

تعیین شرایط بهینه تولید ماده ضد میکروبی توسط *Alcaligenes faecalis* جدا شده از خاک های آلوده به نفت به روش سطح پاسخ

محمد یعقوبی آوینی^{۱*}، غلامحسین ابراهیمی پور^۲، علیرضا قاسمپور^۳

تاریخ دریافت ۹۳/۱/۱۷

تاریخ تصویب ۹۳/۱۱/۲۷

چکیده

ظهور مقاومت های دارویی در بین میکروارگانیسم های بیماریزا نشان دهنده نیاز به کشف آنتی بیوتیک های جدید است. در جستجوی یک میکروارگانیسم تولید کننده ماده ضد میکروبی جدید از خاک های آلوده به نفت اطراف دزفول یک سویه *Al-caligenes faecalis subsp. faecalis* جداسازی شد. عوامل موثر در تولید ماده ضد میکروبی به روش یک فاکتور در هر زمان تعیین گردید که بر اساس آن به ترتیب $pH = 9$ ، $35^{\circ}C$ ، $2\% NH_4Cl$ ، $34/0\%$ استات سدیم و $02/0\%$ بیشترین تاثیر را داشت. بر اساس این نتایج غلظت استات و NH_4Cl دور همزن و زمان فرمانتاسیون به روش سطح پاسخ با طراحی

*دکترای میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی (نویسنده مسئول Yaghoobi.mohammad@gmail.com)

۲ دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی

۳ استاد، دانشگاه شهید بهشتی، مرکز تحقیقات گیاهان و مواد اولیه دارویی، گروه فیتوشیمی، تهران، ایران

مرکب مرکزی بهینه شدند. بهترین شرایط % ۱/۸۸ استات، %
 $29/0 \text{ NH}_4\text{Cl}$ دور همزن ۳rpm و زمان ۶/۷ روز تعیین گردید که
 باعث افزایش ۴۷% در تولید گردید. همچنین مشخص گردید که
 در بین متغیرها برهم کنش وجود دارد.

واژه های کلیدی: *Alcaligenes faecalis*، آلودگی نفتی، روش
 سطح پاسخ، طرح مرکب مرکزی، یک فاکتور در هر زمان

مقدمه

aga و همکاران سویه‌ای از این باکتری را
 جداسازی کردند که تولید آنتی بیوتیک
 کالامانتاسین A، B و C با اثرات ضد
aureus می‌کرد. همچنین سویه M3A
 جداسازی شده از دریا نیز تولید ماده ضد
 میکروبی آب دوست با اثر بر روی *M. tu-*
berculosis و *M. avium* مقاوم دارو و چندین
 سویه *Entrococcus* مقاوم ونکومایسین
 می‌کرد (Bacic & Yoch, 2001). سویه
 AE 1.16 جدا شده از باقیمانده کمپوست
 که از لحاظ فیلوژنتیک نزدیک ترین سویه
 به سویه جدا شده در این تحقیق است نیز
 دارای فعالیت آنتاگونیستی بر روی قارچ
 ها است (Kavroulakis & et al., 2010).
 همچنین در ژنوم سویه HPC1271 که از
 لجن فعال جداسازی شده و دارای اثر ضد
 میکروبی بر روی دو سویه مقاوم چند
 دارویی از *Enterobacter sp.* و *Serratia sp.*
GMX می باشد نیز ژن های انواع مختلفی
 از پلی‌کتاید سنتتاز های تیپ I (PKS I)
 شناسایی شده‌اند (Kapley & et al., 2013).

افزایش شیوع مقاومت های چند دارویی در
 میان باکتری ها، جستجو برای عوامل ضد
 میکروبی جدید را به یک استراتژی مهم در
 کنترل عفونت های شدید تبدیل کرده است
 Rice, (2006). یکی از روش های کشف
 متابولیت های جدید جستجو در محیط های
 با شرایط خاص است. Knight & et al.,
 (2003) و از آنجاییکه آلودگی خاک با نفت
 باعث افزایش منابع کربن و انرژی در خاک
 و ایجاد رقابت بین میکروارگانیسم هایی
 با توانایی تجزیه ترکیبات هیدروکربنی می
 شود (Duncan & et al., 1997) می تواند
 محل مناسبی برای آغاز جستجو جهت
 کشف سویه های تولید کننده متابولیت
 های جدید باشد. تاکنون چندین مورد
 فعالیت ضد میکروبی از جنس *Alcaligenes*
 گزارش شده است. Mare و Coetzee در
 سال ۱۹۶۴ اعلام کردند که دو سویه *Al-*
caligenes تولید باکتریوسین با طیف
 وسیع می نمایند. در سال ۱۹۹۶، Tokun-

های مختلفی مانند یک فاکتور در هر زمان یا پلاکت- بورمان انجام می شود و سپس با طراحی مرکب مرکزی (-Central compos-ite design, CCD) شرایط بهینه هر فاکتور تعیین می شود (Wang & et al., 2008).

در پژوهش های قبلی در خاک های آلوده به نفت اطراف دزفول یک باکتری تولید کننده ماده ضد میکروبی جداسازی و *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* strain *persicum* شناسایی شد. ماده ضد میکروبی حاصل دارای طیف وسیع اثر ضد میکروبی است و بیشترین اثر را بر روی *Aspergillus niger* و *Candida albicans* از خود نشان می دهد در حالی که بر روی *Entrococcus sp* اثری ندارد (Yagoobi (Avini & et al., (2014). بنابراین هدف از انجام این مطالعه تعیین نمودن فاکتور های موثر در تولید ماده ضد میکروبی توسط *Alcaligenes faecalis* جداسازی شده و به دست آوردن بهترین شرایط تولید بوسیله روش آماری پاسخ سطح در حداقل زمان و با حداقل امکانات است.

