مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

بررسی فعالیت ضد باکتریایی و سمیت پپتید نوترکیب LasioglossinIII بر پاتوژن های شاخص مواد غذایی

محمد باقر حبیبی نجفی*[1]، عباس تنهاییان[2]، پریا رهنما[3]، مرجان ازغندی[4]

[1]استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

[2]دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

[3]دانشجوی دکتری میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

[4]دانشجوی دکتری علوم دامی، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۲۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۲۴

چکیده

افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها به آنتی بیوتیک‌های رایج منجر به یافتن ترکیبات ضد میکروبی جدید شده است. پپتیدهای ضد میکروبی یکی از گزینه‌های مناسب برای جایگزینی آنتی بیوتیک‌های موجود می-باشند. لازیوگلوسین‌ها گروهی از پپتیدهای زیست فعال می‌باشند که در مطالعه حاضر، عملکرد ضد میکروبی پپتید نوترکیب لازیوگلوسین III بر پنج عامل بیماری‌زای باکتریایی غذایی (باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *انتروکوکوس فکالیس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشرشیا کلی*) و همچنین بررسی دوز سمیت آن بر یک رده سلول انسانی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حکایت از عملکرد ضد میکروبی مناسب پپتید نوترکیب دارد به صورتی‌که حداقل غلظت بازدارندگی(MIC) و کمترین غلظت کشندگی(MBC) پپتید لازیوگلوسین III بر باکتری های مورد آزمون به ترتیب در محدوده۸-/۶۲۵ µg/ml ۳/۸۵۱ و۷/۱۵-۷۰۳/۴۰۶ µg/ml بود. نتایج حاکی از آن بود که باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین حساسیت را به این پپتید دارد به طوری که مقادیر MIC و MBC آن به ترتیب ۳/۸۵۱ و ۷/۷۰۳ بود. غلظتی از پپتید که اثر سمی بر روی سلول‌های کلیه جنین انسان نشان داد (µg/ml۱۶۵۲) به مراتب بیشتر از مقادیر MIC و MBC بدست آمده بود. نتایج این مطالعه نشان داد خاصیت باکتری‌کشی این پپتید با آنتی بیوتیک‌های رایج قابل رقابت می‌باشد.

کلمات کلیدی: *پپتید لازیوگلوسین III، پپتید ضد میکروبی، سمیت سلولی، پاتوژن غذایی.*

*نویسنده مسئول: محمدباقر حبیبی نجفی تلفن تماس: ۰۵۱۳۸۸۰۵۷۷۲ Email: habibi@um.ac.ir

مقدمه

ایمنی مواد غذایی یک نگرانی رو به رشد در سراسر جهان است. بیماری‌های ایجاد شده بوسیله مواد غذایی از مهمترین مشکلات سلامت عمومی به شمار می‌روند و همه ساله موجب ابتلا و مرگ و میر تعداد قابل توجهی از مردم می‌شوند. علل شایع بیماری های منتقله از غذا شامل باکتری‌ها، سموم باکتریایی، ویروس ها و انگل‌ها هستند. شایعترین این عوامل باکتری ها هستند، چراکه اقدامات نامناسب برای تهیه و جابه جایی غذا باعث آلودگی، بقا و رشد باکتری‌های بیماری زا می‌گردد (Chopra *et al*., 2015; Koek *et al*., 2006). صنعت غذا برای حفظ کیفیت و افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی به طور گسترده از نگهدارنده های شیمیایی استفاده می کند. از طرفی مصرف غذاهای فرآوری شده با مواد نگهدارنده شیمیایی منجر به افزایش نگرانی مصرف کنندگان و تقاضا برای مصرف غذاهای طبیعی و با حداقل مواد نگهدارنده شیمیایی شده است. لذا نیاز مبرم به یافتن نگهدارنده های طبیعی برای مواد غذایی احساس می شود (Espitia *et al*., 2012). مشکل اصلی در صنایع غذایی آلودگی مواد غذایی با پاتوژن‌هایی مثل سالمونلا، شیگلا، میکروکوکوس، انترکوکوس فکالیس، *باسیلوس لیچنیفرمیس*، *اشرشیاکلی*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و ... می‌باشد لذا باید به فکر یافتن ترکیبات ضد باکتریایی طبیعی بر علیه آن‌ها بود. تحقیقات نشان می‌دهد پپتیدهای ضد میکروبی می‌توانند بر علیه پاتوژن های غذایی موثر باشند و بنابراین بدون داشتن اثرات جانبی نقش مهمی در نگهداری مواد غذایی ایفا کنند (Hintz *et al*.,2012; Kraszewska *et al*., 2016). پپتیدهای ضد میکروبی به خانواده جدیدی از آنتی بیوتیک‌ها تعلق دارند. مزیت عمده پپتیدهای ضد میکروبی به مکانیسم عمل آن‌ها مربوط می‌شود که تفاوت عمده‌ای با آنتی بیوتیک‌های متداول دارند. پپتیدهای ضد میکروبی بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی مثل بار خالص به دو گروه پپتیدهای کاتیونی و پپتیدهای آنیونی تقسیم می‌شوند. اغلب پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونی هستند (Marshall, 2003). هر چند مکانیسم دقیق عملکرد آن‌ها هنوز به‌طور دقیق مشخص نشده است ولی تصور بر آنست که این پپتیدهای باردار مثبت پوشش سلولی باکتریایی که بار منفی دارد را هدف قرار می‌دهند. سپس با نفوذ به درون غشای سلول ساختار سلول را تخریب کرده و منجر به تراوش اجزای سیتوپلاسم به بیرون و نهایتا مرگ سلولی می شوند (Bagley, 2014). در حالی که پپتیدهای ضد میکروبی آنیونی گیرنده‌های ویژه-ای را هدف قرار داده و به عنوان بازدارنده‌های اصلی مسیرهای متابولیکی رفتار می‌کنند(Cotter *et al*., 2013). از میان بیش از ۹۰۰ پپتید ضد میکروبی ایزوله شده از تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها، پپتیدهای مارپیچ آلفا کاتیونی خطی بیشترین گروه مورد مطالعه بوده‌اند. اینها پپتیدهای کوچکی هستند که از ۱۰ تا ۴۵ اسید آمینه بلند زنجیره، هیدروفوب و بازی تشکیل

