بررسی محیط کشت های مختلف بر روی حلالیت پپتید ضدمیکروبی پلی-ال-آرژینین و رشد باکتری *Escherichia coli* O157:H7

محدثه سپاهی[1]، راضیه جلال[1و2]، منصور مشرقی[2و3]

[1] *دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه شیمی، مشهد، ایران*
[2] *دانشگاه فردوسی مشهد، پژوهشکده بیوتکنولوژی، مشهد، ایران*
[3] *دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، مشهد، ایران*
E.mail: razieh@um.ac.ir

چکیده

هدف از این تحقیق، مطالعه اثر محیط کشت های مختلف بر روی حلالیت پلی-ال-آرژینین و رشد باکتری *E.coli* O157:H7 و همچنین بررسی فعالیت ضدباکتریایی پلی-ال-آرژینین بر روی این باکتری در محیط کشت های TSB[1] و PBS[2] حاوی 0/1% گلوکز و پپتون است. بدین منظور رشد 24 ساعته باکتری در هریک از محیط کشت های مورد آزمایش TSB، محیط کشت های حاوی مخلوط پپتون-گلوکز، پپتون- عصاره مخمر، پپتون-گلوکز- نمک، پپتون- عصاره مخمر- نمک، LB[3]، PBS و PBS با درصدهای مختلف از پپتون و گلوکز و همچنین برهمکنش هر یک از محیط های مذکور با پلی-ال-آرژینین (با غلظت 0/25mg/ml) بررسی شد. نتایج نشان داد که باکتری در محیط‌های TSB، LB و PBS با درصد بالایی از پپتون (بیش از 0/1%) به خوبی رشد نموده و پلی-ال-آرژینین در این محیط ها رسوب می کند. به نظر می‌رسد که رسوب مشاهده شده به دلیل برهمکنش پلی-ال-آرژینین با اجزای با بار منفی محیط کشت است. در محیط کشت PBS که حاوی 0/1% پپتون و 0/1% گلوکز بود رشد باکتری و عدم تشکیل رسوب پلی-ال-آرژینین مشاهده شد. حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد MIC پلی-ال-آرژینین در این محیط کشت 0/01562mg/ml بدست آمد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اجزای محیط کشت، تاثیر قابل ملاحظه ای نه تنها بر روی رشد باکتری بلکه حلالیت پلی-ال-آرژینین و فعالیت ضدمیکروبی آن دارد.

کلمات کلیدی: فعالیت ضدمیکروبی، پلی-ال-آرژینین، *E.coli* O157:H7، MIC.

Investigation of the influence of different culture media upon the solubility of poly-l-arginine and growth of Escherichia coli O157:H7

[1]- Tryptic soy broth

[2]- Phosphate buffer saline

[3]- Luria broth

M. Sepahi[1], R. Jalal[1,2], M. Mashreghi[2,3]

[1]*Depatment of Chemistry, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad.91779, Iran.*

[2]*Institute of Biotechnology, Ferdowsi Univesity of Mashhad, Mashhad 91779, Iran.*

[3]*Depatment of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad.91779, Iran.*

E.mail: razieh@um.ac.ir

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the influence of different culture media on poly-l-arginine solubility and growth of E.coli O157:H7. We also investigated the antibacterial activity of poly-l-arginine against E.coli O157:H7 in TSB [1] culture media and PBS[2] (containing 0.1% glucose and 0.1% peptone). For this purpose, this bacteria was cultured in different media cultures (TSB; peptone-glucose, peptone-yeast extract, peptone-glucose-NaCl, peptone-yeast extract-NaCl, LB[3], PBS, and PBS containing different per cent of glucose and peptone) and the number of bacteria cells was determined after 24 hours. The interaction between poly-l-arginine (0.25 mg/ml) and each of the above media was examined. Our results showed that the growth of E.coli O157:H7 in TSB, LB, and PBS with high percent of peptone (> 0.1%) was well but poly-l-arginine was precipitated in these media. It seems that the observed precipitate is due to interaction of poly-l-arginine with negatively charge components of media. Bacterial growth and no precipitation of poly-l-arginine observed in PBS (containing 0.1% glucose and 0.1% peptone). The MIC value of poly-l-arginine in this media was 0.01562 mg/ml. Results of this research showed that the components of media, not only affect on the bacterial growth but also on the solubility of poly-l-aginine and its antimicrobial activity.

Keywords: Antimicrobial activity; Poly-l-arginine; E.coli O157:H7; MIC.