مواد و روش ها

میکروارگانسیم

Alcaligenes faecalis subsp. *faecalis* strain *persicum* مورد استفاده در این مطالعه از خاک های آلوده به نفت در اطراف دزفول به روش رقت سازی سریال

شرایط کشت در تولید متابولیت های ثانویه بوسیله میکروارگانسیم بسیار تاثیر گذار است. تغییر شرایط کشت می تواند باعث تحریک بیوسنتز متابولیت های ثانویه و بنابراین تسهیل کشف ترکیبات طبیعی جدید گردد. برای مثال با تغییر در شرایط ساده ای مانند غلظت اکسیژن محلول و دما ترکیبات جدیدی از قارچ ها و اکتینومیسیت ها جداسازی شده اند. بنابراین طراحی شرایط مناسب کشت از پیش نیازهای تحریک بیوسنتز متابولیت های ثانویه، در یک پروسه فرمانتاسیون است (Bode & et al., (2002).

استفاده از روش های آماری طراحی آزمایش می تواند باعث افزایش تولید، کاهش تغییرات کنترل نشده در پروسه و کاهش در زمان و هزینه تولید در مقایسه با روش های معمول بهینه سازی تک فاکتور گردد. از جمله این روش ها می توان به روش سطح پاسخ (Responce surface method, RSM) اشاره نمود که قادر است تا اهمیت نسبی چندین فاکتور دخیل در آزمایش را حتی در صورت وجود ارتباطات متقابل پیچیده بین آن ها ارزیابی کند (Fang & et al., (2012). پیش آگاهی از روند آزمایش و عوامل موثر در آن برای منطبق نمودن هر چه بیشتر مدل طراحی شده با واقعیت ضروری است، بنابراین RSM در دو سطح انجام می شود، ابتدا شناسایی فاکتور های موثر که به روش

سانتریفیوژ شده و بعد از دیسک گذاری با جریان هوای استریل خشک شد. اندازه هاله عدم رشد (برحسب mm) با روش انتشار از دیسک بر روی *B. subtilis* مورد بررسی قرار گرفت. محیط استات برات و سیترات برات شامل محیط پایه معدنی بعلاوه به ترتیب ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر استات و سیترات سدیم به عنوان منبع کربن می باشند. داده های مربوط به منبع کربن و انرژی، pH، دما، اثر غلظت NH_4Cl و اثر غلظت K_2HPO_4 ابتدا از لحاظ نرمال بودن با تست Kolmogorove-Smirn- ove بررسی شدند و سپس آنالیزهای آماری برای هر تیمار با کمک تحلیل واریانس یکطرفه (one way ANOVA) در احتمال $p < 0/05$ مورد بررسی قرار گرفتند. جهت آنالیزهای آماری از نرم افزار SPSS

و کشت متقاطع جداسازی شد. بررسی شرایط تولید ماده ضد میکروبی به روش یک فاکتور در هر زمان جهت انجام فرمانتاسیون از محیط پایه معدنی شامل آمونیوم کلراید ۱ g، دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۰۵ g، سولفات آهن ۰/۰۱ g (II)، کلرید کلسیم ۰/۰۱ g سولفات منیزیم ۰/۲ g، در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر (Schlegel, 1982) استفاده شد. جدایه جهت تولید بیشتر ماده ضد میکروبی، به ترتیب از نظر انتخاب منبع کربن و انرژی، تاثیر فاکتورهای pH، دما، غلظت منبع نیتروژن و فسفات مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). تمامی این آزمایشات، شامل ۳ تکرار برای هر تیمار بودند. رشد باکتری در هر آزمایش در OD_{600} پیگیری و بعد از ورود به فاز سکون، ۲ mL از مایع فرمانتاسیون

جدول ۱: انواع فاکتورها و سطوح مورد استفاده در بهینه سازی به روش یک فاکتور در هر زمان.

فاکتور	نوع و سطح					
	TSB	MHB	AB	CB	NB	منبع کربن°
pH	۱۰	۹	۸	۷	۶	۵
دما (C°)	۵۰	۴۰	۳۵	۳۰	۲۵	۲۰
NH_4Cl (%)	۰/۶۸	۰/۳۴	۰/۱۷	۰/۰۸	۰/۰۴	۰/۰۲
K_2HPO_4 (%)	۰/۰۸	۰/۰۴	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۰۰۵	۰/۰۰۳

NB, Nutrient broth; CB, Citrate broth; AB, Acetate broth; MHB, Muller Hinton broth; TSB, Trypticase Soy broth*.

۱۸ استفاده گردید.

طراحی آزمایش و بررسی شرایط بهینه تولید به روش سطح پاسخ

RSM شامل مجموعه ای از تکنیک های آماری است که برای ارزیابی ارتباط بین عوامل آزمایشی و پاسخ گزارش شده با توجه به یک یا چند معیار انتخابی به کار

می رود (Silva & Roberto, 2001). با توجه به نتایج حاصله از یک فاکتور در هر زمان عواملی مانند غلظت منابع کربن و نیتروژن، دور همزن و زمان فرمانتاسیون جهت بهینه سازی بوسیله CCD انتخاب گردیدند. سطح و دامنه هر یک از این متغیرها در جدول ۲ ارائه گردیده است.

جدول ۲: انواع متغیرها و سطوح مورد استفاده در بهینه سازی به روش RSM.

سطح و دامنه					فاکتور	متغیر
۲	۱	۰	-۱	-۲		
۲/۰۰	۱/۵۷	۱/۰۵	۰/۵۷	۰/۱	غلظت استات سدیم (%)	A
۲۰۰	۱۵۰	۱۰۰	۵۰	۰	سرعت همزن (rpm)	B
۰/۴۰	۰/۳۱	۰/۲۳	۰/۱۴	۰/۰۵	غلظت NH ₄ Cl (%)	C
۹	۷/۵	۶	۴/۵	۳	زمان فرمانتاسیون (روز)	D

(order polynomial equation) به صورت

زیر است.

$$Y = b_0 + \sum_i b_i x_i + \sum_i \sum_j b_{ij} x_{ij} + \sum_{ii} b_{ii} x_i^2$$

