

فعالیت ضد باکتریایی ترکیب زیست فعال باکتری برون همزیست کرم خاکی *Lumbricus rubellus* (گونه *Peribacillus butanolivorans* KG) علیه برخی از باکتری های بیماری زای گرم منفی و گرم مثبت

محمد بهرامی نژاد^۱، امیرارسلان کاویانی فرد^۲، بهروز دوستی^۳، فرهاد گیلاوند^{۳*}، نجمه مولوی وردنجانی^۱

مقاله پژوهشی

مقدمه: این مطالعه با هدف شناسایی باکتری های برون همزیست کرم خاکی *Lumbricus rubellus* به عنوان مهارکننده های رشد برخی از باکتری های بیماری زا انجام شد.

روش بررسی: در مجموع ۵۰ کرم خاکی (*Lumbricus rubellus*) از نمونه خاک (۵ تا ۱۵ سانتی متر) زمین های کشاورزی خرم آباد جمع آوری و در کیسه های پلی پروپیلن استریل به آزمایشگاه منتقل شدند. جداسازی باکتری ها از کرم های خاکی *Lumbricus rubellus* روی محیط کشت نوترینت آگار انجام شد. برای بررسی فعالیت ضد میکروبی سویه های جدا شده، روش انتشار در حفره آگار علیه باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشیشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا انجام شد. بهترین جدایه انتخاب شده بر اساس هاله عدم رشد، با روش های فیلوژنتیکی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، برای تعیین جنس و گونه مورد بررسی بیشتر قرار گرفت.

نتایج: در این مطالعه، از ۱۴ باکتری جدا شده برون همزیست کرم خاکی *Lumbricus rubellus*، تنها یک جدایه قادر به تشکیل هاله عدم رشد علیه هر چهار باکتری بیماری زا بود. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی بر اساس توالی ژن 16S rRNA، انتساب باکتری مورد تجزیه و تحلیل به جنس *Peribacillus* را امکان پذیر ساخت. تجزیه و تحلیل های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی بعدی نیز باکتری مورد نظر را به جنس مربوطه نسبت دادند. در نهایت این باکتری به عنوان گونه *Peribacillus butanolivorans* KG شناسایی شد و توالی ژنومی و اطلاعات آن با شماره دسترسی 1. OR229899، به پایگاه داده NCBI ارسال گردید.

نتیجه گیری: فعالیت ضد باکتریایی مشاهده شده برای *Peribacillus butanolivorans* KG در بین باکتری های برون همزیست کرم خاکی *Lumbricus rubellus*، پتانسیل آن را به عنوان منبعی از عوامل آنتی بیوتیکی جدید نشان می دهد.

واژه های کلیدی: کرم خاکی، برون همزیستی، *Lumbricus rubellus*، *Peribacillus butanolivorans* KG

ارجاع: بهرامی نژاد محمد، کاویانی فرد امیرارسلان، دوستی بهروز، گیلاوند فرهاد، مولوی وردنجانی نجمه. فعالیت ضد باکتریایی ترکیب زیست فعال باکتری برون همزیست کرم خاکی *Lumbricus rubellus* (گونه *Peribacillus butanolivorans* KG) علیه برخی از باکتری های بیماری زای گرم منفی و گرم مثبت. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۴؛ ۳۳ (۱۰): ۳۹-۹۵۲۱.

۱- گروه زیست شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

۳- گروه زیست شناسی، واحد خرم آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم آباد، ایران.

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۶۳۶۲۷۵۴۰، پست الکترونیکی: FARHAD98@iau.ac.ir، صندوق پستی: ۹۸۱۷۸۱۶۶۴۵

مقدمه

سازمان بهداشت جهانی در گزارش‌های مختلف بر تهدید جهانی قریب‌الوقوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی تأکید کرده است، به‌طوری‌که تا سال ۲۰۵۰، میزان مرگ و میر جهانی ناشی از پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌تواند سالانه به ۱۰ میلیون نفر برسد (۱،۲). افزایش چشمگیر مقاومت پاتوژن‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در طول ۶۰ سال گذشته به‌عنوان یک چالش مداوم که عموماً با جهش یا انتقال افقی ژن پدیدار می‌شود، همواره نیاز به توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید و ترکیبات آنتی‌بیوتیکی نوآورانه به‌عنوان جایگزین‌های مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌هایی که مقاومت در برابر آن‌ها ایجاد شده است را نشان می‌دهد (۳). تقریباً می‌توان منشأ همه آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده فعلی را در میکروارگانیسم‌های مشتق شده از خاک ردیابی کرد که در این بین امیدوارکننده‌ترین فرصت‌ها برای کشف و توسعه آنتی‌بیوتیک‌ها، میکروارگانیسم‌هایی هستند که به‌صورت همزیست با یک گیاه، جانور یا میکروارگانیسم دیگری در خاک زندگی می‌کنند (۱). تکامل همزمان همزیست‌های میکروبی با میزبان‌های خاص خود منجر به بیان ویژگی‌های بیوشیمیایی منحصربه‌فردی می‌شود که منابع غنی از متابولیت‌های ثانویه با فعالیت‌های زیستی قابل توجه از نظر درمانی را فراهم می‌سازند (۴). به عبارت دیگر، از منظر کشف دارو، در قلب سیستم‌های همزیستی، محصولات طبیعی با ساختارهای متمایزی وجود دارد (۵) که حداقل ۴۰ درصد از این داربست‌های شیمیایی توسط ترکیبات مصنوعی قابل فرآوری نیستند. از این‌رو، این محصولات طبیعی به دلیل جهت‌گیری‌های فضایی پیچیده و کاملاً تعریف شده خود که یک ساختار بیولوژیکی منحصربه‌فرد را ایجاد می‌کنند، نقاط شروع استثنایی در کشف دارو هستند (۶). کرم‌های خاکی مهم‌ترین بی‌مهرگان خاک هستند و تاکنون برای بررسی عوامل درمانی بالقوه مورد استفاده قرار گرفته‌اند، اگرچه باکتری‌های دخیل در همزیستی آنها، حوزه‌ای است که هنوز برای کشف و توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید به‌طور گسترده ناشناخته مانده است، این در حالی است که مشخص شده است کرم‌های خاکی

به‌عنوان حامل باکتری‌های سالم خاک با خاصیت درمانی عمل می‌کنند (۷). در میان کرم‌های خاکی، *Lumbricus rubellus* (L. rubellus)، سابقه طولانی در استفاده دارویی به‌عنوان درمان کمکی یا طب جایگزین دارد. کرم خاکی *L. rubellus* به گروه کرم‌های خاکی اپی‌ژئیک تعلق دارد که در ۵ سانتی‌متر بالایی لایه خاک و در لایه بستر زندگی می‌کنند (۸). از آنجایی‌که لایه بستر خاک تنوع باکتریایی قابل‌توجهی را در خود جای داده است، کرم خاکی *L. rubellus* از همزیستی متنوع باکتریایی برخوردار می‌باشد. اگر چه نقش درون همزیست‌های *L. rubellus* در کشف آنتی‌بیوتیک بیشتر شناخته شده است، اما تنها مطالعات کمی در مورد پتانسیل ترکیبات تولید شده توسط باکتری‌های برون همزیست آن بحث کرده‌اند، حال آنکه شواهد نشان می‌دهد باکتری‌های برون همزیست به‌طور خاص در دفاع از میزبان خود در برابر پاتوژن‌ها نقش ایفا می‌کنند (۹). بنابراین، غربالگری بیشتر باکتری‌های برون همزیست بالقوه کرم *L. rubellus*، در راستای شناسایی اهداف درمانی ضد میکروبی ضرورت دارد. هدف از این مطالعه شناسایی باکتری‌های برون همزیست کرم خاکی *L. rubellus* به‌عنوان مهارکننده‌های رشد برخی از باکتری‌های بیماری‌زا است.

روش بررسی

این مطالعه پژوهشی به‌صورت تجربی از اسفند ماه ۱۴۰۱ تا شهریور ماه ۱۴۰۲ در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی مجتمع آزمایشگاهی رازی دانشگاه علوم پزشکی لرستان و آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد انجام شد. باکتری‌های مورد نظر تحقیق یعنی باسیلوس سوبتیلیس (ATCC 465)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923)، اشیریشیا کلی (ATCC 25922) و سودوموناس آئروجینوزا (ATCC 27853) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری گردید.