شده اند. این گروه از پپتیدها اغلب در زهر حشرات گزنده مثل زنبورها یافت می شوند. چنین پپتیدهایی به عنوان الگویی برای توسعه پپتیدهای آنتی بیوتیکی جدید و موثر می توانند به کار گرفته شوند(Cerovsky *et al*., 2009). Lasioglossinها گروهی از پپتیدهای ضد میکروبی طبیعی هستند که به تازگی شناسایی شده اند و در زهر زنبور عسل وحشی(*Lasioglossum laticeps*) وجود دارند. سه نوع Lasioglossin از نظر ساختاری شناسایی شده‌اند و با اسامی Lasioglossin I, II, III نامگذاری شده‌اند(Vrablikova *et al*., 2017). این پپتیدها عملکرد ضد میکروبی بر برخی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان دادند. پپتیدهای Lasioglossin فعالیت همولیتیک کمی در برابر اریتروسیت‌های موش آزمایشگاهی نشان دادند که یک ویژگی مهم برای آن‌ها می باشد زیرا مشکل اصلی در کاربرد بسیاری از پپتیدهای ضد میکروبی توانایی آن‌ها برای لیز کردن سلول‌های یوکاریوتی می‌باشد که به عنوان فعالیت همولیتیکی مطرح می‌شود و در این پپتیدها این ویژگی در حداقل می‌باشد. از بین سه نوع، Lasioglossin نوع III بهترین پتانسیل ضد میکروبی، ضد توموری و ضد مخمر کاندیدا را نشان داده است(Vrablikova *et al*., 2017). در مطالعات پیشین انجام شده اثر ضد میکروبی پپتید Lasioglossin III که به شکل نوترکیب در فضای پری‌پلاسمی سنتز شده باشد بر علیه پاتوژن‌های شاخص غذایی بررسی نشده است. از این رو در این تحقیق، با توجه به در دسترس بودن نوع نوترکیب این پپتید از مطالعه دیگر(نتایج گزارش نشده است)، ابتدا اثر ضد میکروبی این پپتید نوترکیب برعلیه پاتوژن‌های *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *انتروکوکوس فکالیس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* مورد بررسی قرار گرفت و سپس عدم سمیت این پپتید ارزیابی شد تا چشم انداز روشنی در معرفی این پپتید به عنوان نگهدارنده مواد غذایی فراهم گردد.

مواد و روش‌ها

باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC25923)، *سالمونلا تیفی موریوم* (ATCC 14028)، *انتروکوکوس فکالیس* (ATCC 29212) ، *لیستریا مونوسیتوژنز* (ATCC 19111) و *اشرشیا کلی* (ATCC 25922) از کلکسیون میکروبی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردیدند.