که در آن Y مقدار پاسخ، b_0 ضریب ثابت، b_i و b_{ij} و b_{ii} به ترتیب بیانگر اثرات خطی، متقابل و مربعات متغیرها (x_j و x_i) می باشند. CCD کامل برای چهار متغیر مستقل، هر کدام در پنج سطح با ۶ تکرار در نقطه مرکزی و ۸ نقطه محوری برای هماهنگی با مدل درجه دوم چند متغیره بکار برده شد. CCD کامل در اصل شامل 2^n طراحی فاکتوریل آزمایش (n : تعداد متغیرها)، n_0

جهت ایجاد معادله رگرسیون، متغیرها بوسیله معادله زیر کدگذاری گردیدند.

$$x_i = ((X_i - X_{\square_i}) / (\Delta X_i)) \quad i=1,2,3,\dots,k$$

که در آن x_i مقدار کد شده هر متغیر مستقل، X_i مقدار واقعی آن متغیر، X_{\square_i} مقدار واقعی متغیر در نقطه مرکزی (سطح صفر) و ΔX_i مقدار تغییر در هر سطح می باشد. متغیر پاسخ (قطر هاله عدم رشد) در قالب مدل درجه دوم قرار گرفت تا با متغیرهای مستقل مرتبط شود. شکل کلی یک معادله چند جمله ای درجه دوم (Second

نقطه مرکزی و دو نقطه محوری برای هر متغیر است. بنابراین تعداد کل نقاط آزمایش $N = 2^n + 2n + n_0$ است که نشان دهنده نیاز به ۳۰ آزمایش برای این مدل می باشد. نرم افزار Design-Expert 7.0 (Stat-Ease Inc., MN, USA) جهت آنالیز رگرسیون داده های بدست آمده و تعیین ترکیب بهینه متغیر های مستقل بوسیله معادله چند جمله ای درجه دوم مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز های آماری مدل به روش آنالیز واریانس (ANOVA) انجام شد. این آنالیز ها شامل آزمون فیشر (معنا دار بودن کل مدل)، احتمالات وابسته به آن $P(F)$ (و ضرایب تعیین R^2 و $R^2_{adjusted}$ هستند که معیار مناسب بودن مدل رگرسیون هستند. تعیین میزان هاله عدم رشد (پاسخ) مطابق با روش ارائه شده در بالا صورت گرفت.

نتایج

بیشترین تولید ماده ضد میکروبی به روش یک فاکتور در هر زمان
تاثیر عوامل مختلف در تولید ماده ضد میکروبی و میزان این تاثیر در (جدول ۳) دیده می شود. در بین محیط های کشت مورد استفاده، محیط های استات براث و سیترات براث به صورت معنا داری (۰/۰۵) $p <$ نسبت به سایر محیط های کشت باعث افزایش تولید ماده ضد میکروبی می شدند در حالیکه بین این دو محیط تفاوت معنا

داری دیده نمی شد. تاثیر pH های مختلف در تولید ماده ضد میکروبی در طی ۱۲ روز کشت در ۱۰۰ میلی لیتر محیط استات براث نشان داد که بین pH های ۷ تا ۱۰، باکتری رشد کرده و تولید ماده ضد میکروبی می نماید، این تولید در $pH = 9$ بیشتر بوده و نسبت به pH های ۷، ۸ و ۱۰ دارای اختلاف معنی دار (۰/۰۵) $p <$ بود. تولید ماده ضد میکروبی در طی ۱۲ روز کشت در ۱۰۰ میلی لیتر محیط استات براث با $pH = 9$ نشان داد که دمای $35^\circ C$ و $40^\circ C$ بهترین دمای تولید ماده ضد میکروبی است ولی اختلاف معنی داری (۰/۰۵) $p <$ در میزان تولید در این دو دما مشاهده نمی شد.

طی ۱۰ روز کشت در ۱۰۰ میلی لیتر محیط استات براث با $pH = 9$ و دمای $35^\circ C$ دیده شد که باکتری در غلظت های ۰/۳۴٪ و ۰/۶۸٪ NH_4Cl ، بهترین عملکرد تولید را بدون وجود اختلاف معنی داری (۰/۰۵) $p <$ بین این دو غلظت داشت.

جهت تعیین حداقل مقدار بهینه K_2HPO_4 روی تولید ماده ضد میکروبی، ۱۰ روز کشت در ۱۰۰ میلی لیتر محیط استات براث حاوی حداقل مقدار بهینه NH_4Cl (۰/۳۴٪) و $pH = 9$ و دمای $35^\circ C$ انجام شد. غلظت های ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۴ و ۰/۰۸ درصد K_2HPO_4 ، دارای رشد و تولید بیشتر معنی داری (۰/۰۵) $p <$ نسبت به غلظت های ۰/۰۰۳ و ۰/۰۰۵ درصد بودند در حالیکه در بین این غلظت ها تفاوت معنا

جدول ۳: آنالیز واریانس یک طرفه (one way ANOVA) طرح یک فاکتور در هر زمان

فاکتور	درجه آزادی	همگنی واریانس	مجموع مربعات	F-value	p-value
منبع کربن	(۱۴/۴)	۰/۴۹۵	۵۱/۶۰۰	۱۰/۴۰۰	۰/۰۰۱
pH	(۱۷/۵)	۰/۱۱۷	۹۲۶/۰۰۰	۴۱۴/۳۰۰	۰/۰۰۰
دما	(۱۴/۴)	۰/۲۷۴	۴۹۸/۹۳۳	۲۳۱/۳۷۵	۰/۰۰۰
غلظت NH ₄ Cl	(۱۷/۵)	۰/۳۰۳	۳۵۸/۲۷۸	۶۲/۰۹۰	۰/۰۰۰
غلظت K ₂ HPO ₄	(۱۷/۵)	۰/۴۰۷	۴۴/۰۰۰	۷/۵۰۰	۰/۰۰۲

خطی، چهار جمله درجه دوم و شش جمله برهمکنش دو فاکتوری است. بعد از حذف جملات بدون معنی (برپایه $p < 0.05$) معادله مدل به معادله خلاصه شده زیر تبدیل شد.