نمونه برداری کرم خاکی *L. rubellus* و خالص‌سازی باکتری‌های برون همزیست آن: نمونه‌های کرم خاکی *L. rubellus* (۵۰ نمونه از عمق ۵-۱۵ سانتی‌متری) از خاک

مرطوب زمین‌های کشاورزی اطراف خرم‌آباد جمع‌آوری گردید. به منظور حذف آلودگی‌های ناخواسته، ابتدا کرم‌ها با استفاده از آب مقطر استریل شستشو داده شدند. سپس به منظور جداسازی باکتری‌های برون همزیست، با استفاده از سوپ استریل از سطح پوست *L. rubellus* نمونه‌گیری به عمل آمد. این سوپ میکروبی کاملاً در آب مقطر استریل تخلیه شد و از سوسپانسیون میکروبی حاصل، رقت‌های سریالی از 10^{-1} تا 10^{-10} تهیه و ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شد (با کمک میله شیشه‌ای سر کج دریگالسکی). پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شده و پس از آن کلنی‌ها مختلف با استفاده از روش کشت خطی و بر روی محیط نوترینت آگار، خالص‌سازی شدند (۱۰).

گزینش باکتری‌های برون همزیست مهارکننده‌ی رشد باکتری‌های بیماری‌زا: از کلنی‌های تک حاصل از مرحله قبل، برای بررسی فعالیت ضد میکروبی سویه‌های جدا شده، از طریق روش انتشار در حفره آگار، علیه سویه‌های باکتریایی استاندارد باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشريشیاکلی و سودوموناس آئروجینوزا استفاده شد. برای این منظور، ابتدا از باکتری‌های استاندارد و بر روی محیط نوترینت آگار کشت چمنی تهیه شد و مقداری از کلنی هر جدایه به آن اضافه گردید. ایجاد هاله عدم رشد در اطراف کشت خطی هر باکتری، فعالیت ضد میکروبی علیه آن در نظر گرفته شد. به منظور شناسایی دقیق بهترین جدایه انتخاب شده بر اساس هاله عدم رشد، از روش‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیلوژنتیکی استفاده شد (۱۰).

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی: به منظور تکثیر ژن 16S rRNA، استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت High pure PCR Product (Roche، آلمان) صورت گرفت. به طور خلاصه، قبل از شروع خالص‌سازی، بافر شستشو تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد گرم شد و مراحل زیر به ترتیب انجام گرفت. به یک

میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری فاقد نوکلئاز، ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی، ۲۰۰ میکرولیتر بافر اتصال و ۴۰ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه شد. بلافاصله این مخلوط میکس شد و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه و پس از اختلاط به مدت ۱ دقیقه در دور ۸۰۰۰× g سانتریفیوژ گردید. در ادامه ۵۰۰ میکرولیتر بافر حذف و مهارکننده اضافه گردید و سانتریفیوژ انجام شد (۱ دقیقه در دور ۸۰۰۰× g). سپس ۵۰۰ میکرولیتر بافر شستشو اضافه و سانتریفیوژ تکرار گردید. نهایتاً میکروتیوب حاوی DNA خالص در یخچال نگهداری شد. تکثیر ژن 16S rRNA طبق پروتکل استاندارد انجام گرفت. ژن 16S rRNA با استفاده از پرایمرهای F27 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') و R1492 (5'-TACGGYTACCTTGTTA CGACTT-3') تکثیر شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی؛ ۱ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۲۵ میکرولیتر از هر پرایمر، ۵/۵ میکرولیتر مسترمیکس و ۱۸ میکرولیتر dd H₂O، تحت برنامه دمایی- زمانی؛ دناتوراسیون اولیه: ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۲ دقیقه، دناتوراسیون: ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه، آنیلینگ: ۶۲ درجه سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه، تکثیر: ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۲ دقیقه انجام شد. متعاقباً محصول نهایی واکنش روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. رنگ‌آمیزی با ژل رد صورت گرفت و آشکارسازی با استفاده از ترانسلومیناتور واکنش PCR توسط دستگاه توالی یاب ABI 377 (Applied Biosystems, Foster City, USA) با روش Sanger dideoxy sequencing تعیین توالی شد. برای تعیین میزان قرابت باکتری مورد مطالعه با دیگر باکتری‌ها، BLAST توالی به‌دست آمده در سایت NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) انجام گرفت. در نهایت درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش Neighbor-joining و با Bootstrap value of 1000 replications در نرم‌افزار MEGA (version 11) ترسیم گردید.

تجزیه و تحلیل تکمیلی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی: از آنجائیکه نتایج BLAST باکتری مورد نظر، میزان شباهت ۹۸/۶۶ درصدی را به باکتری *Peribacillus butanolivorans* نشان داد، به منظور اطمینان خاطر از تعیین دقیق گونه مربوطه، تجزیه و تحلیل‌های تکمیلی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی برای جدایه انجام شد.

رنگ‌آمیزی اسپور به روش وارتز-کانکلین: از سوسپانسیون میکروبی گستره تهیه شد و لام با محلول مالاشیت سبز ۰/۵ درصد پوشانیده شد و به مدت ۵ دقیقه با استفاده از شعله تحت حرارت قرار گرفت. سپس لام شستشو گردید و رنگ‌آمیزی زمینه با استفاده از سافرانین ۰/۵ درصد به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت (۱۲).

تست کاتالاز: مقداری از کلنی باکتری به یک لام تمیز منتقل شد و حدود ۰/۵ میلی‌لیتر از هیدروژن پروکسید ۳ درصد به آن اضافه گردید. تشکیل حباب گاز مثبت بودن تست کاتالاز را نشان داد. از باکتری استرپتوکوکوس پایوژنز به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد (۱۳).

تست اکسیداز: ارگانیزم‌های دارای سیتوکروم C، آنزیم سیتوکروم اکسیداز تولید می‌کنند. این آنزیم در حضور اکسیژن اتمسفر، یک معرف احیاء بنام N-tetramethyl-p-phenylene dihydrochloride (NTPDD) را اکسید کرده و ترکیب ایندوفنول به رنگ ارغوانی تیره به‌وجود می‌آورد. جهت انجام این تست، یک کاغذ فیلتر به معرف احیاء N-tetramethyl-p-phenylene dihydrochloride (NTPDD) آغشته شد و اجازه داده شد تا کاملاً خشک گردد. سپس مقداری از کلنی باکتری روی کاغذ قرار داده شد. تشکیل رنگ ارغوانی مثبت بودن تست در نظر گرفته شد. از باکتری استرپتوکوکوس پایوژنز به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد (۱۴).

تست حرکت با روش قطره معلق در لام حفره‌دار: برای این منظور، مقدار کمی وازلین در چهار گوشه لامل قرار داده شد و به اندازه ۲ لوپ از نمونه مایع حاوی باکتری مورد آزمایش در وسط سطح لامل قرار داده شد. سپس لام در برابر سطح حاوی

وازلین قرار گرفت و تحت فشار و به سرعت بر عکس گردید و در زیر میکروسکوپ نوری حرکت باکتری مورد بررسی قرار گرفت (۱۵).

تست احیا نیترات به نیتريت، دنیتريفیکاسيون و دنیتريفیکاسيون: برای انجام تست احیای نیترات به نیتريت و دنیتريفیکاسيون، محیط کشت‌های A (۵ گرم پپتون + ۳ گرم عصاره مخمر + ۱۰ گرم نیترات پتاسیم در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) و B (۵ گرم پپتون + ۳ گرم عصاره مخمر + ۱۰ گرم نیتريت پتاسیم در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) همراه با لوله دورهام جهت پی بردن به تولید گاز حاصل از دنیتريفیکاسيون استفاده شد. جهت بررسی تست دنیتريفیکاسيون از محیط استات برات (دارای آمونیوم کلراید به‌عنوان تنها منبع نیتروژن) استفاده شد و تشکیل رنگ قرمز بدنال استفاده از محلول‌های α- نفتیل آمین و سولفانیلیک اسید، انجام دنیتريفیکاسيون در نظر گرفته شد (۱۶).

