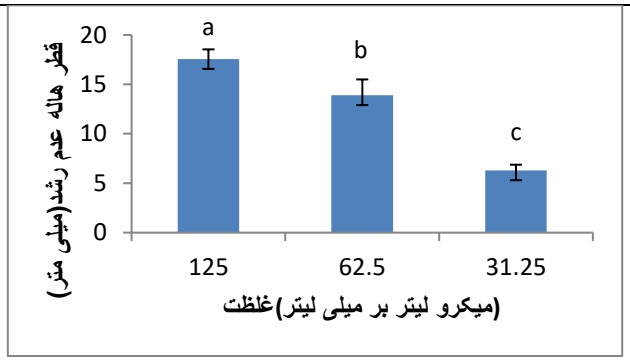
غلظت ۳۱/۲۵میکرولیتر بر میلی‌لیتر	غلظت ۶۲/۵ میکرو لیتر بر میلی‌لیتر	غلظت ۱۲۵ میکرو لیتر بر میلی‌لیتر
۸/۲±۶/۳	۱۵/۱±۴۳/۷	۲۰/۱±۷۵/۳۹



نمودار ۳ - میانگین هاله عدم رشد ناشی از متابولیت *آسپرژیلوس نایجر* (میلی‌متر)

جدول ۲- میانگین هاله عدم رشد ناشی از متابولیت پنی سیلیوم (میلی‌متر)

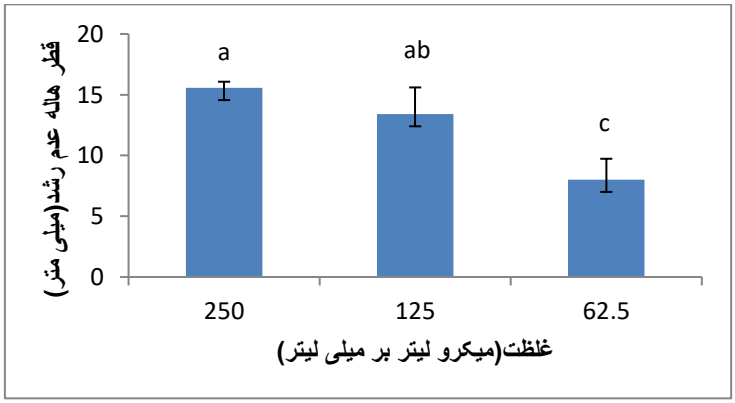
غلظت ۳۱/۲۵میکرولیتر بر میلی‌لیتر	غلظت ۶۲/۵ میکرو لیتر بر میلی‌لیتر	غلظت ۱۲۵ میکرو لیتر بر میلی‌لیتر
۶/۲±۳/۳	۱۳/۱±۹/۶	۱۷/۰±۵۶/۹۸



نمودار ۴- میانگین هاله عدم رشد ناشی از متابولیت پنی سیلیوم (میلی‌متر)

جدول ۳- میانگین هاله عدم رشدناشی از متابولیت *آسپرژیلوس فلاووس* (میلی‌متر)

غلظت ۶۲. ۵ میکرو لیتر بر میلی‌لیتر	غلظت ۱۲۵ میکرو لیتر بر میلی‌لیتر	غلظت ۲۵۰میکرولیتر بر میلی‌لیتر
۱±۸/۷	۱۳/۲±۴/۲	۱۵/۰±۵۶/۵۱



نمودار ۵- میانگین هاله عدم رشد ناشی از متابولیت *آسپرژیلوس فلاووس* (میلی‌متر)

۴-بحث و نتیجه گیری

در سال های اخیر متابولیت‌های ثانویه قارچی که مولکول‌های کوچکی هستند. فعالیت‌های بیولوژیکی متنوعی را در پزشکی و صنعت از خود نشان دادند. (Michael and Jerome, 2019)قارچ‌ها به عنوان یکی از مهمترین عوامل بیماریزای گیاهی، منبع اصلی از متابولیتهای ثانویه بیواکتیو هستند و از اهمیت قابل توجهی در فعل و انفعالات زیست محیطی برخوردار میباشند از جمله متابولیتها میتوان آنتی بیوتیکها، توکسینها و آنزیمها را نام برد. متابولتهای ثانویه اثر بسیار مهمی در برقراری ارتباط بین قارچ‌ها و محیط اطرافشان دارند. این ترکیبات نقش مهمی در بقا قارچ در محیط دارند، با توجه به نقش دفاعی متابولیتهای ثانویه، تاثیر استرسهای محیطی بر میکروارگانیسم کاهش مییابد. (Hong et al. , 2000)در این مطالعه اثرات ضد میکروبی متابولیت قارچ بر روی *E. coli* مورد بررسی قرار گرفت قارچهایی که متابولیت ثانویه آن‌ها مورد استفاده قرار گرفت عبارت بودند از آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فلاووس و پنی سیلیوم. نتایج تحقیق حاضر ثابت کرد که متابولیت قارچهای ذکر شده بر روی *E. coli* اثر ضد میکروبی خوبی داشته است. نتایج آزمونهای میکروبی مطاله ما نشان داد که متابولیتهای ثانویه حاصل از قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر* بر روی *E. coli* اثر ضد میکروبی معادل۵۲/۰۸ میکروگرم در میلی‌لیتر داشت و پنی سیلیوم بر روی *E. coli* اثر ضد میکروبی معادل۶۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر داشت و همچنین مشخص شد *آسپرژیلوس فلاووس* بر روی *E. coli* اثر ضد میکروبی معادل ۱۰۴/۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر داشت.