$$Y = 0.00 + 5.04A - 4.00 B - 2.88D + 2.56AB - 2.38AD - 5.50BC - 4.44CD + 2.02A^2 + 2.90B^2$$

بررسی ANOVA مدل رگرسیون درجه دوم (جدول ۴) نشان می‌دهد که به علت پایین بودن p value آزمون فیشر $[p < 0.0001]$ ، مدل بسیار معنی دار بوده است. مدل به علت نبود اختلاف در پاسخ تکرار های نقطه مرکزی فاقد خطای خالص (pure error) بوده و در نتیجه فاقد عدم برازش (lack of fit) می‌باشد، این در حالی است که درجه آزادی کافی برای محاسبه آن‌ها وجود دارد. هرچه میزان R^2 به ۱ نزدیک تر باشد، مدل قوی تر و پیش بینی پاسخ توسط آن بهتر است. در این مطالعه R^2 پس از حذف جملات بی معنی

داری در میزان تولید مشاهده نمی‌شد. بیشترین تولید ماده ضد میکروبی به روش سطح پاسخ

جهت ارزیابی ارتباط بین پاسخ و متغیر های مستقل و تعیین حداکثر فعالیت ضد میکروبی نسبت به سطح بهینه غلظت استات سدیم (% A)، سرعت همزن (B, rpm)، غلظت NH₄Cl (% C) و زمان فرمانتاسیون (روز، D)، مدل چند جمله‌ای توان دوم استفاده شد. مدل چند جمله‌ای درجه دوم با استفاده از آنالیز چندگانه رگرسیون، نقش هر کدام از متغیر ها و برهم کنش درجه دوم آن‌ها را بر روی فعالیت ضد میکروبی بیان می‌کند. معادله پاسخ مدل درجه دوم بر پایه متغیر های کد شده به صورت زیر است.

$$Y = 5.04A - 4.00 B + 0.083C - 2.88D + 2.56AB + 0.19AC + 2.38AD - 5.50BC - 0.81BD - 4.44CD + 2.02A^2 + 2.90B^2 - 0.23C^2 + 1.02D^2$$

که در آن Y مقدار پاسخ و A، B، C و D مقادیر کد شده متغیر ها هستند. این معادله شامل ۱۵ جمله است که چهار جمله آن

جدول ۴: آنالیز واریانس مدل درجه دوم

منبع اثر	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربع	F- value	p- value	ضریب تخمینی
مدل	۱۵۳۲/۰۳	۱۴	۱۰۹/۴۳	۱۳/۵۵	<۰/۰۰۰۱	
A	۵۲۲/۸۹	۱	۵۲۲/۸۹	۶۴/۷۴	<۰/۰۰۰۱	۵/۰۴
B	۳۰۷/۲۰	۱	۳۰۷/۲۰	۳۸/۰۳	<۰/۰۰۰۱	-۴/۰۰
C	۰/۱۴	۱	۰/۱۴	۰/۱۸	۰/۸۹۶۲	۰/۰۸۳
D	۱۵۸/۷۰	۱	۱۵۸/۷۰	۱۹/۶۵	۰/۰۰۰۷	-۲/۸۸
AB	۷۶/۴۱	۱	۷۶/۴۱	۹/۴۶	۰/۰۰۸۹	۲/۵۶
AC	۰/۴۵	۱	۰/۴۵	۰/۵۶	۰/۸۱۷۱	۰/۱۹
AD	۶۵/۶۴	۱	۶۵/۶۴	۸/۱۳	۰/۰۱۳۶	۲/۳۸
BC	۳۵۲/۰۰	۱	۳۵۲/۰۰	۴۳/۵۸	۰/۰۰۰۱	-۵/۵۰
BD	۸/۴۵	۱	۸/۴۵	۱/۰۵	۰/۳۲۵۰	-۰/۸۱
CD	۲۲۹/۱۴	۱	۲۲۹/۱۴	۲۸/۳۷	۰/۰۰۰۱	-۴/۴۴
A ^۲	۱۱۰/۶۹	۱	۱۱۰/۶۹	۱۳/۷۰	۰/۰۰۲۷	۲/۰۲
B ^۲	۲۲۷/۳۱	۱	۲۲۷/۳۱	۲۸/۱۴	۰/۰۰۰۱	۲/۹۰
C ^۲	۱/۴۲	۱	۱/۴۲	۰/۱۸	۰/۶۸۱۵	-۰/۲۳
D ^۲	۲۸/۲۵	۱	۲۸/۲۵	۳/۵۰	۰/۰۸۴۲	۱/۰۲

بین این جملات، مهمترین تاثیر متعلق به غلظت استات سدیم و دور همزن (p_A=p_B) (p<0/0001) و سپس زمان فرمانتاسیون (p_D=۰/۰۰۰۷) می باشند. جملات درجه دوم A² و B² نیز معنی دار هستند (p<۰/۰۰۵). این نتیجه نشان می دهد که آن ها به عنوان متغیر های محدود کننده عمل کرده و تغییر جزئی در آن ها می تواند تغییرات قابل توجهی را در میزان رشد یا تشکیل محصول و یا هر دو باعث شوند. جملات برهم کنشی BC، AD، AB و CD نیز در سطح p<۰/۰۰۵ معنی دار بودند که در بین آن ها برهم کنش بین دور همزن و غلظت NH₄Cl و همچنین زمان فرمانتاسیون و

برابر ۰/۹۱۰ بود؛ از طرف دیگر R²adjust-ed که معیار مناسب تری در طرح های آزمایشی مانند RSM است و برآوردی از کل تغییرات توصیف شده بوسیله مدل را ارائه می کند، در این مطالعه برابر ۰/۸۵۷ بود؛ در نتیجه تنها ۱۵% تغییرات بوسیله مدل توصیف نمی شوند. این مقادیر نشان دهنده دقت و فراگیری مناسب مدل چند جمله ای در تحلیل پاسخ ها و منطقی بودن استفاده از آن در بهینه سازی می باشد.

نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) در جدول ۵ دیده می شود. سه جمله خطی A، B و D در سطح p<۰/۰۰۵ معنی دار بودند. در

جدول ۵: آنالیز واریانس برای ارزیابی متغیرهای تعیین شده بوسیله RSM.