تست ایندول: برای این منظور مقداری باکتری به محیط غنی از تریپتوفان پپتون برات تلقیح شد و در دمای ۳۵ درجه سانتی-گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوبه گردید. پس از ایجاد کدورت، ۳ میلی‌لیتر از آن با ۱ میلی‌لیتر گرین مخلوط شد تا ایندول از فاز آبی وارد فاز گرین گردد، سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف کوآکس اضافه شد. ایجاد رنگ صورتی تا قرمز حاکی از مثبت بودن تست ایندول در نظر قرار گرفت. از باکتری اشیریشیاکلی به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۱۶).

تست اوره‌آز: جهت انجام تست اوره‌آز، محیط اوره آگار به‌صورت اسلنت تهیه شد و به‌صورت سطحی و عمقی جدایه روی آن کشت داده شد و سپس در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوبه گردید. رنگ محیط صورتی-قرمز مثبت بودن تست اوره‌آز را نشان داد. از باکتری پروتئوس میرابیلیس به‌عنوان باکتری کنترل مثبت استفاده شد (۱۶).

تست مصرف سیترات: محیط سیمون سیترات را به‌صورت اسلنت تهیه شد و باکتری به‌طور سطحی و عمقی بر روی آن کشت داده شد. تولید رنگ آبی نشان دهنده مصرف سیترات توسط باکتری در نظر گرفته شد. از باکتری اشیریشیاکلی به‌عنوان باکتری شاهد منفی استفاده شد (۱۶).

از منابع کربن مختلف گلوکز، مالتوز، گالاکتوز، لاکتوز، ساکارز، ریبوز، سوربیتول، L-آرابینوز، مانوز، رافینوز، D-زایلوز، مانیتول، تریپتوفان، نشاسته و سلوبیوز به طور جداگانه به ازای ۱۰۰ میلی لیتر محیط سنتزی (فاقد گلوکز) اضافه شد. پس از استریل کردن، باکتری به این محیطها تلقیح شد و لوله های آزمایش در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. ایجاد کدورت در این محیطها نشان دهنده رشد باکتری بود (۱۸).

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS version 16 انجام شد. نتایج مربوط به شناسایی توالی نوکوتیدی سوبه های جداسازی شده نیز در پایگاه NCBI ثبت و آنالیز همولوژی ترادف انجام گرفت.

نتایج

جداسازی و خالص سازی باکتری ها از کرم خاکی *L. rubellus*: بر اساس اندازه، رنگ، قوام و شکل کلنی های رشد یافته بر روی محیط نوترینت آگار، تعداد ۱۴ کلنی متفاوت تشخیص داده شد (شکل ۱). این کلنی ها با استفاده از روش کشت خطی و بر روی محیط نوترینت آگار، از هم تفکیک و خالص سازی و به ترتیب از L₁ تا L₁₄ شماره گذاری شدند.

نتایج گزینش باکتری های تولید کننده ماده ضد میکروبی: باکتری های تولید کننده ماده ضد باکتریایی از طریق ایجاد هاله عدم رشد گزینش شدند. نتایج نشان داد که از بین ۱۴ کلنی تخلیص شده، ۳ جدایه (L₁، L₄ و L₇) قادر به تولید هاله عدم رشد بودند که از این میان تنها جدایه L₄ توانست در برابر هر چهار باکتری مورد مطالعه هاله عدم رشد تولید کند (جدول ۱). از آنجا که هدف ما گزینش یک باکتری با بیشترین دامنه تاثیر بر روی باکتری های مورد مطالعه بود، بنابراین جدایه L₄ برای مطالعات بعدی انتخاب گردید.

نتایج شناسایی فیلوژنتیکی باکتری ایزوله شده: پس از استخراج DNA باکتری و انجام PCR جهت تکثیر قطعه 16 SrDNA، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. در نتیجه آن یک باند در نزدیکی محل ۱۵۰۰bp در

تست هیدرولیز ژلاتین: باکتری به محیط ژلاتین در لوله آزمایش تلقیح شد و در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ روز انکوبه گردید. پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت، لوله ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد. مایع ماندن محیط ژلاتین، مثبت بودن تست هیدرولیز ژلاتین را نشان داد. از باکتری اشیریشیالکی به عنوان کنترل منفی استفاده شد (۱۶).

تست Oxidative Fermentative (OF): استفاده از محیط اکسیداتیو-فرمانتاتیو (OF) یک روش ساده در تمایز بین مصرف هوازی و بی هوازی کربوهیدرات توسط میکروارگانیسم ها است. در این تست از قند گلوکز استفاده گردید و ۲ لوله O و F در نظر گرفته شد. با استفاده از آنس، باکتری ها تا عمق لوله ها تلقیح شدند و سپس در لوله F به میزان ۲ میلی لیتر پارافین ریخته شد. همینطور ۲ لوله O و F شاهد، بدون تلقیح باکتری در نظر گرفته شد و تمام لوله ها در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد برای ۱۴ روز انکوبه شدند. تولید اسید ناشی از مصرف قند از طریق تغییر رنگ معرف بروموتیمول بلو از سبز به زرد همراه است. تولید اسید در لوله O نشان دهنده واکنش اکسیداتیو و تولید اسید در هر دو لوله O و F نشان دهنده واکنش فرمانتاتیو بود. ترکیب محیط OF بر حسب ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر شامل ۲ گرم پپتون، ۵ گرم سدیم کلراید، ۰/۳ گرم دی پتاسیم فسفات، ۰/۰۳ گرم بروموتیمول بلو، ۲/۵ گرم آگار و ۱ گرم از قند مورد آزمایش بود. بعد از تهیه محیط OF، pH محیط بر روی ۷/۱ تنظیم شد که در این حالت رنگ محیط سبز خواهد شد (۱۶).

تست بی هوازی: جهت انجام این تست، حدود ۷۵ درصد از یک لوله آزمایش درب پیچ دار با محیط کشت (۵ گرم پپتون + ۳ گرم عصاره مخمر در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر) پر شد و بعد از استریل کردن، باکتری به آن تلقیح گردید. سپس مابقی فضای خالی لوله توسط محیط کشت استریل پر شد. درب لوله بسته شد و ظرف مدت ۷ روز در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه گردید و روزانه کدورت محیط جهت رشد باکتری بررسی شد (۱۷).

تست مصرف منبع کربن جهت رشد: جهت بررسی مصرف منبع کربن توسط باکتری، در لوله های آزمایش مقادیر ۱ درصد

مقایسه با مارکر ۲ kb مشاهده شد که حاکی از صحت انجام واکنش تکثیر 16 SrDNA بود (شکل ۲). با تعیین توالی محصول PCR، ۱۴۴۸ جفت باز نوکلئوتید به دست آمد که توالی آن‌ها در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج همانندجویی به دست آمده با کمک نرم‌افزار BLAST در NCBI نیز نشان داد که این توالی، ۹۸/۹۶ درصد به توالی نوکلئوتیدی باکتری *Peribacillus butanolivorans strain NECC10521* و ۹۸/۶۲ درصد به توالی نوکلئوتیدی باکتری‌های *Bacillus simplex strain QT421*، *Bacillus*، *Peribacillus* sp. (in: *Bacteria*) strain SQ7-2 و *Peribacillus simplex strain JX7-qm* شباهت دارد. در مورد توالی چند گونه از جنس‌های *Peribacillus* و *Bacillus* و در رتبه‌های بعدی میزان شباهت به ۹۸/۵۵ درصد تقلیل یافت. برای مقایسه بیشتر، نتایج همولوژی و بلاست در سایت NCBI در (جدول ۲) آورده شده است. همولوژی به دست آمده با کمک نرم‌افزار BLAST در NCBI، قرابت باکتری مورد مطالعه را با سایر باکتری‌ها مشخص نمود (جدول ۲). بر این اساس، درخت

فیلوژنتیکی با استفاده از روش Neighbor joining رسم شد که در شکل ۴ نشان داده شده است. بررسی‌های فیلوژنتیکی نشان داد که جدایه *L4* دسته‌ای (خوشه) را با سویه‌های مختلف *P. butanolivorans* تشکیل می‌دهد و در این میان بیشترین قرابت را به سویه‌ی *SMV514-R2L31* نمایان می‌سازد. البته این در حالی است که سویه‌ی *KG* با سایر سویه‌های این گونه یعنی سویه‌های *C2L5D*، *C2L5C* و *JN3109* قرابت بسیار زیادی دارد. اما گونه دیگر جنس *Bacillus* یعنی *B. subtilis* به عنوان outliers دسته‌بندی شد که این امر تاییدی بر تعلق *KG* به گونه *P. butanolivorans* بود. همچنان که در این شکل مشخص است، سایر جنس‌های باکتریایی یا قارچی نیز هر کدام دسته‌های جداگانه و دوری را با جدایه *KG* تشکیل دادند (شکل ۴). مقادیر Bootstrap به صورت درصدهایی از 1,000 replications نشان داده شده‌اند. مقیاس مورد استفاده، ۰/۰۰۱ جایگزینی به ازای موقعیت هر نوکلئوتید را نشان می‌دهد.