مطالعات محققین گذشته نیز ثابت می کند که متابولیتهای قارچی دارای اثر ضد میکروبی بر روی باکتری های بیماری زا دارد. در پژوهش Sohailو همکاران نشان دادند عصاره *آسپرژیلوس فلاووس* در برابر تمام باکتری‌های مورد دارای خواص ضد میکروبی خوبی بود. در این مطالعه از روش انتشار چاه آگار استفاده شد و از عصاره استونیتریل و ان هگزان استفاده شد حداقل غلظت بازدارنده (MIC)، عصاره ها در برابر این باکتری ها وسویه های قارچی در محدوده ۰. ۲۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر بودند. که این به دلیل وجود متابولیت های ثانویه مایکوتوکسین، آفلاتوکسین، اسیدهای کوچیک است که مسئول خواص ضد میکروبی میباشند (. Sohail et Sri al. , 2014) و همکاران (۲۰۲۰) در پژوهش خود ثابت کردند که متابولیت‌های ثانویه از قارچ فلاووس یک پاتوژن ضدباکتری بود. این ایزوله توانست ۳ باکتری *کلبسیلا پنومونیه* ، *باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس* را مهار کند، اما قادر به مهار *E. coli و سودوموناس آئروژینوزا* نبود. محدوده بازدارندگی عصاره تولید شده با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر دیسک بین ۷/۱۴ تا ۱۰/۳۲ میلی‌متر بود. قوی ترین پتانسیل را عصاره اتیل استات نشان داد که قادر به ایجاد ۱۰. ۳۲ میلی‌متر ناحیه مهاری علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و عصاره متانولی و قادر به ایجاد مناطق مهار ۱۰. ۰۵ میلی‌متری در برابر *کلبسیلا پنومونیه* بود. در نتیجه، قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* را می‌توان برای تولید ترکیبات ضد باکتریایی علیه پاتوژن‌های MDR کشت داد ((Sir et al. , 2020. Abdulwahid و همکاران (۲۰۱۳) در پژوهشی دیگر بیان کردند که *آسپرژیلوس نایجر* بالاترین اثر بازدارندگی را در برابر *سودوموناس آئروژینوزا* ، *استافیلوکوکوس اورئوس* ، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ، باسیلوس sp با پهنه های بازدارندگی به ترتیب (۱۵، ۲۵، ۳۰، ۳۲) میلی‌متر و به دنبال آن پنی سیلیوم داشت. از آنالیز IR و UV تایید شد که این ترکیب دارای طبیعت آروماتیک-نیتروژنی است. از چنین دستاوردی می‌توان گفت که ترکیب ضد باکتری فعال ممکن است تنسیدول باشد که یک آلکالوئید یا مشتق جدید آلکالوئید است ((Abdulwahid et al. , 2013.

با توجه به نتایج به دست آمده از مطاله ما استفاده از متابولیتهای ثانویه قارچی برای کنترل رشد و یا حتی مرگ *E. coli* میتواند به عنوان جایگزین مناسب برای ترکیبات شیمیایی ضد میکروب و ضد باکتریایی موثر و مفید باشد.

منابع

۱. امینی خوئی، ز. ، جان احمدی، ز. ، نبی پور، ا. (۱۳۹۴). فعالیت های زیستی متابولیت های ثانویه راسته زوآنتایدهای دریایی. طب جنوب, ۱۸(۵), ۱۱۰۳-۱۱۱۴.

۲. قربان نیا دلاور ا.، قاسمی ن. انسی نژاد م. ، هاشمی کروئی س. م. ، غلامپور عزیزی ع. (۱۴۰۱). مقایسه فعالیت ضد مخمری عصاره‌های آبی و الکلی چای سیاه (*Camellia sinensis*) و هسته انگور (*Vitis vinifera L.*)بر روی *مالاسزیا پاکی درماتیس* (ATCC 10231) و مقایسه‌ی آن با داروی کلوتریمازول. مجله دانش زیســـتی ایـــران. ۱۷(۱): ۴۹-۵۸.

۳. غلامپور عزیزی ع. ، احمدی ف. ، کالنتری م. ۱۴۰۰. بررسی اثر مهاری عصاره آبی، اتانولی و متانولی گیاه خارخاسک Tribulus terrestrisبر رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس*. مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری. ۷(۴): ۱-۲۶.

