

Isolation and screening of producing antibacterial compounds bacteria from the salt flats of Bardaskan against Drug-Resistant pathogens

Hassan Bagheri Yazdi ^{1*} , Hamed Norouzi Taheri ¹ , Hamidreza Vatanpour ² 

¹ Dept of Biology Education, Farhangian University, Tehran, Iran

² Dept of Science Education, Farhangian University, Tehran, Iran

Article Info

Article type:

Research article

Article History:

Received: Aug. 26, 2024

Received in revised form:

Dec. 07, 2024

Accepted: Jan. 12, 2025

Published Online: Apr. 16, 2025

* Correspondence to:

Hassan Bagheri Yazdi

Dept of Biology Education,
Farhangian University, Tehran,
Iran

Email:

bagheriyazdi@cfu.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: Diseases caused by drug-resistant bacteria such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* are increasing in many medical centers around the world, and researchers are looking for new natural medicinal compounds to overcome and treat these bacteria. Therefore, the current study was conducted with the aim of investigating the antimicrobial effects of native Iranian salt desert bacteria from the environment with difficult growth conditions.

Materials & Methods: The isolates were separated and examined for morphology, followed by basic biochemical tests for bacterial identification. Antibacterial activity was assessed in two stages: primary screening via cross-culture and antimicrobial tests on selected active strain extracts using the disk diffusion method. Tests were repeated three times, and growth halo diameters were measured. Finally, the antimicrobial substance production of the selected strain was quantified against MRSA using the disk diffusion method.

Results: The study isolated 30 strains from Bardaskan salt flats, with 4 identified as active isolates. One strain, N2, demonstrated strong antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, with activity increasing with concentration. Maximum antimicrobial substance production occurred 54 hours into fermentation, creating a 29 mm non-growth halo. Data analysis was conducted using Microsoft Excel V.2020.

Conclusion: Considering the strong antimicrobial activity of the bacterial extract isolated from the salt Bardaskan against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by producing, purifying, and identifying the active compounds of these isolates on an industrial scale, the possibility of introducing new antimicrobial compounds is raised.

Keywords: Antibacterial Effect, Bacterial Extract, Drug Resistance, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

How to cite this paper: Bagheri Yazdi H, Norouzi Taheri H, Vatanpour H. Isolation and screening of producing antibacterial compounds bacteria from the salt flats of Bardaskan against Drug-Resistant pathogens. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2025;33(1):40-54.

Introduction

With the increasing resistance of pathogens to antibiotic treatment, the need to provide appropriate solutions to combat the phenomenon of drug-resistant pathogens in the world is of great importance (1). This challenge has motivated researchers to search for and develop antibacterial compounds of natural origin (2). The emergence of drug resistance in strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA) has caused serious problems in hospitals (2). Hospital infections of MRSA have become a major problem in the world due to drug

resistance (5). Therefore, the need for new and effective drugs has become a major challenge in the pharmaceutical industry (8). Most of the drugs of chemical origin used in medicine have side effects; on the other hand, pharmaceutical compounds isolated from natural sources have fewer side effects. For this reason, the search for new drugs from natural environments is a priority for researchers (8). Among the bacteria isolated from the desert, *Streptomyces* produce more active compounds and have been introduced as a new source of biological metabolites in biotechnology and pharmaceuticals (13). Extensive studies are still



© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

Journal of Ilam University of Medical Sciences, Volume 33, Issue 1, 2025

being conducted to obtain new active compounds from Actinomycetes with better effects and less toxicity to the host (13). The current study was conducted with the aim of investigating the antimicrobial effects of native Iranian salt desert bacteria from the environment with difficult growth conditions.

Methods

Samples were collected from the salt flat of Bardaskan City, located south of Rahmaniah village in Shahrabad district, and stored under appropriate conditions (5°C, dry) before being transported to the laboratory. A serial dilution method was employed to isolate and purify bacteria from the samples, which were cultured on Starch Casein Agar (SCA) medium for 10 days at 28°C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains, previously isolated from clinical specimens in Mashhad and identified using the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) method, were used as test pathogens. The isolates were initially screened against MRSA using the cross-streak method on nutrient agar medium, incubated at 28°C for 3 days. The isolate N2, showing the best antimicrobial activity, was selected for further analysis. It was grown in 1000 ml of liquid Actinomycete Isolation Medium to extract antibacterial substances. Fermentation was conducted at 30°C in a shaking incubator at 190 rpm for seven days, after which the microbial suspension was centrifuged at 15,000 rpm for 10 minutes to separate the supernatant. The sensitivity of MRSA strains to the crude extract of N2 was evaluated using the disk diffusion method. This method was employed to investigate the antimicrobial activity of substances produced by N2 at different stages of its growth under fermentation conditions. The study highlights the potential of desert soil isolates in producing antimicrobial compounds effective against resistant bacterial strains.

Results

5 desert soil samples were examined from each location. Bacterial colonies appeared after 7 to 14 days. From the different samples, 30 bacterial strains were isolated on the agar surface. To identify isolates active against drug-resistant pathogens, cross-streak screening was performed among 30 strains isolated from desert soil. The results indicated that all strains had antimicrobial activity against at least one

pathogenic bacterium. Among these active isolates, 4 isolates with the best antimicrobial properties, namely N2, N15, N18, and N20, were selected for secondary screening and further work. Considering the stronger activity of the N2 isolate, it was decided to continue the next stages of the work only by working on this strain. The results indicated that the concentration of 0.5 µg/ml of the N2 extract against isolate number four (29±1.7) and MRSA (27±1.5) showed better activity than the antibiotic vancomycin (14±1.4). The highest amount of antimicrobial substance production in terms of growth inhibition zone was 54 hours after the start of fermentation, which created a growth inhibition zone of nearly 20 mm. The results show that the antimicrobial activity of the isolated crude extract was zero in the first 30 hours, and then up to 54 hours, along with bacterial growth, the amount of active metabolite production increased and reached a peak, and after that, the antimicrobial activity decreased and finally reached zero at 110 hours.

Conclusion

This study highlights the potential of indigenous strains from the desert region of Iran for the production of antimicrobial compounds against drug-resistant bacteria, particularly *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin (MRSA). The antimicrobial activity of strain N2 was confirmed, showing its ability to inhibit the growth of this resistant pathogen. Furthermore, considering the strong antimicrobial activity of these isolates, there is potential for the development of new antimicrobial compounds through the production, purification, and identification of active compounds on an industrial scale. Therefore, further studies on these compounds could contribute to the development of effective new resources for combating drug resistance.