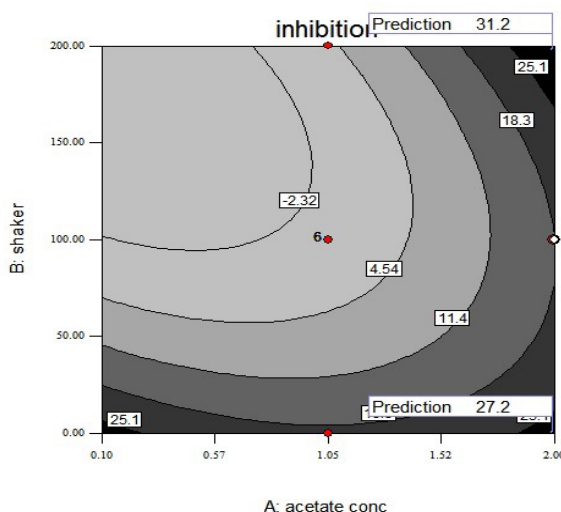
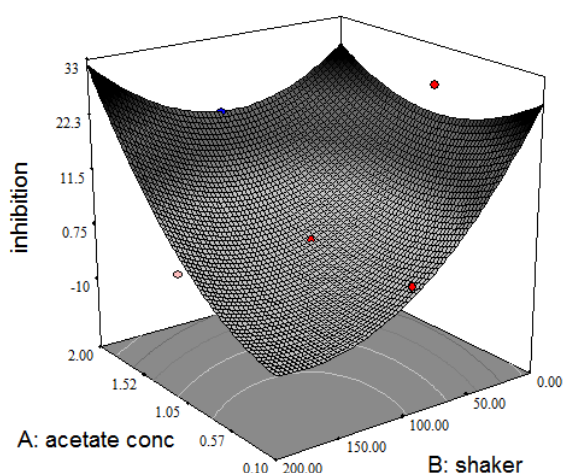
منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربع	F- value	p- value
مدل	۱۴	۱۵۳۲/۰۳	۱۰۹/۴۳	۱۳/۵۵	<۰/۰۰۰۱
باقیمانده	۱۳	۱۰۵/۰۰	۸/۰۸		
عدم برازش	۸	۱۰۵/۰۰	۱۳/۱۳		
خطای خالص	۵	۰	۰		
مجموع	۲۷	۱۶۳۷/۰۳			

R^2 = ضریب تعیین (coefficient of determination) = ۰/۹۱۰

R^2 Adjusted = ۰/۸۵۷

می‌گیرند. مقادیر منفی در متغیرهای B و D نشان دهنده اثر خطی آن‌ها در کاهش تولید است در حالیکه میزان مثبت متغیر A اثر خطی افزایش دهنده آن را بر روی پاسخ نشان می‌دهد. مقادیر مثبت A^2 و B^2 بیانگر آن است که مقدار تولید با افزایش مقدار متغیرها ابتدا کاهش و سپس افزایش پیدا می‌کند.

غلظت NH_4Cl ($p_{BC} = p_{CD} < 0/0001$) در تولید ماده ضد میکروبی مهم‌تر است. قدر مطلق ضریب تخمینی (Coefficient estimate) نشان دهنده میزان تاثیر هر متغیر در پاسخ است. غلظت استات سدیم بیشترین تاثیر (۵/۴) را در تولید ماده ضد میکروبی دارد که به دنبال آن دور همزن (۴/۰۰) و زمان فرمانتاسیون (۲/۸۸) قرار



شکل ۱: نمودار هم تراز (راست) و سه بعدی (چپ) اثر همزمان دور همزن و غلظت استات سدیم در تولید ماده ضد میکروبی. کاهش دور همزن یا افزایش غلظت استات سدیم باعث افزایش میزان تولید می‌شود.

۲۰۰ rpm میزان تولید در پایین ترین غلظت NH_4Cl بیشتر است. در مجموع با کاهش دور از ۲۰۰ rpm به صفر و افزایش غلظت NH_4Cl ، فعالیت از ۲۵/۰۷ به ۴۰/۵۲ افزایش پیدا می‌کند. در غلظت % ۰/۴ از NH_4Cl بیشترین تولید ماده ضد میکروبی پس از گذشت ۳ روز از آغاز فرمانتاسیون صورت می‌گرفت. در کمترین غلظت NH_4Cl (۰/۰۵) بیشترین تولید پس از گذشت ۹ روز و به میزان ۵۰% کمتر از حالت قبل پیش بینی می‌شود (شکل ۲-ج).