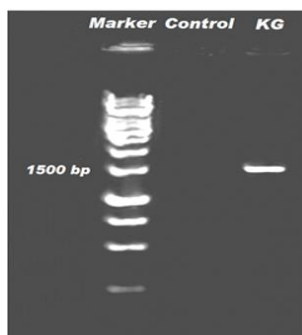


شکل ۱: کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط نوترینت آگار جدا شده از *L. rubellus*

جدول ۱: قابلیت تولید هاله عدم رشد توسط جدایه‌ها (باکتری‌های برون همزیست) علیه باکتری‌های مورد مطالعه

قابلیت تولید هاله توسط جدایه	L ₁	L ₄	L ₇
باسیلوس سوبتیلیس	-	+	-
استافیلوکوکوس اورئوس	-	+	-
اشریشیا کلی	+	+	+
سودوموناس آئروجینوزا	+	+	-

تولید هاله‌ی عدم رشد (+)، عدم تولید هاله عدم رشد (-)



شکل ۲: (راست) باند 16S rDNA حاصل از PCR با استفاده از الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد؛ (چپ) نمایی از مارکر به کار گرفته شده در این الکتروفورز

```

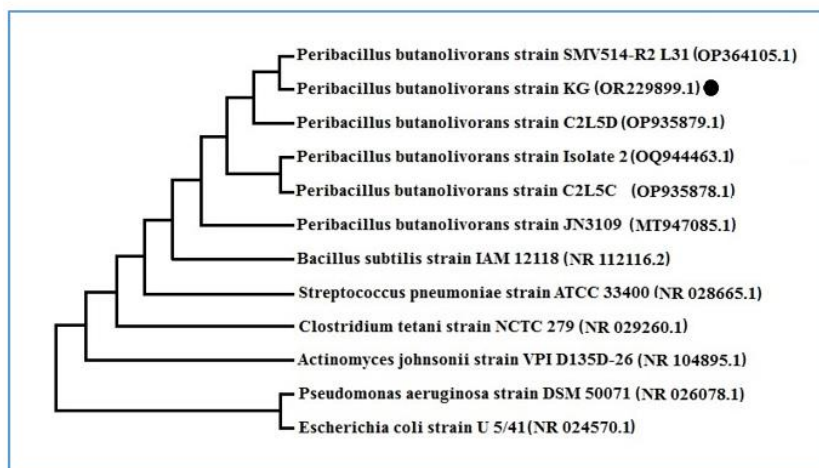
1  ggcgctgtct atacatgcaa gtcgagcgaa tctgatggga gcttgtctcc tgagattagc
61  ggcgagcggg tgagtaaacac gtgtgcaacc agcctataag actgggataa cttcgggaaa
121 ccggagctaa tacaggatac gttcttttct cgcttgagag aagatggaaa gacggtttcg
181 gctgtcactt atagatgggc ccgcgcgca ttagctagtt ggtgaggtaa tggctcacca
241 aggcgacgat gctagccga cctgagaggg tgatcgggca cactgggact gagacacggc
301 ccagactcct acgggaggca gcagtaggga atcttcgca atggacgaaa gtctgacgga
361 gcaacgccgc gtaaacgaag aaggccttcg ggtcgtaaa ttctgtgtt agggagaagac
421 aagtaccaga gtaactgctg gtaccttgac ggtacctaac cagaaagcca cggctaacta
481 cgtgccgca gccgcggtaa tacgtagggt gcaagcgttg tccggaatta ttgggcgtaa
541 agcgcgcgca ggtggttcgt taagtctgat gtgaaagccc acggcttcaa cgtggagggg
601 tcattggaaa ctggggaaact tgagtgcaga agaggaaagt ggaattccaa gtgtagcggg
661 gaaatgcgta gagatttgga ggaacaccag tggccgaagg cgactttctg gtctgtaact
721 gacactgagg cgcgaaagcg tggggagcaa acaggattag ataccctggt agtccacgcc
781 gtaaacgatg agtgctaagt gttagatggg ttccgcctt ttaagtgtcg cagctaacgc
841 attaaagcact ccgcctgggg agtacggccg caaggctgaa actcaaagga attgacgggg
901 gcccgcacaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca acgcaagaa cctttaccag
961 gtcttgacat cctctgacaa ccctagagat agggcggttc ctttcgggg gacagagtga
1021 cagggtggtgc atggtgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttggggttaa gtcccgcac
1081 gagcgcaacc ctgtatctta gttgccagca ttcagttggg cactctaagg tgactgccgg
1141 tgacaaacgg gaggaagggt gggatgacgt caaatcatca tgccccttat gaactgggct
1201 acacacgtgc tacaatggat ggtacaaagg gctgcaaac tgcaaggta agcgaatccc
1261 ataaagccat tctcagttcg gattgctagg ctgcaactcg cctacatgaa gcccggaat
1321 cgctagtaat cgcggtacag ccattgccgc gtgaatacgt tccgggacct gtacacacc
1381 gcccgtcaca ccacgagagt ttgtaacacc cgaagtcggt gaggtaacct ttatggagcc
1441 agccgcta
    
```

شکل ۳: نتایج تعیین توالی 16S rDNA باکتری جداسازی شده

جدول ۲: نتایج حاصل از بررسی همولوژی توالی 16S rDNA باکتری ایزوله شده در NCBI

Description	Query Cover	Per. Ident	Accession
Peribacillus butanolivorans strain NECC10521 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98. 96%	OQ816033. 1
Bacillus simplex strain QT421 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98. 62%	MT033036. 1
Bacillus sp. (in: Bacteria) strain SQ7-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98. 62%	OP696630. 1
Peribacillus simplex strain JX7-qm 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98. 62%	OM362934. 1
Peribacillus butanolivorans strain PHB-7a chromosome, complete genome	99%	98. 55%	CP030926. 1
Bacillus sp. MBEP23 gene for 16S rRNA, partial sequence	99%	98. 55%	AB733567. 1

Bacillus megaterium gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 100168	99%	98. 55%	AB681146. 1
Peribacillus butanolivorans strain KJ40 chromosome, complete genome	99%	98. 55%	CP050509. 1
Sporosarcina sp. CL3. 9 partial 16S rRNA gene, isolate CL3. 97	99%	98. 55%	FM173670. 1
Paenibacillaceae bacterium CL2. 6 partial 16S rRNA gene, isolate CL2. 63	99%	98. 55%	FM173527. 1
Corynebacterineae bacterium CL1. 15 partial 16S rRNA gene, isolate CL1. 150	99%	98. 55%	FM173383. 1
Paenibacillaceae bacterium CL7. 8 partial 16S rRNA gene, isolate CL7. 89	99%	98. 55%	FM174172. 1
Bacillaceae bacterium CL7. 69 partial 16S rRNA gene, isolate CL7. 69	99%	98. 55%	FM174169. 1
Bacillaceae bacterium CL6. 78 partial 16S rRNA gene, isolate CL6. 78	99%	98. 55%	FM174084. 1
Bacillaceae bacterium CL5. 132 partial 16S rRNA gene, isolate CL5. 132	99%	98. 55%	FM173964. 1
Bacillaceae bacterium CL5. 13 partial 16S rRNA gene, isolate CL5. 137	99%	98. 55%	FM173963. 1
Bacillaceae bacterium CL5. 98 partial 16S rRNA gene, isolate CL5. 98	99%	98. 55%	FM173958. 1
Corynebacterineae bacterium CL5. 9 partial 16S rRNA gene, isolate CL5. 97	99%	98. 55%	FM173957. 1
Bacillus sp. SS-1 partial 16S rRNA gene, isolate SS-1	99%	98. 55%	AM396493. 1
Bacillus butanolivorans strain SQ7-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98. 68%	MN235850. 1
Peribacillus butanolivorans strain C2L5C 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98. 48%	OP935878. 1
Peribacillus simplex strain GS18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98. 48%	OL851777. 1
Bacillus megaterium gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 13498	99%	98. 48%	AB680420. 1
Rhizobium sp. CL4. 3 partial 16S rRNA gene, isolate CL4. 37	99%	98. 48%	FM173816. 1
Bacillaceae bacterium CL3. 139 partial 16S rRNA gene, isolate CL3. 139	99%	98. 75%	FM173671. 1
Bacillaceae bacterium CL1. 94 partial 16S rRNA gene, isolate CL1. 94	99%	98. 48%	FM173382. 1
Bacillus sp. (in: firmicutes) strain MB104 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98. 48%	MH699234. 1
Bacillus simplex strain IHBB 9817 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98. 48%	KR085892. 1