پپتید نوترکیب Lasioglossin III از آزمایشگاه گروه صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید. این پپتید به صورت نوترکیب و با تجمع در فضای پری پلاسمی در باکتری *E. Coli* سویه BL21 ترانسفورم شده با وکتور pET22b نوترکیب، دارنده توالی کدکننده لازیوگلوسین III، سنتز شد و پس از استخراج

پپتید از فضای پری پلاسمی و تخلیص آن، غلظت آن تعیین گردید. سپس پپتید جهت ارزیابی ضدمیکروبی به کار برده شد.

برای تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC[۱]) و حداقل غلظت کشندگی (MBC[۲]) از روش میکرودایلوشن استفاده گردید (Wikler *et al*., 2009; Wiegand *et al*., 2008). برای این منظور ابتدا از باکتری‌ها کشت ۲۴ ساعته تهیه شد. پس از تهیه ۰/۵ مک فارلند از باکتری‌ها در محیط مولر هینتون براث (مرک، آلمان)، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. سپس به چاهک اول ۱۰۰ میکرولیتر پپتید اضافه شد و کاملا مخلوط گردید و از آن ۱۰۰ میکرولیتر برداشته به چاهک بعدی اضافه شدو این رویه را در چاهک‌های بعدی ادامه داده به صورتی که سریالی از رقت‌های پپتید حاصل شد. کنترل منفی (بدون افزودن باکتری) و کنترل مثبت (بدون افزودن پپتید) نیز در هر ردیف در نظر گرفته شد. بعد از ۱۶ تا ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری میکروپلیت در دمای ۳۷ ^{o}C، جذب تمامی چاهک‌ها بوسیله الایزا خوان (مدل ELX800 بیوتک، امریکا) در ۶۲۰ نانومتر اندازه گیری شد. اولین چاهک‌هایی که حاوی پپتید بود و جذبی در ۶۲۰ نانومتر نداشتند و شفاف بوده به عنوان MIC در نظر گرفته شد. به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی نیز ۵۰ میکرولیتر از چاهک‌هایی که در آن‌ها رشد باکتری صورت نگرفته بود یعنی همان رقت MIC و رقتهای بالاتر از آن به محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) منتقل شد و پس از پخش بوسیله سواپ استریل به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ ^{o}C گرمخانه گذاری شدند. پلیت-هایی که حاوی کمترین غلظت از پپتید بودند و همچنین در آن رشدی مشاهده نشد به عنوان MBC در نظر گرفته شدند.

سمیت پپتید روی سلول‌های کلیه جنین انسان بررسی شد. تقریبا^{۳}۱۰ ×۳ سلول در ۱۰۰ µl محیط DMEM[۳] (۱۰٪ حجمی–حجمی FBS[۴]) (سیگما، انگلستان) در هر چاهکِ یک پلیت دارای ۹۶ چاهک کشت داده شدند. سلول ها به مدت ۱ شب در دمای ۳۷^{o} C در یک اینکوباتور مرطوب با ۵٪ دی اکسید کربن گرمخانه‌گذاری شدند. سلول‌ها سپس با پپتید تیمار شدند. سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷^{o} C تحت شرایط یکسان گرمخانه‌گذاری شدند. تست MTT برای دیدن اثر بازدارندگی پپتید در سلول‌های نرمال انجام شد. طی این ارزیابی ۱۰ µl از رنگ MTT تهیه شده (5 PBS mg/ml) در هر یک از خانه‌ها اضافه شد و به منظور متابولیزه شدن ماده MTT توسط سلول-های زنده و ایجاد بلورهای فورمازان، پلیت۹۶ خانه ای به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷^{0} C گرمخانه گذاری شد. سپس محتویات خانه‌ها

[۱] Minimum inhibitory concentration

[۲] Minimum bactericidal concentration

[۳] Dulbecco’s modified eagle medium

[۴] Foetal bovine serum

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

تخلیه و DMSO ۱۵۰ µl [۱](سیگما، انگلستان) به هر یک از خانه‌ها افزوده شد. DMSO حلال بلورهای فورمازان است. افزودن DMSO باعث ایجاد درجه‌ی متفاوتی از شدت رنگ بنفش تا سفید می‌شود. شدت رنگ این محلول‌ها ، معیاری از تعداد سلول‌های زنده در محیط می-باشد. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند رابطه مستقیم دارد. سپس میزان جذب خانه‌ها در طول موج ۵۷۰nm توسط دستگاه الایزا اندازه‌گیری شد (Ghandehari *et al*.,2015).