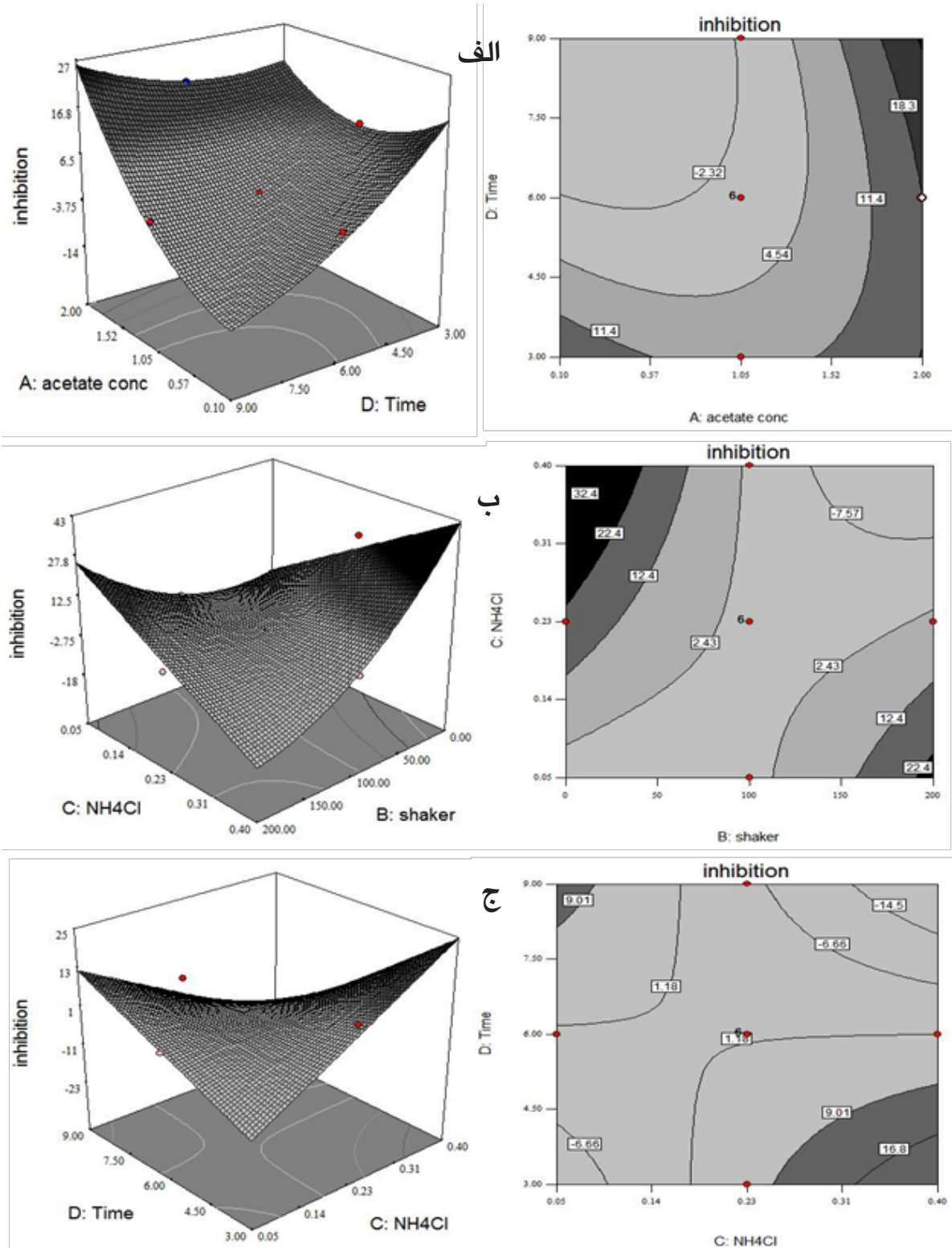
تعیین شرایط بهینه پاسخ

تابع مطلوبیت برای تعیین بهترین شرایط تولید ماده ضد میکروبی بوسیله روش حداقل مربعات محاسبه شد. به این منظور حداقل فعالیت مشاهده شده (۰ mm) و بالاترین آن (۲۵ mm) به ترتیب مطلوبیت ۰ و ۱ قرار گرفتند، همچنین مقادیر متغیر های مستقل در دامنه طراحی آزمایش قرار گرفت (جدول ۲). بعد از ۳۰ بار همانند سازی توسط نرم افزار مقدار بهینه غلظت استات، ۱/۸۸ %؛ غلظت ۰/۲۹ %، NH_4Cl ؛ دور همزن، ۳ rpm و زمان فرمانتاسیون، ۶/۷ روز برای بدست آوردن هاله عدم رشد mm ۳۱/۷ محاسبه شد. جهت تایید مدل، شرایط پیش بینی شده تحت آزمایش قرار گرفت و قطر هاله ۳۰ mm بدست آمد که نشان دهنده دقت و قابل اعتماد بودن مدل در پیش بینی تولید ماده ضد میکروبی بود.

نمودار های سه بعدی پاسخ سطح و دو بعدی هم ترازی (contour) رسم شدند تا میزان تاثیر هر متغیر مستقل و همچنین تاثیر برهم کنشی متغیر ها بر پاسخ را نشان دهند. (شکل ۱) نمودار سه بعدی و هم ترازی اثر غلظت استات و دور همزن را بر روی فعالیت ضد میکروبی نشان می‌دهد در حالیکه دو متغیر دیگر در نقطه میانی ثابت هستند. در غلظت پایین استات (۰/۱%) با افزایش دور همزن از میزان فعالیت ضد میکروبی کاسته می‌شد و به صفر می‌رسید؛ در حالیکه در غلظت % ۲ به میزان اندکی از ۲۷/۲ به ۳۱/۲ افزایش پیدا کرد. همچنین این نمودار نشان می‌داد که تولید ماده ضد میکروبی در نقطه میانی هر دو متغیر کاهش پیدا می‌کرد.

اثر متقابل غلظت استات و زمان فرمانتاسیون در حالی که دو متغیر دیگر در نقطه میانی ثابت هستند، در شکل ۲-الف دیده می‌شود. در غلظت بالای استات با افزایش زمان از ۳ به ۹ روز در حدود ۵۰% به میزان تولید افزوده می‌شد اما در غلظت پایین استات با افزایش زمان تولید به صفر می‌رسد.

نمودار سه بعدی و هم ترازی اثر متقابل دور همزن و غلظت NH_4Cl (شکل ۲-ب) نشان می‌داد که در دور همزن صفر با افزایش غلظت NH_4Cl از ۰/۰۵% به ۰/۴%، تولید افزایش پیدا کرد در حالیکه در دور



شکل ۲: نمودار هم ترازوی (راست) و سه بعدی (چپ) تاثیر همزمان الف) غلظت استات سدیم و زمان فرمانتاسیون، ب) غلظت NH_4Cl و دور همزن، ج) غلظت NH_4Cl و زمان فرمانتاسیون بر روی تولید ماده ضد میکروبی توسط *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* strain *persicum*

جدول ۶: تایید تجربی پیش بینی بهترین ترکیب متغیر ها توسط RSM و مقایسه آن با بهترین ترکیب متغیر ها در روش تک فاکتور در هر زمان

متغیر		سطح		هاله عدم رشد (mm)
		تک فاکتور	RSM	تک فاکتور
(%) غلظت استات سدیم	۲	۱/۸۸	۳۰	۲۱
(rpm) سرعت همزن	۱۰۰	۳		
غلظت NH ₄ Cl (%)	۰/۳۴	۰/۲۹		
زمان فرمانتاسیون (روز)	۱۰	۶/۷		

میزان فعالیت ضد میکروبی بعد از بهینه سازی با RSM به میزان % ۴۷ نسبت به روش تک فاکتور افزایش یافت (جدول ۶).

نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده آن است که نوع و میزان منبع کربن نقش مهمی در تولید ماده ضد میکروبی توسط *Al-caligenes faecalis subsp. faecalis strain*

persicum دارد. منبع کربن مهمترین جز محیط کشت محسوب می شود زیرا باید همزمان از رشد و تولید ماده ضد میکروبی حمایت کند که در فاز های متفاوت اتفاق می افتند اما این اثر در تولید انواع آنتی بیوتیک ها و سویه های تولید کننده متفاوت است و بطور معمول اطلاعات بسیار کمی درباره تاثیر آن در سطح ملکولی بر روی تولید آنتی بیوتیک ها وجود دارد (Rokem & et al., 2006). بهترین منابع کربن در این پژوهش استات سدیم و سیترات سدیم شناخته شدند که با نتایج مطالعه بر روی سویه M3A مطابقت دارد, Bacic & Yoch

بحث

افزایش نگرانی درباره گسترش مقاومت های میکروبی و خارج شدن آنتی بیوتیک های موثر قدیمی از فهرست انتخاب های درمان و همچنین شکست روش های نوین بیوانفورماتیک و شیمیایی برای تولید ترکیبات ضد میکروبی جدید نشان دهنده نیاز به مطالعه بر روی متابولیت های ثانویه میکروبی جدید می باشد, Bredy (2012). علیرغم وجود گزارشاتی از تولید ماده ضد میکروبی توسط *Alcaligenes sp.* تاکنون در مورد تعیین شرایط بهینه تولید در این باکتری گزارشی ارائه نشده است.

بر تولید ماده ضد میکروبی اثر گذار است (جدول ۳). نتایج همچنین نشان دهنده آن است که در سویه مورد مطالعه همه غلظت های بالاتر از غلظت محیط پایه معدنی استفاده شده برای تولید مناسب هستند. این یافته بر خلاف سایر گزارشات است که نشان می دهد در بیشتر موارد غلظت های پایین فسفات برای شروع تولید آنتی بیوتیک ها ضروری است با این حال مکانیسم این تاثیر بطور دقیق مشخص نبوده و احتمالاً جعبه های PHO در آن دخیل هستند.

pH و سپس دما بیشترین نقش را در تولید ماده ضد میکروبی مطالعه شده دارند (جدول ۳) و مقدار بهینه pH برابر ۹ و دما 35°C تعیین گردیده است. pH و دما از عوامل مهم در رشد باکتری ها و تولید متابولیت های ثانویه بوده و حتی تغییرات اندک در آن ها می تواند باعث تغییرات اساسی در میزان تولید و یا تولید متابولیت های ثانویه دیگری شود. به نظر می رسد که این دو عامل از طریق ایجاد تغییر در فعالیت های آنزیمی شامل تخریب آن ها یا تغییر تمایل به سوبسترا های مختلف در تولید متابولیت های ثانویه دخیل هستند (Fang & et al., 2012).

تولید آنتی بیوتیک ها به غلظت اکسیژن محلول (DO) در محیط کشت بسیار حساس است. نیاز به اکسیژن در Sterpto- myces sp. معمولاً بالا بوده و از عوامل مهم

(2001) و در نتیجه به نظر می رسد مهار کاتابولیک در تولید ماده ضد میکروبی اثر گذار است. آزمون RSM مقدار بهینه غلظت استات سدیم را $1/88\%$ محاسبه نمود که در تطابق با مقدار 2% روش تک فاکتور قرار می گیرد. همچنین نتایج نشان دهنده آن است که برای تولید بیشتر، هر مقدار میزان منبع کربن بیشتر باشد لازم است تا دور همزن و زمان فرمانتاسیون بیشتر باشند (شکل های ۱ و ۲ - الف).

آمونیم بهترین منبع نیتروژن برای بسیاری از میکروارگانیسم ها بوده اما در بسیاری موارد مهار کننده تولید آنتی بیوتیک ها است (Rokem & et al., 2006). در این مطالعه مشخص گردید که تولید ماده ضد میکروبی توسط آمونیم مهار نمی شود که با مطالعه Bacic و Yoch در سال ۲۰۰۱ مشابهت دارد. مقدار بهینه تعیین شده آمونیم در روش تک فاکتور با روش RSM مشابه است (جدول ۶) اما روش RSM تاثیر غلظت آمونیم در تولید را بدون معنی تشخیص داده است هر چند که بررسی اثرات متقابل توسط این روش نشان می دهد که افزایش غلظت آمونیم بطور معنی داری با کاهش دور همزن و زمان فرمانتاسیون مرتبط است (شکل ۲-ب و ۲-ج).

نتایج به دست آمده نشان می دهد که غلظت فسفات به میزان کم اما معنی داری

نیترورژن برای حفظ سطح تولید می‌شود. تعیین شرایط بهینه بوسیله این روش باعث ۳ روز کاهش در مدت فرمانتاسیون نسبت به روش یک فاکتور در زمان گردید (جدول ۵). بهترین شرایط تولید ماده ضد میکروبی توسط *Alcaligenes faecalis subsp. fae-* *calis strain persicum*; دمای °C ۳۵، ۹ = pH، % ۱/۸۸ استات سدیم، % ۰/۲۹ NH₄Cl، % ۰/۰۱ K₂HPO₄، سرعت همزن ۳ rpm و زمان فرمانتاسیون ۷ روز تعیین شدند. نتایج همچنین نشان می‌دهند که در تعیین غلظت بهینه مواد غذایی محیط کشت، روش آماری RSM و روش کلاسیک یک فاکتور در هر زمان مشابه بودند اما تعیین شرایط بهینه دور همزن و مشخص شدن برهم کنش آن با غلظت مواد غذایی محیط کشت در روش RSM، باعث افزایش % ۴۷ در تولید ماده ضد میکروبی و ۳ روز کاهش در زمان فرمانتاسیون می‌شود در نتیجه می‌توان از این روش به علت برتری آن در کاهش زمان و هزینه برای تعیین شرایط بهینه و افزایش حجم تولید استفاده نمود.