Authors' Contribution

Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Formal Analysis, Investigation, Resources, Visualization and Data Curation: HB, HNT, HV, Supervision: HB, Writing— Original Draft Preparation: HB, HN, HV, Writing— Review & Editing: HB, HN, Project Administration: HB.

Ethical Statement

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding

This study was funded by Farhangian University (Iran).

Acknowledgment

This article is derived from a research project conducted at Farhangian University (Iran). The authors express their gratitude to as well as all the participants who contributed to the study.

جداسازی و غربالگری باکتری های تولیدکننده ترکیبات ضدباکتریایی از کفه نمکی شهرستان بردسکن علیه پاتوژن های مقاوم به دارو

حسن باقری یزدی^{۱*}، حامد نوروزی طاهری^۱، حمیدرضا وطن پور^۲

^۱ گروه آموزش زیست شناسی، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران

^۲ گروه آموزش علوم تجربی، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۰۵

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۹/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۲۳

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۱/۲۷

نویسنده مسئول:

حسن باقری یزدی

گروه آموزش زیست شناسی،

دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران

Email:
bagheriyazdi@cfu.ac.ir

مقدمه: بیماری های ایجاد شده به وسیله باکتری های مقاوم به دارو از جمله استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در بسیاری از مراکز درمانی دنیا در حال افزایش است و پژوهشگران به دنبال یافتن ترکیبات دارویی طبیعی جدید برای مقابله با این باکتری ها می باشند. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات ضد میکروبی باکتری های بومی کویر نمک ایران، با شرایط رشد افراطی انجام گرفت.

مواد و روش ها: در این پژوهش پس از نمونه گیری، جداسازی ایزوله ها انجام شد، بررسی مورفولوژی جدایه ها و تست های بیوشیمیایی اولیه برای شناسایی باکتری ها انجام شد. بررسی اثر ضد میکروبی در دو مرحله صورت گرفت. ابتدا با روش کشت کراس یا کشت متقاطع غربالگری اولیه جدایه ها از نظر فعالیت ضدباکتریایی بررسی شد. در ادامه عصاره ایزوله منتخب فعال، جداسازی و خشک شد. تست ضد میکروبی عصاره ها علیه سویه های مقاوم به دارو، به روش دیسک دیفیوژن انجام شد. هر آزمون سه بار تکرار گردید و میانگین قطر هاله عدم رشد اندازه گیری و ثبت شد. در پایان میزان تولید ماده ضدباکتریایی ایزوله منتخب در واحد زمان با روش دیسک دیفیوژن علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین تعیین گردید. آنالیز معنی داری داده ها و انحراف از میانگین با نرم افزار مایکروسافت اکسل نسخه ۲۰۲۰ انجام شد.

یافته های پژوهش: از نمونه های کفه نمکی، تعداد ۳۰ ایزوله جداسازی و شناسایی اولیه انجام شد. در غربالگری اولیه ۴ جدایه به عنوان ایزوله فعال شناسایی شدند. نتایج مرحله دوم غربالگری ایزوله منتخب نشان داد که ایزوله های فعال جدا شده، فعالیت ضدباکتریایی خوب علیه گونه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سلین داشتند. نتایج نشان داد که فعالیت ضدباکتریایی جدایه N2، با افزایش غلظت عصاره خام، بیشتر می شود. نتایج همچنین نشان داد بیشترین مقدار تولید ماده ضد میکروبی بر حسب هاله عدم رشد ۵۴ ساعت پس از شروع فرمتاسون می باشد که هاله عدم رشدی برابر با ۲۹ میلی متر علیه MRSA ایجاد کرده است.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به فعالیت ضد میکروبی قوی عصاره ایزوله منتخب از کفه نمکی شهرستان بردسکن علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین با تولید، خالص سازی، و شناسایی ترکیبات فعال این ایزوله ها در مقیاس صنعتی، امکان معرفی ترکیبات ضد میکروبی جدید مطرح خواهد شد.

واژه های کلیدی: اثر ضدباکتریایی، عصاره باکتری، مقاومت دارویی، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

استاد: باقری یزدی حسن، نوروزی طاهری حامد، وطن پور حمیدرضا. جداسازی و غربالگری باکتری های تولیدکننده ترکیبات ضدباکتریایی از کفه نمکی شهرستان بردسکن علیه پاتوژن های مقاوم به دارو. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، فروردین ۱۴۰۴؛ ۳۳(۱): ۴۰-۵۴.

مقدمه

با افزایش مقاومت پاتوژن ها به درمان توسط آنتی بیوتیک ها نیاز به ارائه راهکار مناسب برای مقابله با پدیده پاتوژن های مقاوم به دارو در جهان از اهمیت زیادی برخوردار است (۱، ۲). این چالش باعث ایجاد انگیزه ای برای جستجو و ارایه ترکیبات ضد باکتریایی با منشاء طبیعی برای محققان فراهم آورده است (۳، ۴). در دنیا ترکیبات فعال با منشاء طبیعی به منظور درمان برخی بیماری ها به خصوص بیماری های عفونی، اسهال، تب، سرماخوردگی و بهداشت دهان و دندان مورد استفاده قرار می گیرند. در سال های اخیر به دلیل نیاز به داروهای جدید در درمان بیماری ها، به خصوص مقابله با پاتوژن های مقاوم به دارو، باکتری های کویر به عنوان منبع جدید با پتانسیل بالا در تولید متابولیت های فعال، مورد توجه قرار گرفته اند (۵، ۶، ۷). بروز مقاومت دارویی در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس و انتروکوک باعث بروز مشکلات جدی در بیمارستان ها شده است. عفونت های بیمارستانی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین به علت مقاومت دارویی به یک مشکل عمده در جهان تبدیل شده است. لذا نیاز به داروهای جدید و موثر به یک چالش اصلی، در صنعت داروسازی تبدیل شده است اغلب داروها با منشا شیمیایی مورد استفاده در علم پزشکی دارای اثرات جانبی هستند از طرفی ترکیبات دارویی جدا شده با منشا طبیعی اثرات جانبی کمتری دارند. به همین دلیل جستجو برای داروهای جدید از محیط های طبیعی اولویت پژوهشگران می باشد (۸، ۹).