[1]- Tryptic soy broth

[2]- Phosphate buffer saline

[3] - Luria broth

مقدمه

اشرشیاکلی به طور معمول در روده انسان و جانوران به عنوان فلور میکروبی وجود دارد، اما چندین سویه آن باعث بیماری‌های مختلفی در انسان می‌شوند. در سال 1982، برای اولین‌بار *E.coli* O157:H7 به عنوان پاتوژن انسانی شناسایی شد و بیماری‌های مرتبط با آلودگی موادغذایی توسط این باکتری پیوسته در حال افزایش است. این باکتری متعلق به گروه اشرشیاکلی انتروهموراژیک (EHEC)[1] می‌باشد. EHEC توکسین‌هایی تولید می‌کند که منجر به اسهال، کولیت هموراژیک و سندروم اورمی همولیتیک در انسان می‌شوند. به نظر می‌رسد منبع اصلی این پاتوژن دام ها باشند واساساً از طریق غذاهای آلوده به این باکتری مثل گوشت خام یا خوب پخته نشده و یا شیر خام به انسان منتقل می‌گردد. انواع بسیاری از غذاها به عنوان ناقل *E.coli* O157:H7 مطرح هستند که شامل گوشت، شیر، ماست، عصاره میوه‌ها، پنیر و سبزیجات اند [1و2].

با افزایش تمایل برای محدود کردن استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی غذایی، توجه زیادی به استفاده از راهکارهای دیگری ایجاد شده است. چندین پپتید ضدمیکروبی تاکنون مطالعه شده و به طریق تجاری برای کاربردهای غذایی به کار گرفته شده است که از جمله آن‌ها پروتامین و نیسین است. پروتامین پپتید ضدمیکروبی بسیار کاتیونی است که از 31 آمینواسید تشکیل شده که 20 آمینواسید آن آرژینین است و برای نگهداری انواع متنوعی از غذاها مانند تنقلات، میوه‌ها و برنج استفاده می شود [3-7]. از دیگر پپتیدهای ضدمیکروبی کاتیونی پلی-ال-آرژینین است که هوموپلیمری از آمینواسید ال-آرژینین می‌باشد. به دلیل وجود گروه گوانیدو با بار مثبت در زنجیر جانبی ال-آرژینین، این ماده به عنوان یک پلی‌آمینواسید کاتیونی با دانسیته بالایی از بارهای سطحی مثبت مورد توجه واقع شده است. هوموپلیمرهای آمینواسیدهای با بار مثبت توانایی زیادی در افزایش نفوذپذیری غشای سلول دارند [8-10].

در این تحقیق اثر محیط کشت های مختلف بر روی حلالیت پلی-ال-آرژینین و رشد باکتری *E.coli* O157:H7 مورد بررسی قرار گرفت و همچنین فعالیت ضدباکتریایی پلی-ال-آرژینین بر روی این باکتری در محیط کشت های TSB و PBS حاوی 0/1% گلوکز و پپتون مطالعه شد.

مواد و روش کار

سویه باکتری

E.coli O157:H7 از آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه فردوسی مشهد دریافت شد.

[1] Enterohaemorrajic *Escherichia coli*

مواد شیمیایی

پلی-ال-آرژینین با وزن مولکولی Da 5000-15000 از شرکت Sigma خریداری شد. محلول استوک پلی-ال-آرژینین با حل کردن 1 mg از پلی-ال-آرژینین در 1ml ازآب دیونیزه بدست آمد. این محلول برای تهیه غلظت‌های مورد نظر از پلی-ال-آرژینین به کار گرفته شد.