شکل ۴: ارتباط فیلوژنتیکی بر اساس توالی ژن 16S rRNA، بین سویه KG و گونه‌های جنس *Peribacillus* بر پایه روش Neighbor-joining



شکل ۵: نمایی از پلیت حاوی باکتری *P. butanolivorans* KG بر روی محیط نوترینت آگار

نتایج تست‌های تکمیلی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی:

به‌منظور شناسایی دقیق‌تر سویه برگزیده، تست‌های تکمیلی مورفولوژی و بیوشیمیایی مختلفی بر روی آن انجام گرفت که در ادامه به آنها پرداخته می‌شود. در شکل ۵، شکل کلنی این باکتری نشان داده شده است. همانگونه که در شکل مشخص است، باکتری دارای کلنی کرمی رنگ، دایره‌ای با حاشیه صاف بود. رنگ‌آمیزی جدایه: نتایج رنگ‌آمیزی گرم در شکل ۶ نشان داده شده است. همانگونه که در شکل مشخص است، باکتری به رنگ آبی- بنفش (گرم مثبت) و به شکل باسیلی، زنجیره‌ای و پراکنده دیده شد.

نتایج رنگ‌آمیزی اسپور به روش وارتز-کانکلین: همان‌طور که در شکل ۷ نشان داده شده است، نتایج رنگ‌آمیزی اسپور به روش وارتز-کانکلین باکتری‌هایی قرمز رنگ دارای نقاط سبز رنگ را نشان داد که مبنی بر توانایی باکتری در تولید اسپور بود.

نتایج تست کاتالاز: نتایج تست کاتالاز در شکل ۸ نشان داده شده است. همچنان که در سمت چپ تصویر مشخص است، باکتری مورد مطالعه قادر به تولید حباب بوده و بنابراین کاتالاز مثبت است، در حالی که باکتری استرپتوکوکوس پایونز در سمت راست تصویر، به‌عنوان کنترل قادر به تولید حباب نبود.

نتایج تست اکسیداز: نتایج تست اکسیداز در شکل ۹ نشان داده شده است. همان‌طور که در این شکل مشخص است، باکتری *P. butanolivorans* KG (سمت راست) توانسته است معرف NTPDD را اکسید کرده و ترکیب ایندوفنول به رنگ ارغوانی تیره بوجود آورد که به معنی اکسیداز مثبت بودن آن می‌باشد. در حالی که باکتری استرپتوکوکوس پایونز در سمت چپ تصویر، به‌عنوان کنترل قادر به تولید رنگ ارغوانی نبوده است.

نتایج تست حرکت با روش قطره معلق در لام حفره‌دار: مشاهدات انجام گرفته در زیر میکروسکوپ نوری در مورد

قدرت حرکت باکتری *P. butanolivorans KG* با استفاده از روش قطره معلق در لام حفره‌دار، نشان داد که این باکتری متحرک می‌باشد.

نتایج تست احیا نیترات به نیتريت، دنیتريفيکاسيون و نیتريفيکاسيون: نتایج تست احیا نیترات به نیتريت توسط باکتری *P. butanolivorans KG* نشان داد که این باکتری توانسته رنگ دیازونیوم قرمز را به وجود آورد و لوله آزمایش حاوی محیط استات برات (دارای آمونیوم کلراید به عنوان تنها منبع نیتروژن) را قرمز رنگ نماید، بنابراین قادر به احیاء نیترات به نیتريت بوده است (شکل ۱۰). لازم به ذکر است که باکتری مورد مطالعه قادر به دنیتريفيکاسيون و نیتريفيکاسيون نبود.

نتایج تست ایندول: همان‌طور که در (شکل ۱۱) (سمت راست) نشان داده شده، باکتری *P. butanolivorans KG* قادر به هیدرولیز اسید آمینه تریپتوفان نبوده و در نتیجه حلقه ایندول تولید نکرده است. بر عکس، در لوله سمت چپ، باکتری اشريشیاکلی حلقه ایندول تولید کرده است که نشان دهنده صحت روش انجام تست می‌باشد. بنابراین باکتری مورد مطالعه ایندول منفی می‌باشد.

نتایج تست اوره‌آز: نتایج تست تجزیه اوره در (شکل ۱۲) نشان داده شده است. همچنانکه در این شکل مشخص است، باکتری *P. butanolivorans KG* (سمت چپ تصویر) قادر به تجزیه اوره و در نتیجه تولید رنگ ارغوانی در محیط اوره نبوده است، اما باکتری پروتئوس میرابیلیس (سمت راست تصویر) با تجزیه اوره باعث تغییر رنگ لوله آزمایش به ارغوانی شده است. بنابراین باکتری مورد مطالعه اوره منفی می‌باشد.

نتایج تست مصرف سیترات: نتیجه این تست توانایی باکتری *P. butanolivorans KG* در مصرف سیترات به عنوان تنها منبع کربن موجود در محیط مورد استفاده را در (شکل ۱۳) نشان می‌دهد. همان‌طور که قابل ملاحظه است، این باکتری (سمت چپ تصویر) با مصرف سیترات باعث تغییر pH و در نتیجه تغییر رنگ محیط از سبز به آبی شده و بنابراین سیترات مثبت است. باکتری اشريشیاکلی (سمت راست تصویر) که به عنوان شاهد

منفی استفاده شده بود قادر به مصرف سیترات نبوده و بنابراین تغییری در رنگ محیط کشت ایجاد نکرده است.

نتایج تست هیدرولیز ژلاتین: نتایج تست هیدرولیز ژلاتین در شکل ۱۴ نشان می‌دهد که باکتری *P. butanolivorans KG* (تصویر پایین) توانسته است با هیدرولیز ژلاتین باعث سیالیت بیشتر محیط شود و بنابراین ژلاتین مثبت است. اما باکتری اشريشیاکلی (تصویر بالا) به عنوان کنترل قادر به هیدرولیز ژلاتین نبود.

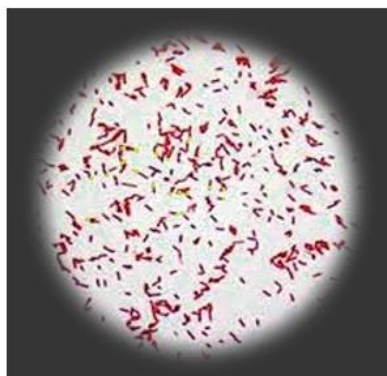
نتایج تست Oxidative Fermentative (OF): بر اساس نتایجی که از این تست بدست آمد، مشخص شد که باکتری *P. butanolivorans KG* در شرایط هوازی (اکسیداتیو) قادر به مصرف گلوکز بوده و بنابراین با تولید متابولیت‌های اسیدی، باعث تغییر رنگ محیط از سبز به زرد می‌شود اما در شرایط بی‌هوازی قادر به تخمیر گلوکز نمی‌باشد (شکل ۱۵).

نتایج تست بی‌هوازی: بررسی‌های انجام گرفته در طی ۷ روز نشان داد که باکتری *P. butanolivorans KG* در محیط کشت حاوی ۵ گرم پپتون بعلاوه ۳ گرم عصاره مخمر در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و در شرایط بی‌هوازی، قادر به رشد نمی‌باشد.