ترکیبات جدا شده از میکروارگانیسم ها از گذشته تا به امروز مورد توجه بوده است و مطالعات زیادی برای استفاده از این ترکیبات در درمان بیماری های عفونی انجام شده است. متابولیت های ثانویه زیادی توسط میکروارگانیسم های شرایط سخت (اکستروفیل) تولید می شود که در این بین باکتری های کویر قابلیت بالایی در تولید متابولیت های ثانویه فعال دارند (۱۰، ۱۱). تعداد زیادی از این ترکیبات تولید شده توسط اکستروفیل های کویر به عنوان منابع جدید دارویی در نظر گرفته می شوند (۴).

در بین باکتری های جدا شده از کویر ،

استرپتومایسس ها ترکیبات فعال بیشتری تولید می کنند و به عنوان یک منبع جدید از متابولیت های زیستی در بیوتکنولوژی و داروسازی معرفی شده اند (۱۳، ۱۴). هنوز هم مطالعات گسترده ای برای به دست آوردن ترکیبات فعال جدید از اکتینومیست ها با اثرات بهتر و سمیت کمتر بر میزبان، در حال انجام است (۱۵ و ۱۶).

با توجه به موارد فوق تحقیقات پیوسته برای کشف ترکیبات جدید ضد میکروبی علیه باکتری های مقاوم به دارو ادامه دارد. یکی از منابع مهم دارو، سویه های باکتریایی بومی ایران هستند که در پژوهش های مختلف بررسی شده است. در کشور ما مطالعات زیادی برای جداسازی ترکیبات باکتری با فعالیت ضد میکروبی از مناطق مختلف گزارش شده است. اما تاکنون هیچ مطالعه ای روی باکتری های کفه نمکی شهرستان بردسکن با هدف بررسی اثرات ضد باکتریایی علیه پاتوژن های مقاوم به دارو صورت نگرفته است. هدف از این تحقیق جداسازی و غربالگری باکتری های تولیدکننده ترکیبات ضد باکتریایی از کفه نمکی با فعالیت ضد باکتریایی، علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) و تعیین نقطه بهینه تولید ترکیبات ضد میکروبی می باشد.

مواد و روش ها

نمونه برداری

جمع آوری نمونه از کفه نمکی شهرستان بردسکن با موقعیت جغرافیایی ۱۲ کیلومتری جنوب روستای رحمانیه در بخش شهرآباد که از سطح دریاها آزاد ۸۰۵ متر ارتفاع و وسعت تقریبی ۷۸۸۸ هکتار که با جهتی شمال شرقی - جنوب غربی در جنوب شهرستان بردسکن واقع شده انجام شد. تعداد ۳ ایستگاه نمونه برداری تعیین گردید. نمونه ها پس از برداشت، در شرایط مناسب (دمای ۵ درجه و خشک) نگهداری و به آزمایشگاه منتقل گردید.

جداسازی و خالص سازی باکتری

جهت جداسازی و خالص سازی جدایه ها از نمونه های کویر، از روش سریال رقت استفاده شد. یک لوپ از هر نمونه در محیط کشت استارچ کازئین آگار (SCA) که

شدند. پلیت‌ها مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد، گرماگذاری شدند. سپس هاله‌ی عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. بهترین سویه‌ها از نظر فعالیت ضدباکتریایی برای مرحله بعد انتخاب شدند (۱۴ و ۱۲).

استخراج متابولیت‌های ایزوله منتخب

یکی از ایزوله‌های منتخب (N2) که دارای بهترین فعالیت در مرحله‌ی غربالگری اولیه بود جهت استخراج متابولیت‌های ضدباکتریایی، در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع Actinomycete Isolation Medium (شامل ۱۵ گرم آگار، ۵ گرم گلیسرول، ۴ گرم سدیم پروپیونات، ۲ گرم سدیم کازئینات، ۰/۵ گرم پتاسیم فسفات، ۰/۱ گرم آسپارژین، ۰/۱ گرم مزیم سولفات، ۰/۰۰۱ گرم سولفات آهن) کشت داده شدند (۱۲). برای تولید ترکیبات ضد میکروبی، ارلن‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه شیکردار با سرعت ۱۹۰ دور بر دقیقه قرار داده شدند. پس از هفت روز، سوسپانسیون میکروبی با سرعت ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و سپس مایع بالایی جداسازی شد. با توجه به حلالیت ترکیبات ضد میکروبی در حلال‌های آلی، برای استخراج متابولیت‌های ثانویه ضدباکتریایی از حلال آلی اتیل استات استفاده شد (۱۶). برابر حجم سوپرناتانت استخراج شده از هر سویه، اتیل استات به آن اضافه شد. فاز آلی دارای ترکیبات فعال، توسط دکانتور جدا و به کمک روتاری تغلیظ شد. سپس عصاره خشک شد و از عصاره‌ی خام استخراج شده برای بررسی فعالیت ضد میکروبی سویه‌های مقاوم به دارو استفاده شد (۱۷).

اثرات ضد باکتریایی عصاره خام سویه منتخب علیه پاتوژن مقاوم به دارو

برای تعیین حساسیت سویه‌های باکتری مقاوم نسبت به عصاره خام سویه N2 از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا از سویه‌های MRSA سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند 1.5×10^8 cfu/ml-1 تهیه شد و کشت چمنی بر سطح محیط کشت مولر هیتون آگار داده شد. در ادامه ۴۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره خام باکتری (۰.۵ تا ۰.۱ میلی گرم بر میلی لیتر) تهیه شده بر روی

محتوی ۱۵ گرم آگار، ۱۰ گرم نشاسته محلول، ۲ گرم پتاسیم فسفات، ۲ گرم پتاسیم نیترات، ۲ گرم سدیم کلرید، ۰/۳ گرم کازئین، ۰/۰۵ گرم مزیم سولفات ۷ آب، ۰/۰۲ گرم کلسیم کربنات، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن ۷ آب در pH ۷/۵ می‌باشد، به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۸ درجه کشت داده شدند. پس از رشد، خالص سازی کلنی‌ها در همین محیط کشت انجام شد. برای مراحل بعد کلنی‌های خالص هر ایزوله در سطح شیب‌دار همین محیط کشت رشد داده و در دمای ۴ درجه نگهداری شدند (۱۵).