در این مطالعه برای تجزیه داده‌ها از نرم افزار SPSS.22 استفاده شد. بررسی خواص ضد باکتریایی در ۴ تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها از از آزمون تحلیل واریانس و آزمون چند دامنه-ای دانکن در سطح اطمینان ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج و بحث

هر روز اثرات زیان‌آور نگهدارنده های شیمیایی از جمله عوارض سرطان‌زایی و نیز باقی مانده‌های سمی بر سلامت انسان به اثبات می-رسد و تقاضا برای مصرف مواد غذایی که عمر ماندگاری آن‌ها به صورت طبیعی افزایش می‌یابد، بیشتر می‌شود. لذا محققین مواد غذایی درصدد جایگزینی آن‌ها با نمونه‌های طبیعی شده‌اند. از طرفی تعداد پاتوژن‌های مقاوم به آنتی بیوتیک روز به روز در حال افزایش است و ترکیبات ضد میکروبی موجود برای کنترل عفونت‌های باکتریایی جوابگو نمی‌باشند (Okuda *et al*., 2015). پپتیدهای ضد میکروبی می‌توانند جایگزین آنتی بیوتیک‌های موجود برای کنترل و مبارزه با عفونت‌های باکتریایی باشند. این پپتیدهای ضد میکروبی نه تنها عملکرد ضد باکتریایی دارند بلکه در بسیاری موارد اثر کشندگی بر روی ویروس‌ها و حتی سلول‌های سرطانی نشان داده‌اند. عملکرد پپتیدهای ضد میکروبی به طور عمده به سطح سلول‌های باکتریایی و ترکیب آمینو اسیدی پپتید بستگی دارد. پپتیدهای ضد میکروبی ابتدا به سطح سلول باکتریایی که به احتمال زیاد توسط پیوند الکترواستاتیک بین پپتید کاتیونی و سطح باکتریایی ایجاد می‌شود متصل می‌شوند. احتمال آن می‌رود که پپتیدهای کاتیونی ابتدا توسط مولکول‌های لیپوپلی‌ساکارید دارای بار منفی موجود در باکتری‌های گرم منفی جذب می شوند (Brogden, 2005). هر چند یافته‌های Ebbensgaard *et al*. (2015) نشان داد که لیپوپلی‌ساکارید در باکتری *اشرشیا کلی* نه فقط در جذب و اتصال پپتیدهای ضد میکروبی به غشای خارجی نقش دارد بلکه به عنوان مانع حفاظتی بر

[۱] Dimethyl sulfoxide

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

علیه پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونی عمل می-کند. زیرا سویه‌های باکتریایی *اشرشیا کلی* جهش یافته‌ی دارای نقص در لیپوپلی‌ساکارید، حساسیت بیشتری به پپتیدهای ضد میکروبی بکار رفته نشان دادند. که این امر دلالت بر این دارد که لیپوپلی‌ساکارید به عنوان جزء ضروری در فعالیت ضد میکروبی پپتیدهای کاتیونی نقش ندارد همچنان‌که بسیاری از پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونی فعالیت ضد میکروبی بر علیه باکتری‌های گرم مثبت که فاقد لیپوپلی‌ساکارید هستند نشان دادند (Ebbensgaard *et al.*, 2015).

تعیین فعالیت ضد میکروبی به روش تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده (MIC) یکی از پرکاربرد ترین روش‌ها است و توسط اکثر محققین به عنوان معیاری برای تعیین فعالیت ضد میکروبی پذیرفته شده است. فاکتورهای متعددی بر روی میزان MIC تاثیر می گذارند از جمله دما، میزان تلقیح و نوع میکروارگانیسم (Lambert, 2000). نتایج مربوط به حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی پپتید لازیوگلوسین III بر روی ۵ باکتری پاتوژن در جدول ۱ نشان داده شده و با آنتی بیوتیک‌های استاندارد مقایسه شده است. نتایج نشان داد کمترین MIC و MBC به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مربوط بود، یعنی این باکتری بیشترین حساسیت به این پپتید را نشان داد. اثر مهار کنندگی این پپتید بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های ونکومایسین، جنتامایسین و سیپروفلو کساسین خیلی بیشتر بود ولی آنتی بیوتیک آمپی سیلین اثر مهار کنندگی بیشتری نسبت به پپتید لازیوگلوسین III بر روی رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* داشت. اثر مهار کنندگی این پپتید بر رشد *سالمونلا تیفی موریوم* تقریبا مشابه اثر آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین بود ولی در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین، کافتازیدیم، پیپراسیلین و جنتامایسین اثر مهار کنندگی بیشتری بر رشد *سالمونلا تیفی موریوم* نشان داد. اثر بازدارندگی پپتید مذکور بر رشد باکتری *انتروکوکوس فکالیس* از آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین، ونکومایسین، جنتامایسین و سیپروفلوکساسین کمتر بود. هر چند اثر کشندگی این پپتید بر *انتروکوکوس فکالیس* از آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین (µg/ml۱۶)، ونکومایسین (µg/ml۲۵۶)، جنتامایسین (µg/ml۱۲۸) و سیپروفلوکساسین (µg/ml۱۶) خیلی بیشتر بود. نتایج MIC بر باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* نشان داد اثر مهار کنندگی پپتید لازیوگلوسین III بر رشد لیستریا خیلی بیشتر از اثر مهار کنندگی آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین، پیپراسیلین و جنتامایسین بود. از بین باکتری‌های مورد بررسی مقاوم‌ترین باکتری به پپتید لازیوگلوسین III باکتری *اشرشیا کلی* بود که هرچند در برابر دو آنتی بیوتیک آمپی سیلین و سیپروفلوکساسین حساستر بود ولی مقاومت بیشتری در برابر آنتی بیوتیک‌های کافتازیدیم، پیپراسیلین و جنتامایسین نشان داد. بررسی نتایج