نتایج تست مصرف منبع کربن جهت رشد: نتایج بررسی رشد و تولید کدورت با منابع مختلف کربنی توسط باکتری *P. butanolivorans KG* نشان داد که این باکتری قدرت استفاده از منابع کربنی کازئین، مالتوز، گالاکتوز، لاکتوز، ساکارز، ریبوز، سوربیتول، مانوز، L-آرابینوز، مانیتول، رافینوز، نشاسته، سلوبیوز و تریپتوفان را، به عنوان منابع کربنی نداشت اما قادر بود گلوکز و ژلاتین را هیدرولیز کند. به‌طور کلی نتایج تست‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری مورد مطالعه در (جدول ۳) خلاصه شده است. در نهایت، بر اساس نتایج به‌دست آمده از بررسی‌های فیلوژنتیکی و تست‌های تکمیلی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، سویه مورد مطالعه تحت عنوان *Peribacillus butanolivorans KG* شناسایی و نام‌گذاری گردید. این باکتری در پایگاه داده GenBank با شماره دسترسی OR229899.1 ثبت شد و در دسترس سایرین قرار گرفت.



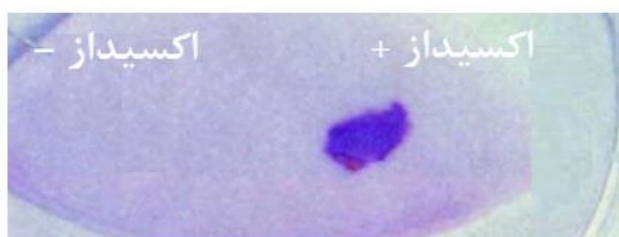
شکل ۶: نمایی از رنگ آمیزی گرم در زیر میکروسکوپ



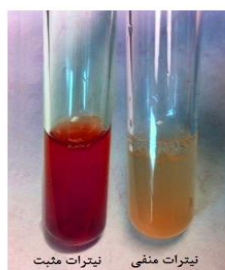
شکل ۷: نمایی از رنگ آمیزی اسپور به روش وارتنر-کانکلین که در آن اسپورها به صورت نقاط سبز رنگ در درون باکتری های قرمز رنگ دیده می شوند



شکل ۸: نمایی از نتایج تست کاتالاز. سمت راست: استرپتوکوکوس پایوژنز (کاتالاز منفی) و سمت چپ: *P. butanolivorans KG* (کاتالاز مثبت)



شکل ۹: نمایی از نتایج تست اکسیداز. سمت راست: *P. butanolivorans KG* (اکسیداز مثبت) و سمت چپ: استرپتوکوکوس پایوژنز (اکسیداز منفی)



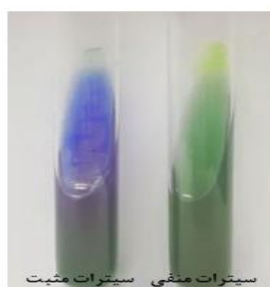
شکل ۱۰: نمایی از تست احیاء نیترات به نیتريت که در آن باکتری *P. butanolivorans KG* توانسته رنگ دیازونیوم قرمز را به وجود آورد (سمت چپ تصویر) و بنابراین قادر به احیاء نیترات به نیتريت بوده است



شکل ۱۱: نتیجه تست ایندول که در آن باکتری *P. butanolivorans KG* (سمت راست تصویر) ایندول منفی و باکتری اشریشیاکلی (سمت چپ تصویر) ایندول مثبت است



شکل ۱۲: نمایی تست اوره آز که در آن باکتری *P. butanolivorans KG* (سمت چپ) اوره آز منفی و باکتری پروتئوس میرابیلیس (سمت راست تصویر) اوره آز مثبت بود



شکل ۱۳: نتایج تست مصرف سیترات که در آن باکتری *P. butanolivorans KG* (سمت چپ تصویر)، سیترات مثبت و باکتری اشریشیاکلی (سمت راست تصویر) سیترات منفی است



شکل ۱۴: نتایج تست هیدرولیز ژلاتین که در آن باکتری *P. butanolivorans KG* (تصویر پایین) ژلاتین مثبت بوده و محیط را به فرم مایع در آورد اما باکتری اشیریشیاکلی (تصویر بالا) چنینی قابلیت را نشان نداد



شکل ۱۵: نتایج تست مصرف گلوکز توسط باکتری *P. butanolivorans KG* سمت راست (اکسیداتیو) و سمت چپ (تخمیری)

جدول ۳: مقایسه نتایج تست‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری مورد مطالعه با سایر باکتری‌های مشابه

ویژگی	A	B	C	D	E
شکل سلول	باسیلی	باسیلی	باسیلی	باسیلی	باسیلی
طول سلول (μm)	۳.۶۲	۳.۷۵	*	*	*
عرض سلول (μm)	۱.۰۰	۱.۰۵	*	*	*
رنگ کلنی	کرمی	کرمی	کرمی	کرمی	کرمی
فرم کلنی	دایره‌ای	دایره‌ای	دایره‌ای	دایره‌ای	دایره‌ای
حاشیه کلنی	صاف	صاف	صاف	صاف	صاف
رنگ آمیزی گرم	+	+	+	+	+
تجمع در زیر میکروسکوپ و پراکنده	زنجیره‌ای و پراکنده	زنجیره‌ای	*	*	*
محل نمونه برداری	کرم خاکی	خاک	ریزوسفر فلفل	رسوبات رودخانه	دیوار فرسوده
توان رشد در (۴۵°C)	+	+	*	+	-
توان رشد در (۴°C)	+	+	*	+	-
دمای رشد بهینه (°C)	۳۰	۲۵	۲۵	۲۵	۲۷
رشد به صورت بیهوازی	-	-	-	-	V
دامنه‌ی تحمل دما (°C)	۴-۴۵	۴-۴۵			
دامنه‌ی تحمل pH	۶-۹	۶-۹	۶-۹	۶-۹	۶-۹
pH بهینه	۷	۷	*	۷	۸

تحميل NaCl % (W/V)	۶-۰	۵-۰.۵	*	۵-۰.۵	کمتر از ۵
اېتيمم NaCl % (W/V)	۱	٪۱	*	۱	۰
رشد در NaCl ٪۷	-	-	-	-	-
تحرك	+	+	+	+	+
توليد اسپور	+	+	+	+	+
هوازی اجباری	+	+	*	-	V
اکسیداز	+	+	*	+	-
کاتالاز	+	+	+	+	+
سیترات	+	-	*	-	-
اوره آز	-	-	-	-	-
احياء نيترات به نيتريت	+	+	*	+	+
دنيتريفيکاسيون	-	*	*	*	*
نيتريفيکاسيون	-	*	*	*	*
درصد G+C (mol%)	۳۷/۶۵	۳۷/۴	۳۸/۱۳	۳۷/۴	۳۹/۹
ايندول	-	-	*	-	-
مصرف کازئين	-	-	-	-	V
مصرف ژلاتين	+	-	-	-	V
گلوکز	+	-	-	-	W
مصرف کازئين	-	-	-	-	W
مالتوز	-	-	-	-	-
گالاكتوز	-	-	-	-	-
لاکتوز	-	-	-	-	-
ساكارز	-	-	-	-	W
ريبوز	-	-	-	-	-
سوربيتول	-	-	-	-	-
مانوز	-	-	-	-	-
D-زايلوز	-	-	-	-	*
L-آرابينوز	-	-	-	-	-
مانيتول	-	-	-	-	-
رافينوز	-	-	-	-	-
نشاسته	-	-	-	-	+
سلوبيوز	-	-	-	-	-
تريپتوفان	-	-	-	-	-

V: variable; W: weak; *: there was no results founded

بحث

این مطالعه با هدف شناسایی باکتری‌های برون همزیست کرم خاکی *L. rubellus* به عنوان مهارکننده‌های رشد برخی از باکتری‌های بیماری‌زا انجام شد. اکثر محققان نتایج امیدوارکننده‌ای را برای کرم خاکی *L. rubellus* و درون همزیست‌های آن به عنوان یک عامل ضد میکروبی از بررسی

متون گزارش کرده‌اند. با این حال، هنوز مطالعات پتانسیل باکتری‌های برون همزیست آن به عنوان مهارکننده‌های رشد باکتری‌های بیماری‌زا را پشتیبانی نمی‌کنند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی یک چالش مداوم بوده است که تقریباً بلافاصله پس از کشف اولیه آنتی‌بیوتیک‌ها پدیدار شده است و نیاز به توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید و ترکیبات آنتی‌بیوتیکی