تهیه سویه‌های تست میکروبی

در این پژوهش از سویه‌های استاندارد شامل سالمونلا تیفی ATCC 3311، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین ATCC 33591، سودوموناس آئروجینوزا ATCC 2108، کلبسیلا پنومونیه ATCCV0603 اشریشیا کولی ATCC25922 باسیلوس سوبتلیس ATCC 2118 توسط آزمایشگاه کنترل میکروبی دانشکده داروسازی مشهد استفاده شد. سویه‌ها در محیط کشت نوترینت آگار (مرک آلمان) در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند و جهت انجام مراحل بعدی استفاده شدند. باکتری‌های مقاوم مورد استفاده سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین بود که از نمونه‌های بالینی و از بیماران در شهر مشهد جدا شده بودند. این باکتری‌ها در پژوهش‌های قبل با استفاده از روش موسسه استاندارد‌های کلینیکی و آزمایشگاهی (CLSI) شناسایی و به بخش میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انتقال یافت (۱۳).

بررسی اثرات ضد میکروبی سویه‌ها

غربالگری اولیه جهت شناخت ایزوله‌های فعال برای غربالگری اولیه ایزوله‌ها علیه پاتوژن‌ها از روش کشت متقاطع استفاده شد. بدین صورت که هر سویه در مرکز پلیت حاوی محیط کشت نوترینت آگار به صورت یک خط مستقیم کشت داده شد و بعد پلیت‌ها به مدت ۳ روز در ۲۸ درجه‌ی سانتیگراد گرماگذاری شدند. سویه‌های بیماریزا مورد مطالعه به صورت یک خط عمود بر خط اصلی، کشت داده

دیسک کاغذی بلانک (پادتن طب) قرار داده شد. دیسک ها پس از خشک شدن با فاصله معین بر روی پلیت ها قرار گرفته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرما گذاری شد. در نهایت قطر هاله عدم رشد به وسیله خط کش میلی متری در سه جهت اندازه گیری و ثبت گردید. در این تست از دیسک حاوی اتیل استات (حلال عصاره) به عنوان کنترل منفی و ونکومایسین به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. برای حصول اطمینان این آزمایش برای هر سویه باکتری سه بار تکرار گردید و میانگین قطر هاله در سه بار به عنوان قطر نهایی ثبت شد (۱۵-۱۸).

تولید ماده ضد میکروبی در واحد زمان

اندازه گیری مقدار تولید ماده ضد میکروبی در زمان های مختلف رشد باکتری N2 در شرایط فرمانتاسیون با استفاده از روش انتشار دیسک دیفیوژن بر روی باکتری MRSA بررسی شد. ابتدا از سوسپانسیون سویه N2 که ۲۴ ساعت رشد کرده اند به محیط کشت فرمانتاسیون (شامل ۵ گرم گلیسرول، ۴ گرم سدیم پروپیونات، ۲ گرم سدیم کازینات، ۰/۵ گرم پتاسیم فسفات، ۰/۱ گرم آسپارژین، ۰/۱ گرم متزیم سولفات، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن) به میزان ۵٪ حجم کل تلقیح شد. ارلن فاقد باکتری تلقیح شده به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. ارلن ها در دمای ۲۸ درجه ی

سانتیگراد به مدت ۱۰ روز گرماگذاری شدند. در طول این مدت در بازه های زمانی ۸ ساعته ارلن ها در شرایط استریل نمونه گیری شد و پس از ساتریفیوژن، از مایع بالایی بر روی باکتری MRSA تست ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوژن انجام شد. هر تست با سه بار تکرار صورت گرفت و ارتباط تولید ماده ضد میکروبی با رشد باکتری در واحد زمان به صورت یک نمودار گزارش شد (۲۰-۱۹). در این پژوهش آنالیز های آماری لازم به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شد.

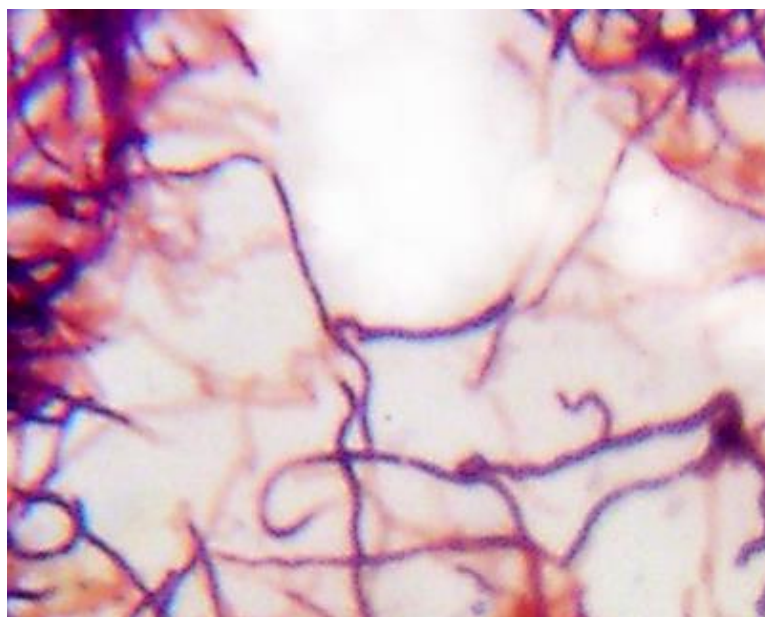
یافته های پژوهش

جداسازی و خالص سازی جدایه ها:

در این پژوهش از هر نقطه، تعداد ۵ نمونه خاک کویر بررسی شد. کلنی های باکتری پس از ۷ تا ۱۴ روز نمایان شد. از بین نمونه های مختلف، تعداد ۳۰ سویه باکتری، در سطح آگار جداسازی شدند. رنگ پشت و روی کلنی، سطح کلنی، شکل میکروسکوپی و دیگر خصوصیات مورفولوژیکی کلنی ها بررسی شد. سویه های N2, N12, N18, N20 و N25 اسپور تولید کرده و بقیه ی سویه ها اسپور تولید نمی کنند (جدول ۱). در شکل ۱ نتایج رنگ آمیزی سویه و بررسی میکروسکوپی و اسپورها در شکل ۲ نشان داده شده است. شکل ۳ نتایج فعالیت آنزیمی سویه منتخب را نشان می دهد.