MBC نشان داد پپتید لازیوگلوسین III در مقایسه با آنتی بیوتیک آمپی سیلین(۱/۶ µg/ml =MBC) اثر کشندگی کمتری بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد. از بین باکتری‌های مورد آزمون حداقل غلظت مهار کنندگی رشد با حداقل غلظت کشندگی رشد پپتید بر علیه باکتری *اشرشیا کلی* یکسان بود (CLSI, 2017). پپتید لازیوگلوسین III همچنین بر روی یوکاریوت های ابتدایی نیز تاثیر بازدارندگی نشان داد به طوری که مخمر *کاندیدا آلبیکانس* در حضور لازیوگلوسین LL III و لازیوگلوسین LL III-D به ترتیب در غلظت‌های ۱۱/۵µM و ۲۱µM به مدت ۳ روز قادر به رشد بود (Vrablikova *et al*., 2017).

در پژوهش انجام شده توسط Mishra *et al*. (2013) اثر ضد میکروبی پپتید لازیوگلوسین III که بصورت شیمیایی سنتز شده بود بر باکتری *اشرشیا کلی* ATCC8739 و *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 6538 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج MIC برای هر دو پاتوژن ۱/۷۵ میکروگرم بر لیتر بود که از نتایج حاصل از پژوهش ما که نوع نوترکیب این پپتید بکار رفته بود خیلی کمتر بود. همچنین آنالیز انجام شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی توسط آن‌ها نشان داد که سلول-های باکتریایی تیمار شده با پپتید لازیوگلوسین III در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده تفاوت-های آشکاری در مورفولوژی غشایی داشتند. آنالیزهای بعدی آن‌ها نشان داد که این پپتید می-تواند باعث تخریب غشای خارجی شود (Mishra *et al*., 2013). با توجه به این‌که مطالعه بر روی اثرات ضد میکروبی این پپتید در ایران و جهان محدود بوده لذا به بررسی موارد مشابه بر روی پپتیدهای دیگر پرداختیم. در مطالعه حاضر نتایج حاکی از آن بود که مقادیر MBC پپتید لازیوگلوسین III بر علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *انتروکوکوس فکالیس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* تقریبا دو برابر مقادیر MIC بود که این یافته‌ها در تطابق با نتایج Ilić *et al*. (2013) بود که بر روی فعالیت ضد میکروبی طیف وسیعی از پپتیدهای ضد میکروبی آزمایشاتی انجام دادند. در پژوهشی Slaninová *et al* (2012) اثر ضد میکروبی پپتید لازیوگلوسین ایزوله شده از زهر زنبور عسل در برابر باکتری-های گرم مثبت و گرم منفی و همچنین سمیت آن‌ها را بر علیه سلول‌های نرمال و سرطانی انسان بررسی کردند. نتایج نشان داد لازیوگلوسین III و یکی ازآنالوگ‌های آن می‌توانند به عنوان داروهای ضد میکروبی بکار روند. بطوری که سمیت ۳ تا ۵ برابر بیشتر بر علیه سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال داشتند. آزمایشات in vivo در موش نیز نشان داد لازیوگلوسین III ترکیبی فعال و غیر سمی می-باشد. (Slaninová *et al*., 2012). در مطالعه انجام شده توسط Ebbensgaard *et al*. (2015)