4. Abdulwahid B. A. Al-Shaibani, Faiz I. Al-Shakarchi, Rasha S. Ameen. (2013), Extraction and Characterization of Antibacterial Compound from Aspergillus niger. Journal of Al-Nahrain University Vol. 16 (4),. 167-174 Science 167.

5. Abedini, D. , Monfared, S. R. , & Abbasi, A. (2018). The effects of promoter variations of the N-Methylcanadine 1-Hydroxylase (CYP82Y1) gene on the noscapine production in opium poppy. Scientific reports8(1) 4973.

6. Bills, G. F. and J. B. J. T. F. K. Gloer. (2017). "Biologically active secondary metabolites from the fungi". P: 1087-1119.

7. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. (2020) Antibiotics: past, present and future. Curr Opin Microbiol. 51:72–80. doi: 10. 1016/j. mib. 2019. 10. 008 WHO. Antibiotic Resistance. Available online at: https://www. who. int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance

8. Hong, L. , Wen, X. , Zoua, J. , Cai, M. , Jun, H. , Ren Xiang, T. , (2000), «New bioactive metabolites produced by Colletotrichum sp», an endophytic fungus in Artemisia annua. Plant Science, 151(1): 67-73.

9. Mühlen, S. Dersch. P. (2016). Anti-virulence strategies to target bacterial infections. Curr Top Microbiol Immunol (March)

10. Michael F. S. , Jerome C. (2019). Chromatin-dependent regulation of secondary metabolite biosynthesis in fungi. Fems Microbiology. 43, 591–607.

11. Sohail, IUR. , Zafar I. , Muhammad A. , Sheena, FI. , Shafiul M. , Zafar I. (2014). In vitro antimicrobial study of Aspergillus flavus mycelial extract against different bacterial and fungal pathogenic strains. International Journal of Biosciences. 4, 6: 223-228, 2014

12. Sri S. , Ambariyanto A. , Agus T. , Endang S. , Ali R. , Muhammad S. B. , Rizky R. J. , Mahadika F. S. (2020) Antimicrobial Activity of Fungal Extract of The Aspergillus flavus from Hiri Island, North Maluku to Pathogenic Bacteria. Jurnal Kelautan Tropis Maret, 23(1):127-135.

13. Sardul SS. , Ravindra PA. , Suneel K. , Yogita T. , Loknath D. (2018), evaluation of antibacterial activity of endophytic fungi aspergillus japonicus isolated from tridax procumbens l. Doi: http://dx. doi. org/10. 22159/ajpcr. 2018. v11i9. 21564.

14. Vasisht, K. , Sharma, N. , & Karan, M. (2016). Current perspective in the international trade of medicinal plants material: an update. Current pharmaceutical design, 22(27), 4336-4288.

15. Hayakawa M. (2008). Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil. ; 22(1): 9- 12

16. Loqman S, Bouizgarne B, Barka EA, Clément C, von Jan M, Spröer C, et al. (2009). Streptomyces thinghirensis sp. Nov. , isolated from rhizosphere soil of Vitis vinifera. International journal of systematic and evolutionary MICrobiology. ; 59(12):3063-7.

مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری

دوره ۸، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۱، صفحات ۱۲-۱

Investigating the antibacterial effect of mold metabolite isolated from rotten apple on *E. coli* (ATCC 25922)

Seyed Masoud Hashemi Karoii[1], Fatima Zahra Alinia[2], Issa Gholampour Azizi[*3]

[1]*Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.*

[2]*Gradated student, Faculty of Veterinary Medicine, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.*

[3*]*Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.*

Corresponding author

Abstract

Secondary metabolites are amazing natural compounds with low molecular weight; Among the various sources for the production of these compounds, microorganisms, especially fungi, are an important source. In this research, the antimicrobial properties of the secondary metabolites isolated from Aspergillus niger, Penicillium and Aspergillus flavus against E. coli (ATCC 25922) were investigated. The results showed that the average minimum growth inhibition concentration (MIC) of the isolated secondary metabolite was 52. 08, 62. 5, and 104. 16 µg/ml for all of them, respectively, and the minimum lethal concentration (MBC) for Aspergillus niger, Penicillium and Aspergillus flavus were 104. 16, 125, 250 µg/ml, respectively. Halo disk diffusion test inhibited bacterial growth in the vicinity of 62. 5, 62. 5, and 125 microliter secondary metabolite concentrations for Aspergillus niger, 8. 6, 15. 43, and 20. 75 mm, respectively, and Penicillium, 6. 9, 3, respectively. It showed 13. 17 and 17. 56 mm and for Aspergillus flavus it was 8, 13. 4 and 15. 56 mm respectively. Therefore, the secondary metabolite isolated from these fungi had antimicrobial effect against E. coli, and their secondary metabolite can be studied more against this bacterium.

Keywords: Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Penicillium, Escherichia coli, antimicrobial