جدول شماره ۱. ویژگی های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی ایزوله های اسپورزا

نام سویه ها	وضعیت اسپور	شکل انشعابات اسپور	رنگ پشت کلنی	رنگ سطح کلنی	آزمایش پروتئاز	آزمایش آمیلاز	آزمایش کاتالاز	تولید پیگمان
N2	منفرد	Simple (rectus)	سفید	خاکستری	+	-	+	+
N12	زنجیره ای	Simple (retinaculum-apertum)	طوسی	سفید	+	+	+	+
N18	منفرد	Simple (rectus)	سفید	طوسی	+	+	+	+
N20	زنجیره ای	Vertiucellate (Monoverticillus)	سفید	خاکستری	+	+	-	+
N25	منفرد	Simple (Rectus)	خاکستری	طوسی	-	+	+	+



شکل شماره ۱. رنگ آمیزی و تصویر میکروسکوپی جدایه N2 جدا شده از خاک کویر



شکل شماره ۲. جدایه N2 جدا شده از خاک کویر: رنگ و شکل کلنی رشد کرده روی محیط کشت اختصاصی SCA



شکل شماره ۳. تست پروتئاز ایزوله N2 جدا شده از خاک کویر

غربالگری اولیه جهت شناخت جدایه‌های فعال

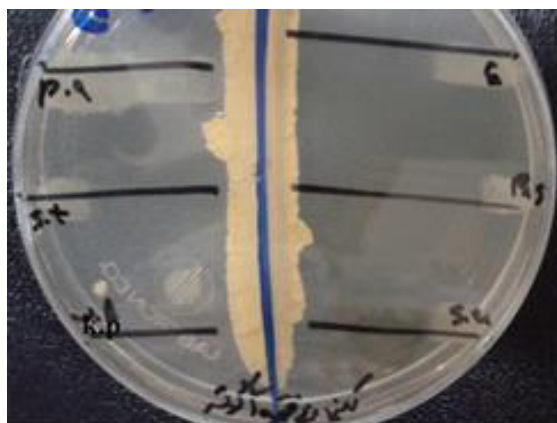
برای شناسایی ایزوله‌های فعال علیه پاتوژن‌های مقاوم به دارو، از بین ۳۰ سویه‌ی جدا شده از خاک کویر، غربالگری باروش Cross Streak انجام شد (شکل ۴). نتایج نشان داد همه سویه‌ها دارای فعالیت ضد میکروبی علیه حداقل یک باکتری پاتوژن بودند. نتایج فعالیت ضد باکتریایی حاصل از غربالگری

اولیه در جدول ۲ نشان داده شده است. از بین این جدایه‌های فعال، تعداد ۴ جدایه با بهترین خاصیت ضد میکروبی به نام‌های N2، N15، N18 و N20 برای غربالگری ثانویه و ادامه‌ی کار انتخاب شدند. با توجه به فعالیت قوی تر جدایه N2 تصمیم گرفته شده مراحل بعدی کار تنها با کار روی این سویه ادامه پیدا کند (۱۳).

جدول شماره ۲. غربالگری اولیه ایزوله‌های جدا شده از خاک کفه نمکی با روش cross-streak

Isolates	Test bacteria					
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>K. pneumonia</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhi</i>	<i>P. aeruginos</i>
N1	-	+	-	+	-	+
N2	+	+	+	+	+	+
N3	-	+	+	-	+	+
N4	+	-	-	+	-	+
N5	+	+	-	+	-	-
N6	-	+	-	+	-	+
N7	-	+	-	+	-	+
N8	+	+	-	+	-	+
N9	-	+	-	+	-	+
N10	-	+	-	+	-	+
N11	+	+	+	+	+	+
N12	+	+	+	+	+	-
N13	+	-	+	+	+	+
N14	+	+	+	-	+	+
N15	+	+	+	+	+	-
N16	+	+	+	+	+	+
N17	+	-	-	+	-	+
N18	+	+	+	+	+	+
N19	-	-	+	-	-	+
N20	+	+	+	+	+	+
N21	-	-	+	+	+	-
N22	+	-	+	-	-	-
N23	-	-	-	+	-	+
N24	+	+	+	-	+	+
N25	-	-	-	+	+	-
N26	-	+	+	+	+	+
N27	+	+	+	+	-	-
N28	+	+	-	+	+	+
N29	+	+	+	-	-	-
N30	-	+	-	+	-	-

(+) دارای تاثیر و (-) فاقد تاثیر ضد باکتریایی

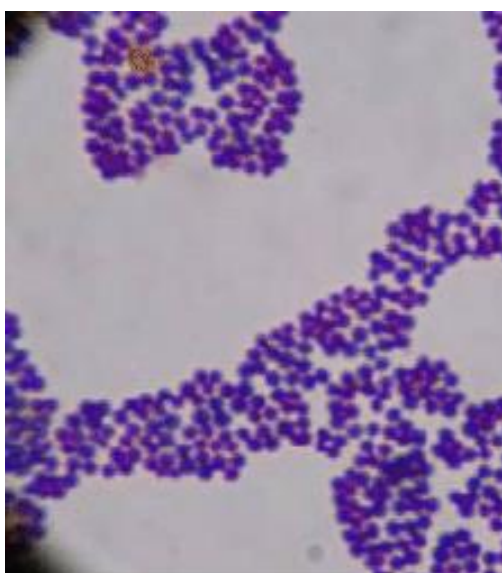


شکل شماره ۴. تصویر غربالگری اولیه جدایه N2 جدا شده از خاک کویر

کمک میکروسکوپ نوری بررسی شد. با بررسی نتایج مشخص شد که سویه ها، متعلق به سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و خالص می باشند و مورد تایید بخش کنترل کیفی قرار گرفت (شکل ۵).

مورفولوژی سویه مقاوم به دارو

وضعیت مورفولوژی کلنی ها و شکل میکروسکوپی سویه های مقاوم به دارو با روش کمک رنگ آمیزی گرم با

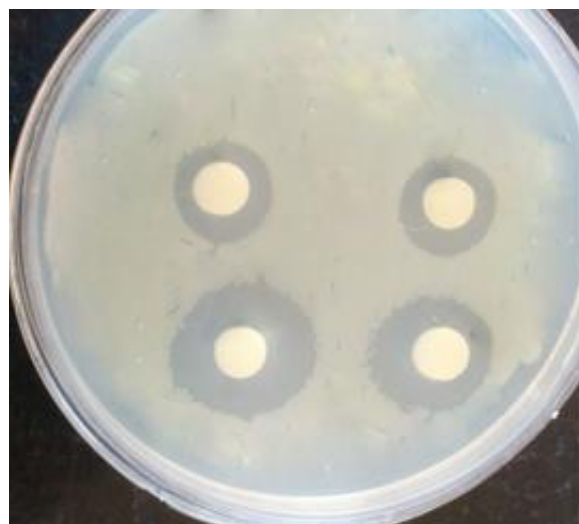


شکل شماره ۵. شکل باکتری مقاوم به دارو در زیر میکروسکوپ نوری

استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران بررسی شد (شکل ۶). نتایج نشان داد غلظت 0.5 میکروگرم بر میلی لیتر عصاره علیه ایزوله شماره چهار $(29 \pm 1/7)$ و MRSA (27 ± 1.5) فعالیت بهتری نسبت به آنتی بیوتیک وانکومایسین $(1 \pm 14/4)$ و سایر غلظت ها نشان دادند (جدول ۳).