نوآورانه‌ای وجود دارد که بتوانند به‌طور مؤثر توسعه مقاومت را کاهش دهند. سالانه بیش از ۳۵۰۰۰ نفر تنها در ایالات متحده بر اثر عفونت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک جان خود را از دست می‌دهند. این امر اهمیت شناسایی جایگزین‌های دیگر برای آنتی‌بیوتیک‌هایی که مقاومت در برابر آنها ایجاد شده است را نشان می‌دهد. تقریباً می‌توان منشأ همه آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده فعلی را در باکتری‌ها و قارچ‌های مشتق شده از خاک ردیابی کرد. باکتری‌ها و قارچ‌های دخیل در همزیستی، حوزه‌ای است که هنوز برای کشف و توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید به‌طور گسترده ناشناخته مانده است (۱،۱۹). سیستم همزیستی کرم خاکی یکی از بهترین همزیستی‌های دفاعی مورد مطالعه تا به امروز را شامل می‌شود. به‌طور خاص، باکتری‌های همزیست کرم خاکی، بینش شگفت‌انگیزی در مورد مجموعه‌ای از ذرات زیست فعال که توسط بی‌مهرگان به‌کار گرفته می‌شوند، ارائه داده‌اند که نه تنها به برآورده کردن نیازهای غذایی و تولیدمثلی میزبان کمک می‌کند، بلکه میزبان را قادر می‌سازد تا در برابر شکارچیان احتمالی، به‌ویژه حشرات مختلف، دفاع نماید. برخی از این همزیستی‌های باکتریایی در میزبان‌های متعدد شناخته شده‌اند، اما به‌نظر می‌رسد اکثر سویه‌ها مختص گونه هستند (۲۲-۲۰). مدت‌هاست که از کرم خاکی *L. rubellus* به‌عنوان دارو برای درمان انواع بیماری‌ها و بهبود سیستم ایمنی استفاده می‌شود. عصاره *L. rubellus* دارای خواص ضد باکتریایی است و می‌تواند باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را مهار نماید (۲۳،۲۴). *L. rubellus* دارای یک پپتید ضد میکروبی به‌نام لومبریسین ۱ است که نقش حیاتی در دفاع طبیعی در برابر میکروب‌های بیماری‌زا ایفا می‌کند. این پپتید منجر به ایجاد منافذ در دیواره سلولی باکتری می‌شود. این امر باعث می‌شود که سیتوپلاسم سلول‌های باکتریایی در معرض محیط بیرون قرار گیرد و مرگ باکتری را به‌دنبال داشته باشد (۲۵). مطالعات متعددی استفاده از عصاره *L. rubellus* به‌عنوان یک داروی جایگزین برای درمان بیماری‌های عفونی مانند تب حصبه (۲۶)، عفونت پری‌آپیکال (۲۷) و پریودنتیت (۲۸) را گزارش داده‌اند. امروزه نه تنها کرم خاکی *L. rubellus*، بلکه باکتری‌های

همزیست *L. rubellus* دارای فعالیت‌های آنتی‌بیوتیکی نیز به‌عنوان دارو استفاده می‌شوند. باکتری‌های برون‌همزیست می‌توانند نقش مهمی در دفاع از میزبان خود در برابر عوامل بیماری‌زا ایفا کنند. این باکتری‌ها که روی سطح *L. rubellus* زندگی می‌کنند، می‌توانند با رقابت با عوامل بیماری‌زا برای منابع، تولید مواد ضد میکروبی یا حتی تأثیرگذاری بر پاسخ ایمنی میزبان، از او محافظت کنند (۹). بنابراین، غربالگری بیشتر باکتری‌های برون همزیست بالقوه کرم *L. rubellus* ضرورت دارد. بر اساس مشاهدات فعالیت بازدارندگی، سنجش ما نشان داد که *Peribacillus butanolivorans KG* جدا شده از باکتری‌های برون همزیست کرم خاکی *L. rubellus* قادر به مهار رشد چهار باکتری بیماری‌زا شامل باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس، اش‌ریشیاکلی و سودوموناس آئروجینوز بود. بر این اساس می‌توان بیان داشت که باکتری *Peribacillus butanolivorans KG* احتمالاً متابولیتی را تولید می‌کند که قادر به مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا می‌باشد. این با مطالعه *Fiolka* و همکاران مطابقت دارد که نشان داده‌اند یک باکتری درون همزیست جدا شده از روده میانی کرم خاکی دارای فعالیت ضد مایکوباکتریایی است و فعالیتی را در برابر چهار سویه از مایکوباکتری‌های سریع‌الرشد نشان می‌دهد (۲۹). در مطالعات دیگری نیز، دو جدایه باکتریایی از کرم *Pheretima sp* به نام‌های *Bacillus choshinensis* و *Bacillus brevis* با خاصیت ضد میکروبی گزارش شده است (۳۰،۳۱).

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، از جداسازی *Peribacillus butanolivorans KG* جدا شده از باکتری‌های برون همزیست کرم خاکی *L. rubellus*، می‌توان نتیجه گرفت که *Peribacillus butanolivorans KG* به‌طور مؤثر رشد باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس، اش‌ریشیاکلی و سودوموناس آئروجینوز را مهار می‌کند و احتمالاً پتانسیل عمل به‌عنوان آنتی‌بیوتیک را دارد. علاوه بر این، آنالیز ماهیت متابولیت‌های تولیدی *Peribacillus butanolivorans KG* و انجام مطالعات بیشتر برای بررسی

مکانیسم‌های مهار *Peribacillus butanolivorans* KG علیه باکتری‌های بیماری‌زا توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتیجه می‌گیریم که گونه *Peribacillus butanolivorans* KG جدا شده از باکتری‌های برون همزیست کرم خاکی *L. rubellus* با تولید متابولیتی دارای فعالیت‌های ضد باکتریایی است و این یافته‌ها می‌تواند به‌عنوان مبنایی برای جلوگیری از ظهور مقاومت چند دارویی و تولید عوامل ضد باکتریایی مبتنی بر محصولات طبیعی مورد استفاده قرار گیرند.

سپاس‌گزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه تحت عنوان "جداسازی باکتری مولد ترکیبات آنتی باکتریال از کرم خاکی (*Lumbricus rubellus*)" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۴۰۲ دانشگاه

آزاد اسلامی واحد خرم آباد می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم آباد انجام شده است.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط کمیته ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تایید شده است (کد اخلاق: IR.IAU.SHK.REC.1403.025).

مشارکت نویسندگان

فرهاد گیلانوند در ارائه ایده، فرهاد گیلانوند، امیر ارسلان کلاویانی‌فرد و بهروز دوستی در طراحی مطالعه، محمد بهرامی-نژاد در جمع‌آوری داده‌ها، محمد بهرامی‌نژاد و نجمه مولوی وردنجانی در تجزیه و تحلیل داده‌ها مشارکت داشته و همه نویسندگان در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

References:

- 1-Gogineni V, Chen X, Hanna G, Mayasari D, Hamann MT. *Role of Symbiosis in the Discovery of Novel Antibiotics*. J Antibiot (Tokyo) 2020; 73(8): 490-503.
- 2-Gross M. *The Race Against Antibiotics Resistance*. Current Biology 2019; 29(18): 859-61.
- 3-Engl T, Kroiss J, Kai M, Nechitaylo TY, Svatoš A, Kaltenpoth M. *Evolutionary Stability of Antibiotic Protection in a Defensive Symbiosis*. Proc Natl Acad Sci USA 2018; 115(9): E2020-29.
- 4-Zhang X, Wei W, Tan R. *Symbionts, A Promising Source of Bioactive Natural Products*. Science China Chemistry 2015; 58(7): 1097-109.
- 5-Adnani N, Rajsiki SR, Bugni TS. *Symbiosis-Inspired Approaches to Antibiotic Discovery*. Nat Prod Rep 2017; 34(7): 784-814.
- 6-Montaser R, Luesch H. *Marine Natural Products: A New Wave of Drugs?* Future Med Chem 2011; 3(12): 1475-89.
- 7-Nwankwo IU, Edward KC, Udensi CG. *Screening of Bacteria Isolates from Earthworm Cast for Antibacterial Activities*. Scientia Africana 2023; 22(2): 83-94.
- 8-Hobbelen PH, Koolhaas JE, van Gestel CA. *Bioaccumulation of Heavy Metals in the Earthworms Lumbricus Rubellus and Aporrectodea Caliginosa in Relation to Total and Available Metal Concentrations in Field Soils*. Environ Pollut 2006; 144(2): 639-46.
- 9-Ramadharr TR, Beemelmans C, Currie CR, Clardy J. *Bacterial Symbionts in Agricultural Systems Provide*