تاثیر ضد میکروبی پپتیدهایCap11 و Cap18 (که همچون پپتید لازیوگلوسین دارای ساختمان مارپیچ آلفا بودند) بر روی سویه های *E.coli* در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت بیشتر بود در حالی که در این مطالعه تاثیر بازدارندگی پپتید لازیوگلوسین III بر باکتری *E.coli* در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت کمتر بود هر چند اثر کشندگی پپتید لازیوگلوسین III بر باکتری *E.coli*نسبت به لیستریا و انتروکوکوس بیشتر بود. پپتید ملیتین[1] که از زنبور عسل ایزوله شده بود نیز همچون پپتید لازیوگلوسین III فعالیت ضد میکروبی خوبی بر علیه باکتری‌های پاتوژن گرم مثبت بویژه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروکوکوس فکالیس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* داشت. به طوری‌که MIC ملیتین بر علیه هر سه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC29213، *انتروکوکوس فکالیس* ATCC29212 و *لیستریا مونوسیتوژنز* N22-2 ۲-۴ میکروگرم بر میلی لیتر بود. MIC ملیتین بر علیه باکتری *اشرشیا کلی* ATCC25922 ۱۶ میکروگرم بر میلی لیتر بود که تقریبا دو برابر MIC پپتید لازیوگلوسین III بر علیه این باکتری بود. به این معنی که قدرت بازدارندگی پپتید لازیوگلوسین III بر علیه *اشرشیا کلی* دو برابر قدرت پپتید ملیتین بود. علت قدرت بازدارندگی کمتر پپتید ملیتین بر علیه باکتری *اشرشیا کلی* وجود غشای خارجی در باکتری های گرم منفی می باشد که در نتیجه میزان نفوذ اجزای هیدروفوب به لایه لیپوپلی‌ساکارید را محدود می کند(Ebbensgaard *et al*., 2015). در پژوهش دیگری که توسط Ilić *et al*. (2013) صورت گرفت میزان MIC پپتیدهای ADP1، ADP2 و ADP3 در برابر باکتری *اشرشیا کلی* ATCC25922 به ترتیب ۴-۲، ۱و ۴ میکروگرم بر میلی لیتر بود که از MIC پپتید بکار رفته در پژوهش ما کمتر بود. ولی میزان کشندگی پپتید ADP3 بر روی باکتری *اشرشیا کلی* با میزان کشندگی پپتید بکار رفته در این پژوهش تقریبا برابر بود. که تاثیر این پپتیدها در مهار رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC25923 خیلی کمتر از پپتید لازیوگلوسین III بود. همچنین میزان مهار پپتید ADP2 بر روی *سالمونلا تیفی موریوم* خیلی کمتر از پپتید لازیوگلوسین III بود (Ilić *et al*., 2013).

آنچه کاربرد پپتیدهای ضد میکروبی را به عنوان یک عامل ضد باکتری در مواد غذایی و استفاده دارویی با مشکل مواجه می سازد سمیت آن‌ها در برابر سلول‌های یوکاریوت می‌باشد. لذا پپتیدهای ضد میکروبی در کنار خاصیت ضد میکروبی قوی، برای کاربردهای غذایی و دارویی باید از نظر عدم سمیت مورد بررسی قرار بگیرند (Lee *et al*., 2013). در این پژوهش نیز در کنار بررسی ویژگی بازدارندگی رشد و کشندگی پپتید لازیوگلوسین III بر روی باکتری‌های پاتوژن، ویژگی عدم سمیت آن روی سلول‌های کلیه جنین انسان نیز مورد بررسی قرار گرفت. غلظت

[1] Melittin

اولیه برای تست عدم سمیت با ارزیابی سمیت پپتید لازیوگلوسین III تخلیص شده برابر با ۱۶۵۲ میکروگرم بر میلی لیتر بود که در این غلظت که بالاترین مقدار ممکن از پپتید بود هیچ گونه سمیت معناداری مشاهده نشد ($P > 0.05$). این غلظت از پپتید به ترتیب ۴۲۹، ۳۸۳، ۲۹۲، ۲۱۴/۵ و ۱۹۱/۵ برابر بیشتر از MIC باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی موریوم* ، *انتروکوکوس فکالیس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشرشیا کلی* و همچنین به ترتیب ۲۱۴/۵، ۱۹۱/۵، ۱۴۶، ۱۰۷ و ۱۹۱/۵ برابر بیشتر از MBC این باکتری‌ها بود. پپتیدهای لازیوگلوسین در مطالعه Cerovsky *et al*. (2009) اثر سمیت بر روی سلول‌های سرطانی در شرایط in vitro نشان دادند. کمترین غلظت سمیت این پپتید بر روی سلول‌های مخاطی نرمال موش آزمایشگاهی بود که غلظت آن ۱۹µM بود.

نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان از قابلیت رقابت پپتید لازیوگلوسین III با آنتی بیوتیک‌های رایج از نظر خاصیت ضد باکتریایی و کشندگی باکتریایی دارد. با توجه به غلظت چندین برابر بیشتر از MIC و MBC اعمال شده در تست عدم سمیت پپتید لازیوگلوسین III بر روی یک رده سلول انسانی، عدم سمیت پپتید مذکور به اثبات رسید. با ارزیابی‌های تکمیلی و انجام تست‌های عدم سمیت بر روی رده‌های سلولی انسانی دیگر و غلظت‌های مطلوب قابل رقابت با ترکیبات ضد میکروبی متداول می توان چشم انداز روشنی را برای این پپتید به عنوان نگهدارنده مواد غذایی در نظر داشت.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد (معاونت پژوهشی) در قالب طرح شماره ۲/۴۵۸۰۴ انجام گرفت. بدین وسیله مجری طرح از حمایت مالی سپاسگزاری می نماید.

جدول۱- میانگین حداقل غلظت مهار کننده رشد و کشندگی پپتید نوترکیب لازیوگلوسین III در مقایسه با آنتی بیوتیک های متداول بر روی ۵ باکتری پاتوژن (CLSI).

Table 1- The average values of MIC and MBC for lasioglossin LL III recombinant peptide in comparison with commercial antibiotics against five pathogenic bacteria (CLSI).

باکتری Bacteria	حداقل غلظت کشندگی MBC (µg/ml)	حداقل غلظت بازدارندگی MIC (µg/ml)						
		Lasioglossin III	آمپیسیلین Ampicillin	کافتازیدیم Caftazidime	ونکومایسین Vancomycin	پیپراسیلین Piperacillin	جنتامایسین Gentamicin	سیپروفلوکس اسین Ciprofloxacin
استافیلوکوکوس اورئوس *Staphylococcus aureus* (ATCC25923)	7.703±0.57	3.851±0.31	0.5-2	-	≥16	-	≥16	≥16
سالمونلا تیفی موریوم *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028)	8.625±0.15	4.312±0.22	≥32	≥16	-	≥128	≥16	≥4
انتروکوکوس فکالیس *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)	11.31±0.22	5.655±0.24	4	-	4	-	4	1
لیستریا مونوسیتوژنز *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111)	15.406±0.33	7.703±0.43	≥32	-	-	≥128	≥16	-
اشرشیا کلی *Escherichia coli* (ATCC 25922)	8.625±0.09	8.625±0.41	2-8	≥16	-	≥128	≥16	≥4

.

منابع

Bagley C (2014). Potential role of synthetic AMPs in animal health to combat growing concerns of antibiotic resistance - A review. Wyno Academic Journal of Agricultural Sciences 2: 19–28

Brogden KA (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. Nature Reviews Microbiology 3: 238-250

Chopra L, Singh G, Kumar Jena K, Sahoo DK (2015). Senorensin: a new bacteriocin with potential of an anti-biofilm agent and a food biopreservative. Scientific Reports 5: 13412

Cerovsky V, Budesnsky M, Hovorka O, Cvacka J, Voburka Z, Slaninov J, Borovicˇkov L, Fuck V, Bednrov L, Votruba I, Straka J (2009). Lasioglossins: Three Novel Antimicrobial

Peptides from the Venom of the Eusocial Bee Lasioglossum laticeps (Hymenoptera: Halictidae). ChemBioChem 10: 2089 – 2099

Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). M100-S27 (2017). performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-seventh informational supplement. Retrieved January 1, 2017, from https://standards.globalspec.com/std/10066309/m100-s27

Cotter PD, Ross RP, Hill C (2013). Bacteriocins—A viable alternative to antibiotics. Nature Reviews Microbiology 11: 95–105

Ebbensgaard A, Mordhorst H, Toft Overgaard M, Gyrup Nielsen C, Møller Aarestrup F, and Bech Hansen E (2015). Comparative Evaluation of the Antimicrobial Activity of Different Antimicrobial Peptides against a Range of Pathogenic Bacteria. PLoS One 10: e0144611

Espitia P, Soares N, Coimbra J, Andrade N, Cruz R, Medeiros E (2012). Bioactive peptides: synthesis, properties, and applications in the packaging and preservation of food. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 11: 187–204

Ghandehari F, Behbahani M, Pourazar A, Noormohammadi Z (2015). In silico and in vitro studies of cytotoxic activity of different peptides derived from vesicular stomatitis virus G protein. The Iranian Journal of Basic Medical Sciences 18: 47–52