فعالیت عصاره خام ایزوله N2 علیه استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به متی سیلین (MRSA)

فعالیت ضدباکتریایی عصاره خام جدایه منتخب با استفاده از روش دیسک دیفیوژن علیه سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) و ۵ جدایه



شکل شماره ۶. فعالیت ضد میکروبی جدایه منتخب علیه MRSA

جدول شماره ۳. فعالیت ضد باکتریایی عصاره خام ایزوله منتخب علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) و استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران به روش دیسک دیفیوژن

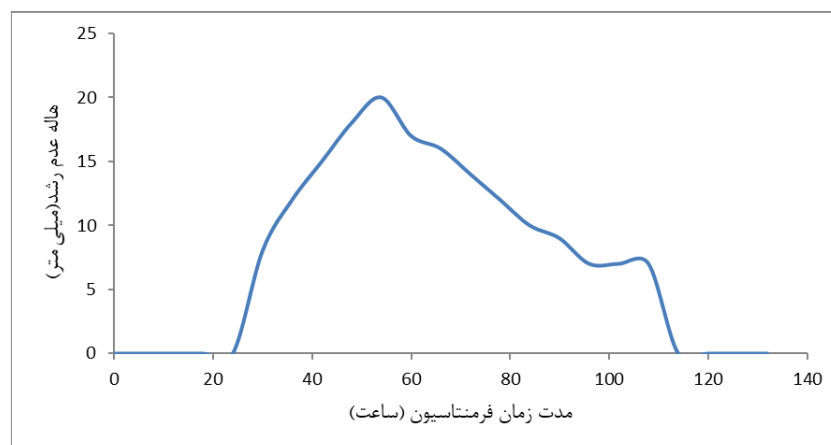
باکتری‌های تست شده	هاله عدم رشد بر حسب میلی متر					
	غلظت ۰.۵	غلظت ۰.۴۰	غلظت ۰.۳۰	غلظت ۰.۲۰	غلظت ۰.۱۰	کنترل منفی
MRSA	۲۶±۱/۵	۲۲±۱/۲	۱۲±۱/۵	۱۶±۱/۷	۱۱±۱/۷	ب.ا
S.aureus 1	۲۴±۱/۵	۱۹±۱/۵	۱۵±۱/۷	۱۰±۱/۵	ب.ا	ب.ا
S.aureus 2	۲۵±۱/۷	۱۸±۱/۵	۹±۱/۷	۱۱±۱/۵	ب.ا	ب.ا
S.aureus 3	۲۲±۱/۵	۱۱±۱/۴	۱۱±۱/۷	۱۰±۱/۵	ب.ا	ب.ا
S.aureus 4	۲۹±۱/۷	۲۱±۱/۵	۱۸±۱/۴	۱۴±۱/۴	۱۰±۱/۵	ب.ا
S.aureus 5	۲۳±۱/۷	۱۴±۱/۷	۱۰±۱/۷	۹±۱/۵	ب.ا	ب.ا

ب.ا: بدون اثر

تولید ماده ضد میکروبی توسط جدایه N2 در واحد زمان

میزان تولید ماده فعال بر علیه میکروب MRSA با نمونه گیری از سوسپانسیون ایزوله در حال رشد در محیط مایع فرمتاسیون در واحد زمان مورد بررسی قرار گرفت. همان طور که در شکل (۷) دیده می شود بیشترین مقدار تولید ماده ی ضد میکروبی بر حسب هاله عدم رشد ۵۴ ساعت پس از شروع

فرمتاسون می باشد که هاله ی عدم رشدی نزدیک به ۲۰ میلی متر ایجاد کرده است. نتایج نشان می دهد فعالیت ضد میکروبی عصاره خام جدا شده در ۳۰ ساعت اول صفر بوده و سپس تا ۵۴ ساعت هم زمان با رشد باکتری میزان تولید متابولیت فعال روند افزایشی داشته و به اوج می رسد و پس از آن فعالیت ضد میکروبی روندی کاهشی داشته و در نهایت در زمان ۱۱۰ ساعت به بعد به صفر می رسد.



شکل شماره ۷. ارتباط تولید ماده ضد میکروب MRSA با رشد سویه ی N2 در واحد زمان

فعال، مطالعه حاضر با هدف جداسازی و بررسی فعالیت ضد میکروبی ترکیبات فعال تولید شده توسط این سویه ها می باشد. در این تحقیق جداسازی ایزوله های فعال، استخراج متابولیت های سویه منتخب، غربالگری ثانویه با تست عصاره خام روی سویه مقاوم به آنتی بیوتیک، بررسی میزان تولید سویه منتخب و شناسایی مورفولوژیکی کلنی های مقاوم به دارو انجام شد.

در مطالعه عبیدی و همکاران در سال ۱۳۹۰، از بین ۱۱۰ نمونه خاک، تعداد ۳۱۰ ایزوله جدا شد که ۴۴ سویه فعالیت ضد میکروبی در غربالگری اولیه نشان دادند (۲۲). هم چنین در مطالعه مشابه دهناد و همکاران در سال ۱۳۸۸ در ایران از بین ۱۵۰ اکتینومیست جدا شده از محیط های خاکی، تعداد ۱۲ سویه دارای فعالیت ضد باکتریایی داشتند (۲۴). در مطالعه مشابه دیگر Sudha Kalyani و همکاران (۲۰۱۹)، تعداد ۹ نمونه خاک برای جستجوی اکتینومیست مورد مطالعه قرار گرفت که ۱۴۲ سویه جداسازی شد. از میان این سویه ها، تعداد ۶ سویه دارای فعالیت ضد میکروبی داشتند (۲۵). در تحقیق حاضر، از نمونه های کفه نمکی تعداد ۳۰ ایزوله جداسازی شد که همه ایزوله ها حداقل توانایی مهار یک پاتوژن را داشتند. با مقایسه نتایج این پژوهش و سایر مطالعات انجام شده، تعداد سویه های جدا شده با فعالیت ضد میکروبی اولیه جالب توجه است. در مطالعه پژوهشی Al-Joubori و همکاران در سال ۲۰۲۳ توانستند سویه استریپتومایسی را از خاک امارات جداسازی کنند که دارای فعالیت ضد باکتریایی بود که این نتایج، مشابه یافته های پژوهش حاضر است (۴).