- a Strategic Source for Antibiotic Discovery*. J Antibiot 2014; 67(1): 53-8.
- 10- Saadoun I, Muhana A. *Optimal Production Conditions, Extraction, Partial Purification and Characterization of Inhibitory Compound (S) Produced by Streptomyces Ds-104 Isolate Against Multi-Drug Resistant Candida Albicans*. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy 2(2): 402-32.
- 11- Kyule DN, Maingi JM, Njeru EM, Nyamache AK. *Molecular Characterization and Diversity of Bacteria Isolated from Fish and Fish Products Retailed in Kenyan Markets*. Int J Food Sci 2022; 2022: 2379323.
- 12- Hamouda T, Shih AY, Baker JR Jr. *A Rapid Staining Technique for the Detection of the Initiation of Germination of Bacterial Spores*. Lett Appl Microbiol 2002; 34(2): 86-90.
- 13- Khatoun H, Chavan DD, Anokh A, Kalia V. *Catalase Test: A Biochemical Protocol for Bacterial Identification*. AgriCos e-Newsletter 2022; 3(1): 53-5.
- 14- Dharmappa DC, Anokhe A, Kalia V. *Oxidase Test: A Biochemical Methods in Bacterial Identification*. AgriCos e-Newsletter 2022; 3(1): 31-3.
- 15- Jain A, Jain R, Jain S. *Motility Testing–Hanging Drop Method and Stab. Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology: Principles and Techniques*. New York, NY: Springer US 2020; 121-22.
- 16- Aslanzadeh J. *Biochemical Profile-Based Microbial Identification Systems. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Boston, MA: Springer US 2006; 84-116.
- 17- Mayorga M, Rodríguez-Cavallini E, López-Ureña D, Barquero-Calvo E, Quesada-Gómez C. *Identification and Antimicrobial Susceptibility of Obligate Anaerobic Bacteria from Clinical Samples of Animal Origin*. Anaerobe 2015; 36: 19-24.
- 18- Garland JL, Mills AL. *Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization*. Appl Environ Microbiol 1991; 57(8): 2351-9.
- 19- Engl T, Kroiss J, Kai M, Nechitaylo TY, Svatoš A, Kaltenpoth M. *Evolutionary Stability of Antibiotic Protection in a Defensive Symbiosis*. Proc Natl Acad Sci USA 2018; 115(9): E2020-E2029.
- 20- Eleftherianos I, Shokal U, Yadav S, Kenney E, Maldonado T. *Insect Immunity to Entomopathogenic Nematodes and their Mutualistic Bacteria*. Curr Top Microbiol Immunol 2017; 402: 123-56.
- 21- Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS. *Insect Pathogens as Biological Control Agents: Back to the Future*. J Invertebr Pathol 2015; 132: 1-41.
- 22- Adnani N, Rajski SR, Bugni TS. *Symbiosis-Inspired Approaches to Antibiotic Discovery*. Nat Prod Rep 2017; 34(7): 784-814.
- 23- Foekh NP, Sukrama IDM, Lestari AAW. *The Ability of Earthworm Lumbricus Rubellus Extract in Slowing Down the Activation of Nfkb and TNF-A in Lipopolysaccharide-Induced Rattus Norvegicus*. Bali Med J 2019; 8(2): 439.
- 24- Sun Z. *Earthworm as A Biopharmaceutical: From Traditional to Precise*. Eur J Bio Med Res 2015; 1(2): 28.

- 25- Dadgostar P. *Antimicrobial Resistance: Implications and Costs*. Infect Drug Resist 2019; 12: 3903-10.
- 26- Lestari AAW, Made Sukrama ID, Nurmansyah D. *The Earthworm (Lumbricus Rubellus) Extract Decreased Amino Transaminase Enzyme Level and Number of Bacterial Colony in Male Wistar Rats Infected with Salmonella Typhimurium*. Biomed Pharmacol J 2019; 12(1): 325-32.
- 27- Andayani R, Mubarak Z, Rinanda DR. *Aktivitas Antibakteri Tepung Cacing Tanah (Lumbricus Rubellus) Terhadap Enterococcus Faecalis Secara In Vitro*. J Syiah Kuala Dent Soc 2016; 1(2): 201-10.
- 28- Dharmawati IGAA, Mahadewa TGB, Widyadharma IPE. *Antibacterial Activity of Lumbricus Rubellus Earthworm Extract Against Porphyromonas Gingivalis as the Bacterial Cause of Periodontitis*. Open Access Maced J Med Sci 2019; 7(6): 1032-6.
- 29- Fiołka MJ, Zagaja MP, Piersiak TD, Wróbel M, Pawelec J. *Gut Bacterium of Dendrobaena Veneta (Annelida: Oligochaeta) Possesses Antimycobacterial Activity*. J Invertebr Pathol 2010; 105(1): 63-73. doi:
- 30- Samanta TT, Das A. *Isolation, Identification, and Characterization of Gut Microflora of Perionyx Excavatus Collected from Midnapore, West Bengal*. J Basic Microbiol 2016; 56(3): 286-93.
- 31- Tikhonov V, Zavgorodnyaya J, Demin V, Byzov B. *Transformation of Soil Humic Acids by Aporectodea Caliginosa Earthworm: Effect of Gut Fluid and Gut Associated Bacteria*. European Journal of Soil Biology 2016; 75: 47-53.

Antibacterial Activity of Bioactive Compounds of *Lumbricus Rubellus* Earthworm-Ectosymbiotic Bacterium *Peribacillus Butanolivorans* KG, against Some Gram-Negative and Gram-Positive Pathogenic Bacteria

Mohammad Bahrami-Nezhad¹, Amir Arsalan Kavyanifard², Behrooz Dousti³,
Farhad Gilavand^{*4}, Najmeh Molavi Vardanjani¹

Original Article

Introduction: This study aimed to identify *Lumbricus rubellus* earthworm ectosymbionts bacteria as inhibitors of the growth of some pathogenic bacteria.

Methods: Fifty earthworms (*Lumbricus rubellus*) were collected from soil samples (5–15 cm) of agricultural farmland in Khorramabad City and were taken to the laboratory in sterile polypropylene bags. Bacteria were isolated from *Lumbricus rubellus* earthworms using nutrient agar. To assess the antimicrobial activity of the isolated strains, an agar well diffusion assay was performed against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The best isolate selected based on the zone of inhibition was subjected to further genus and species levels characterization by phylogenetic, morphological and biochemical methods.

Results: In this study, out of 14 isolated *Lumbricus rubellus* earthworm ectosymbionts bacteria, just one isolate demonstrate the ability to form an inhibition zone against all four pathogenic bacteria. Phylogenetic analysis utilizing 16S rRNA gene sequences facilitated the assignment of the analyzed bacteria to the genus *Peribacillus*. Following morphological and biochemical analyses also assigned the analyzed bacteria with the respective genus. The bacteria identified as *Peribacillus butanolivorans* KG, along with its genome sequence and its annotation information were submitted to the NCBI database by accession number OR229899. 1.

Conclusion: Antibacterial activity observed for *Peribacillus butanolivorans* KG within *Lumbricus rubellus* earthworm ectosymbionts bacteria reflects its potential as a source of new antibiotic agent.

Keywords: Ectosymbiosis, Earthworm, *Lumbricus rubellus*, *Peribacillus butanolivorans* KG.

Citation: Bahrami-Nezhad M, Kavyanifard A.A, Dousti D, Gilavand F, Molavi Vardanjani N. **Antibacterial Activity of Bioactive Compounds of *Lumbricus Rubellus* Earthworm-Ectosymbiotic Bacterium *Peribacillus Butanolivorans* KG, against Some Gram-Negative and Gram-Positive Pathogenic Bacteria.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2026; 33(10):9521-39.

¹Department of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

²Department of Biology, Faculty of Science, Payam Noor University, Tehran, Iran.

³Department of Biology, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran.

^{*}**Corresponding author:** Tel: 09163627540, email: FARHAD98@iau.ac.ir