محدود کننده در افزایش حجم فرمانتاسیون می‌باشد. با این وجود مواردی از بی تاثیر بودن یا افزایش تولید در غلظت های کم اکسیژن محلول گزارش شده‌اند Clark & et al., (1995) and López & et al., (2012). نتایج RSM در مقایسه با روش تک فاکتور نشان می‌دهد که دور همزن دومین عامل مهم در تولید ماده ضد میکروبی بوده و تولید بیشتر با کاهش دور همزن رابطه مستقیم دارند (جدول ۴). کاهش اکسیژن در دسترس به عنوان عامل استرس زا می‌تواند در این مورد باعث تحریک تولید ماده ضد میکروبی شود. همچنین نتایج نشان می‌دهند که کاهش دور همزن باعث افزایش نیاز به آمونیوم و استات برای تولید بیشتر می‌شود که نشان دهنده تغییر در نحوه متابولیسم سلول است. نتایج بدست آمده از RSM نشان می‌دهد که زمان فرمانتاسیون از فاکتور های تاثیرگذار مهم در تولید ماده ضد میکروبی است. افزایش زمان فرمانتاسیون باعث کاهش در تولید می‌شود، همچنین افزایش زمان باعث افزایش نیاز به منابع کربن و

منابع

- Bacic, M. K. & Yoch, D. C. (2001). Antibiotic composition from *Alcaligenes species* and method for making and using the same. United States patent. US 6,224,863.
- Berdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *Journal of Antibiotics* 65 : 385–395.
- Bode H. B., Bethe B., Hofs R., & Zeeck A. (2002). Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity. *Chemistry and Biochemistry*, 3: 619 – 627.
- Busse, H-J. & Auling G. (2005). Genus I. *Alcaligenes*, Castellani and Chalmers 1919, 936ALPP: 653-658 in Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley J. T. & Garrity G. M. (eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology* 2nd edition, volume two, The Proteobacteria, Part C, The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilon proteobacteria . Springer.
- Clark, G. J., Langley, D. & Bushell M. E. (1995). Oxygen limitation can induce microbial secondary metabolite formation :investigations with miniature electrodes in shaker and bioreactor culture. *Microbiology*. 141: 663-669.
- Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Marsh, T., Garrity, G. M., and Tiedje, J. M. (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*. 37.
- Duncan, K., Levetin. E., Wells, H., Jennings, E., Hettenbach, S., Bailey, S., Lawlor, K., Sublette, K., & Fisher, J. B. (1997). Managed Bioremediation of Soil Contaminated with Crude Oil Soil Chemistry and Microbial Ecology Three Years Later. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 63-65: 879-889.
- Fang, X., Han, L., Cao, X., Zhu, M., Zhang, X. & Wang, Y. (2012). Statistical Optimization of Process Variables for Antibiotic Activity of *Xenorhabdus bovienii*. *PLoS ONE* 7(6) 38421.

- Kapley, A., Sagarkar, S., Tanksale, H., Sharma, N., Qureshi, A., Khardenavis, A. & Purohit, H. J. (2013). Genome sequence of *Alcaligenes* sp. strain HPC1271. *Genome Announcement*. 1(1):00235-12.
- Kavroulakis, N., Ntougias, S., Besi, M. I., Katsou, P., Damaskinou, A., Ehaliotis, C., Zervakis G.I. & Papadopoulou, K. K. (2010). Antagonistic bacteria of composted agro-industrial residues exhibit antibiosis against soil-borne fungal plant pathogens and protection of tomato plants from *Fusarium oxysporus* sp. *radicis-lycopersici*. *Plant and Soil*. 333:233–247.
- Knight, V., Sanglier, J.J., DiTullio, D., Braccili, S., Bonner, P., Waters J., Hughes, D. & Zhang, L. (2003). Diversifying microbial natural products for drug discovery. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 62:446–458.
- López, R., Monteón, V., Chan, E., Montejo, R. & Chan M. (2012). Oxygen limitation favors the production of protein with antimicrobial activity in *Pseudoalteromonas* SP. *Brazilian Journal of Microbiology*. 1206-1212
- Maré, I. J. & Coetzee, J. N. (1964). Antibiotics of *Alcaligenes faecalis*. *Nature*. 203: 430-431.
- Rice, L.B. (2006) Antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria. *American Journal of Infection Control*. 34(Suppl. 1): S11-19.
- Rokem, J. S., Lantz A. E. & Nielsen J. (2006). Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Natural Products Reports*. 24: 1262–1287.
- Schlegel H.G. (1992). *Allgemeine mikrobiologie*. 7 Auflage. Georg Thieme Verlag. PP:192.
- Silva, C.J.S.M. & Roberto, I.C. (2001) Optimization of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 using response surface methodology. *Process in Biochemistry*. 36: 1119–1124.
- Tokunaga, T., Kamigiri, K., Orita, M., Nishikawa, T., Shimizu, M. & Kaniwa, H. (1996). Kalimantacin A, B and C, novel antibiotics produced by *Alcaligenes faecalis* sp. Y1-02632S: physic-chemical properties and structure elucidation. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*. 49: 140-144.
- Wang, Y., H., Feng, J.T., Zhang Q. & Zhang X. (2008). Optimization of ferment-

tation condition for antibiotic production by *Xenorhabdus nematophila* with response surface methodology. Journal of Applied Microbiology. 104: 735–744.

Yaghoobi Avini, M., Daraei, M & Ebrahimipour, Gh. (2014). Antimicrobial activity of an *Alcaligenese faecalis* strain isolated from oil contaminated soils. Journal of Medical Laboratory Sciences 8(5): 49-55. In Persian