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه سعی شد برای اولین بار سویه های بومی منطقه کویری ایران برای تولید ترکیبات ضد میکروبی علیه باکتری های مقاوم به دارو مطالعه و بررسی گردد. اهمیت انتخاب سویه مقاوم برای این پژوهش در حوزه سلامت و بهداشت بسیار بالا است. ایجاد و گسترش گونه های مقاوم میکروبی در سراسر جهان باعث می شود درمان بیماری های ایجاد شده توسط سویه های مقاوم در دنیا با مشکل مواجه شود. جهت حل این مشکل در دنیا نیاز به ترکیبات فعال جدید است که یکی از ابزارها و منابع موجود برای تولید آنتی بیوتیک های جدید ترکیبات طبیعی مثل باکتری های تولید کننده متابولیت های ثانویه بومی کشور است. با توجه به این که باکتری های اکستروموفیل موجود در کویر توانایی تولید متابولیت های فعال زیادی دارند و از طرفی شرایط خاص محیط انتخاب شده جداسازی سویه های بومی مناطق کویر شرقی ایران در این پروژه انتخاب شد.

در سال های اخیر مطالعات در زمینه جداسازی و شناسایی ترکیبات فعال از مناطق مختلف ایران گزارش شده است. در مطالعات قبلی، اغلب اثرات ضد میکروبی بروی پاتوژن های غیر مقاوم صورت گرفته است (۱۹-۲۲). بررسی این منابع و داده ها نشان می دهد تا کنون مطالعه روی باکتری های کفه نمکی برای جداسازی ترکیبات فعال علیه پاتوژن های مقاوم به دارو انجام نشده است (۲۱-۲۳). لذا با توجه به اهمیت باکتری های اکستروموفیل در زمینه تولید ترکیبات

روش انتخابی ما برای بررسی فعالیت ضد میکروبی ایزوله ها روش دیسک گذاری جهت تعیین سویه منتخب بود. در مطالعه Kumar و همکاران در سال ۲۰۱۴ در هند اثرات ضد باکتریایی سویه های جدا شده از خاک را با روش دیسک دیفیوژن بررسی کردند و نشان دادند بیشترین قطر هاله عدم رشد در برابر استافیلوکوکوس اورئوس ۱۶ میلی متر می باشد در حالی که در این پژوهش قطر هاله عدم رشد در برابر این باکتری ۲۹ میلی متر ثبت شد (۱۰). در یک مطالعه دیگر Sudha Kalyani و همکاران در سال ۲۰۱۹ فعالیت ضد میکروبی سویه های استرپتومایسس اکسترموفیل را بررسی کردند و بیشترین قطر هاله عدم رشد را ۱۰ میلی متر ثبت کردند (۲۷) در حالی که میزان مهار کنندگی عصاره خام سویه ما علیه سویه های مختلف MRSA، در غلظت های مختلف بدست آمده بیشتر از این عدد بوده که در مقایسه با این دو پژوهش فعالیت ضد میکروبی بهتری نشان داد.

در پژوهش انجام شده توسط ذاکر و همکاران در سال ۱۳۹۳، نشان دادند که باکتری های کویر لوت به عنوان منبع بیواکتیوهای فعال علیه باکتریهای بیمارزا می باشند (۲۶). در پژوهش حاضر فعالیت ضد میکروبی عصاره خام سویه N2 ثابت شد و نتایج نشان داد غلظت های مختلف عصاره سویه، مهار کنندگی رشد خوبی علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم دارند.

در مطالعات قبلی، اغلب سویه های تولید کننده از خاک های مناطق مختلف جدا شدند. در این تحقیق به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی میکروارگانیسم های بومی ایران، برای اولین بار از رسوبات کفه نمکی، باکتری ها جداسازی و مطالعه شدند. نتایج نشان داد که خاک کفه نمکی شهرستان بردسکن می تواند به عنوان منبع غنی از باکتری های فعال که توانایی تولید متابولیت های ضد باکتریایی جدید را دارند، مورد مطالعه دقیق تری در پژوهش های آینده قرار گیرد. بنابراین با استخراج، خالص سازی و مطالعه دقیق تر متابولیت های فعال باکتری های کفه نمکی، بتوان آنتی بیوتیک های جدید و مناسب برای درمان بیماری های عفونی ناشی از میکروارگانیسم های مقاوم، معرفی کرد.

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، و مقایسه آن با مطالعات مشابه در این زمینه می توان گفت که عصاره خام ایزوله منتخب می تواند به عنوان یک منبع از ترکیبات ضد میکروبی جدید علیه استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سلین مورد مطالعه دقیق تری قرار گیرد.

سپاس گذاری

این مقاله مستخرج از طرح پژوهشی می باشد که بدین وسیله از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه فرهنگیان و مدیر محترم امور پردیس های دانشگاه فرهنگیان خراسان رضوی به دلیل تأمین هزینه های مالی و پشتیبانی تجهیزات و امکانات تشکر به عمل می آید.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می دارند که هیچ گونه تعارض منافی در این پژوهش وجود نداشته است.

کد اخلاق

با توجه به استفاده نکردن از نمونه انسانی- حیوانی، نیاز به تهیه کد اخلاق نبود.

حمایت مالی

دانشگاه فرهنگیان حامی مالی این پژوهش بوده است.

مشارکت نویسندگان

طراحی ایده: حسن باقری یزدی، حامد نوروزی طاهری

روش کار: حامد نوروزی طاهری، حسن باقری یزدی
جمع آوری داده ها: حامد نوروزی طاهری
تجزیه و تحلیل داده ها: حسن باقری یزدی، حمید رضا وطن پور

نظارت: حسن باقری یزدی
مدیریت پروژه: حسن باقری یزدی

نگارش پیش نویس اصلی: حسن باقری یزدی، حامد نوروزی طاهری، حمید رضا وطن پور

نگارش، بررسی و ویرایش: حسن باقری یزدی، حامد نوروزی طاهری.