Hintz T, Matthews KK, Di R (2015). The use of plant antimicrobial compounds for food preservation. BioMed Research International 2015: 1-12

Ilić N, Novković M, Guida F, Xhindoli D, Benincasa M, Tossi A, Juretić D (2013). Selective antimicrobial activity and mode of action of adepantins, glycine-rich peptide antibiotics based on anuran antimicrobial peptide sequences. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes 1828: 1004-1012

Koek AG, Bovée LP, van den Hoek JA, Bos AJ, Bruisten SM (2006). Additional value of typing Noroviruses in gastroenteritis outbreaks in Amsterdam, The Netherlands. Journal of Clinical Virology 35: 167-172

Kraszewska J, Beckett MC, James TC, Bond U (2016). Comparative analysis of the antimicrobial activities of plant defensin-like and ultrashort peptides against food-spoiling bacteria. Applied and Environmental Microbiology AEM-00558

Lambert RJW (2000). Susceptibility testing: inoculum size dependency of inhibition using the Colworth MIC technique. Applied and Environmental Microbiology 89: 275-279

Lee MT, Sun TL, Hung WC, Huang HW (2013). Process of inducing pores in membranes by melittin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110: 14243–14248

Marshall SH (2003). Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. Electronic Journal of Biotechnology 6: 271-284

Mishra B, Basu A, Saravanan R, Xiang L, Kai Yang L, and Su Jan Leong S (2013). Lasioglossin-III: antimicrobial characterization and feasibility study for immobilization applications. RSC Advances 3: 9534-9543

Okuda D, Yomogida S, Kuwahara-arai K (2015). Augmentation of the antimicrobial activities of guinea pig cathelicidin CAP11-derived peptides by amino acid substitutions. International Journal of Molecular Medicine 23: 501–508

Slaninová J, Mlsová V, Kroupová H, Alán L, Tůmová T, Monincová L, Borovičková L, Fučík V, Čeřovský V (2012). Toxicity study of antimicrobial peptides from wild bee venom and their analogs toward mammalian normal and cancer cells. Peptides 33:18–26

Vrablikova A, Czernekova L, Cahlikova R, Novy Z, Petrik M, Imran S, Novak Z, Krupka M, Cerovsky V, Turanek J, Raska M (2017). Lasioglossins LLIII affect the morphogenesis

of Candida albicans and reduces the duration of experimental vaginal candidiasis in mice. Microbiology and Immunology 61: 474–481

Wikler MA, Cockerill FR, Bush K, Dudley MN, Eliopoulos GM, Hardy DJ (2009). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. approved standard—eighth edition. Retrieved January, 11, 2018, Clinical and Laboratory Standards Institute, from https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07

Wiegand I, Hilpert K and Hancock REW (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature Protocols 3: 163–175

Study on antibacterial activity and cytotoxicity of recombinant peptide, Lasioglossin III, against foodborne pathogens

Habibi Najafi M.B.[1*], Tanhaian A.[2], Rahnama P.[3], Azghandi M.[4]

[1]Department of Food Science & Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
[2]Ph.D. Student of Agricultural Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
[3]Ph.D. Student of Food Microbiology, Department of Food Science & Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
[4]Ph.D. Student of Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Abstract

The increasing microbial resistance to existing antibiotics has increased the interest in novel antimicrobial compounds. Antimicrobial peptides (AMPs) represent an attractive alternative to classical antibiotics. Lasioglossins are a group of peptides with antimicrobial activity. The inhibitory effects of a recombinant synthetic Lasioglossin, Lasioglossin III, on five food pathogens (Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium, Enterococcus faecalis, Listeria monocytogenes and Escherichia coli) and its cytotoxicity on the normal cell line was investigated in vitro. The findings showed great antimicrobial function of the peptide. Minimum inhibition concentration and minimum bactericidal concentration of Lasioglossin III on the pathogens were the range of 3.851-8.625 and 7.703-15.406, respectively. Results indicated Staphylococcus aureus showed the highest sensitivity to Lasioglossin III. The Lassioglossin demonstrated cytotoxic effect on human embryonic kidney cells in higher concentration (1652 µg/ml) in comparison to MIC and MBC values. The results indicate that this peptide can be competed with common antibiotics in terms of the bactericidal properties.

Keywords: *Lasioglossin III, Antimicrobial peptide, cytotoxicity, food pathogen*.

* Corresponding author: Habibi Najafi M.B. Tel: 051 38805772 Email: habibi@um.ac.ir