References

1. Mozaffarian V. Compositae (Anthemideae & Ehinopeae) no. 59. Tehran: Research Institute of Forest and Rangelands. Flora of Iran. 2008; pp. 199-261.
2. Bagheri yazdi H, Norouzi taheri H. Antimicrobial Effects of Aqueous-Alcoholic Extract of *Artemisia Turanica* against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): An in vitro Study. J Ilam Uni Med Sci. 2022; 30:1-7. doi: 10.52547/sjimu.30.2.1.
3. Mozaffarian V. A Dictionary of Iranian Plant Names. Tehran, Iran: Farhang Moaser; 1998.
4. Siti Junaidah A, Suhaini S, Mohd Sidek H, Basri D F, Zin N M. Anti-Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* Activity and Optimal Culture Condition of *Streptomyces* sp. SUK 25. Jundishapur J Microbiol. 2015;8: e16784. doi: 10.5812/jjm.16784.
5. Tan RX, Tang HQ, Hu J, Shuai B. Lignans and sesquiterpene lactones from *Artemisia sieversiana* and *Inula racemosa*. Phytochemistry. 1998; 49:157-161. doi: 10.1016/s0031-9422(97)00889-3.
6. Bora KS, Sharma A. The genus *Artemisia*: a comprehensive review. Pharm Biol. 2011; 49:101-109. doi: 10.3109/13880209.2010.497815.
7. Ellis MD, Baxendale FP. Toxicity of seven monoterpenoids to tracheal mites (Acari: Tarsonemidae) and their honey bee (Hymenoptera: Apidae) hosts when applied as fumigants. J Econ Entomol. 1997; 90:1087-91. doi: 10.1093/jee/90.5.1087.
8. Al-Haj NA, Mashan NI, Shamsudin MN, Mohamad H, Vairappan CS, Sekawi Z. Antibacterial activity in marine algae *Eucheumad enticulatum* against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. Res J Biol Sci. 2009; 4:519-24.
9. Shopsin B, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis. 2001; 7:323-6. doi: 10.3201/eid0702.010236.
10. Saravana Kumar P, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S. Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA 7. Kaohsiung J Med Sci. 2014; 30:435-46. doi: 10.1016/j.kjms.2014.05.006.
11. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev. 1997; 10:505-20. doi: 10.1128/CMR.10.3.505.
12. Mansouri S, Khaleghi M. Antibacterial resistance pattern and frequency of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* isolated from different sources in southeastern Iran. Iran J Med Sci. 1997; 22:93-96.
13. Dulger B, Gonuz A. Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional medicine. Asian J Plant Sci. 2004; 3: 104-107. doi: 10.3923/ajps.2004.104.107.
14. Murphy Cowan M. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin Microbiol Rev. 1999; 12: 564-82. doi: 10.1128/CMR.12.4.564.
15. Norouzi H, Rabbani khorasgani M, Danesh A. Anti-MRSA activity of a bioactive compound produced by a marine *Streptomyces* and its optimization using statistical experimental design. Iran J Basic Med Sci. 2019; 22: 1073-84. doi: 10.22038/ijbms.2019.33880.8058.
16. Juteau F, Masotti V, Bessiere JM, Dherbomez M, Viano J. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. Fitoterapia. 2002; 73:532-5. doi: 10.1016/s0367-326x(02)00175-2.
17. Andrews J. for the BSAC Working Party on Susceptibility Testing, BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 7). J Antimicrob Chemother. 2008; 62: 256-78. doi: 10.1093/jac/dkn194.
18. Nostro A, Ger MP, Angelo VD, Cannatelli MAC. Extraction methods and bioautography for evaluation plant antimicrobial activity. Lett Appl Microbiol. 2000; 15:379-85. doi: 10.1046/j.1472-765x.2000.00731.x.
19. Salar Bashi D, Attaran Dowom S, Fazly Bazzaz BS, Khanzadeh F, Soheili V, Mohammadpour A. Evaluation, prediction and optimization the ultrasound-assisted extraction method using response surface methodology: antioxidant and biological properties of *Stachys Parviflora* L. Iran J Basic Med Sci. 2016;19: 529-41.
20. Nasirpour M, Yavarmanesh M, Mohhamadi Sani A, Mohamdzade Moghadam M. Antibacterial effect of aqueous extract of *Artemisia aucheri*, *Artemisia sieberi* and *Hyssopus officinalis* L. on the food borne pathogenic bacteria. FSCT. 2015; 12:73-84.
21. Soheili V, Khedmatgozar Oghaz N, Sabeti Z, Fazly Bazzaz BS. The novel effect of cis-2-decenoic acid on biofilm producing *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Res. 2016; 6: 1. doi:10.4081/mr.2015.6158.
22. Abdi K, Dehnad R, Mosai J, Rahmani T. Screening of Actinobacteria for Antimicrobial Compounds. Res J Microbiol. 2011; 6: 385-93.
23. Boyle VJ, Fancher ME, Ross RW. Rapid, modified Kirby-Bauer susceptibility test with single, high concentration antimicrobial disks. Antimicrob Agents Chemother. 1973; 3: 418-24. doi: 10.1128/AAC.3.3.418.

24. Ashrafpour M, Rezaei H, Sefidgar A, Baradaran M, Sharifi H. Survey of the antibacterial properties of aqueous ethanolic and methanolic extraction of *Artemisia annua* around the city of Babol. *J Ilam Uni Med Sci*. 2015; 23:129-41.
25. Kalyani BS, Krishna PS, Sreenivasulu K. Screening and identification of novel isolate *Streptomyces* sp. NLKPB45 from Nellore coastal region for its biomedical applications. *Saudi J Biol Sci*. 2019; 26:1655-60. doi: 10.1016/j.sjbs.2018.08.027.
26. Zaker B, Hashemi Sh. Isolation of actinomycetes from Lut desert soil as a source of active bioactives against bacteria. *NCMBJ*. 2013; 4:1.
27. Al-Joubori B, Saadoun I, Hotchin N, Cunningham D. The isolation of novel terrestrial *Streptomyces* strains with antimicrobial and cytotoxic properties. *Arab J Basic Appl Sci*. 2023;30:285-98. doi: 10.1080/25765299.2023.2207957.