رشد باکتری در محیط کشت های مختلف

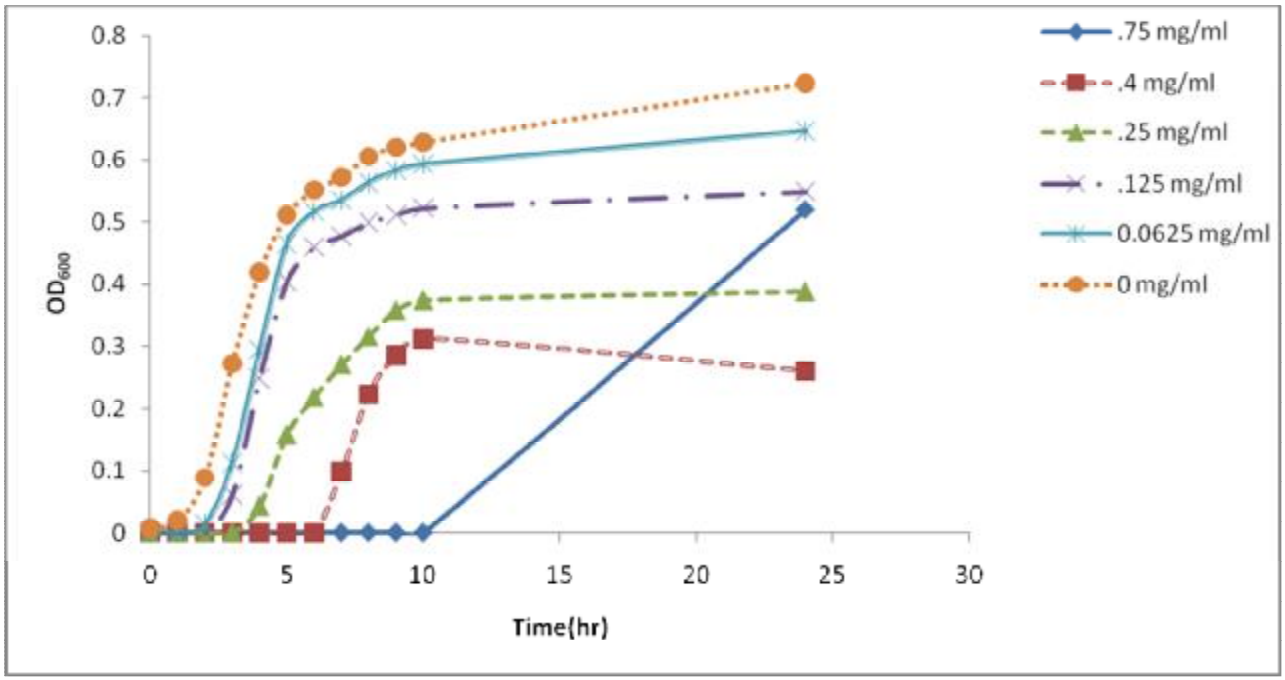
باکتری *E.coli* O157:H7 در محیط کشت TSB در دمای 37 درجه به مدت یک شبانه روز کشت داده شد. کشت تازه‌ای از باکتری در محیط کشت TSB در مدت 3-4 ساعت بدست آمد. جذب نمونه باکتری با توجه به جذب مک‌فارلند1 خوانده شد و تعداد 10^6Cells/ml به هریک از محیط کشت های مورد آزمایش (جدول 1) اضافه گردید و دانسیته نوری در طول موج 600 nm پس از 24 ساعت اندازه گیری شد.

تعیین MIC پلی -ال -آرژینین

1ml از کشت تازه باکتری در 5000 دور به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ گردید و رسوب در TSB یا PBS استریل سوسپانس شد. تعداد 10^6 Cells/ml از سوسپانیون سلولی به هر یک از دو محیط کشت حاوی پلی-ال آرژینین با غلظت‌های 0/75mg/ml-0/0039 اضافه گردید. کشت در 37 درجه به مدت 24 ساعت انکوبه شد. دانسیته نوری نمونه باکتریایی با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج 600 nm در فواصل زمانی 0،2،4،6،8،10و24 ساعت خوانده شد. همه آزمایشات سه بار تکرار شد.

نتایج

محیط کشت انتخابی اول، محیط کشت TSB بود، باکتری *E.coli* O157:H7 به این محیط کشت تلقیح گردید و اثر غلظت‌های مختلف پلی-ال-آرژینین در این محیط بر روی رشد باکتری بررسی شد. همانطور که در شکل 1 مشاهده می شود هیچیک از غلظت‌های مختلف پلی-ال-آرژینین مانع رشد باکتری نشده و باکتری در کلیه ی غلظت های پلی-ال-آرژینین با فواصل زمانی متفاوت رشد کرده است. غلظت‌های مختلف پلی-ال-آرژینین به محیط کشت TSB فاقد باکتری افزوده شد و مشاهده گردید که در تمام غلظت‌های پلی-ال-آرژینین محیط کشت TSB کدر شده و میزان کدورت با افزایش غلظت پلی-ال-آرژینین افزایش می یابد.



شکل1. رشد *E.coli* O157:H7 در محیط کشت TSB در حضور و عدم حضور غلظت‌های مختلف پلی-ال-آرژینین.

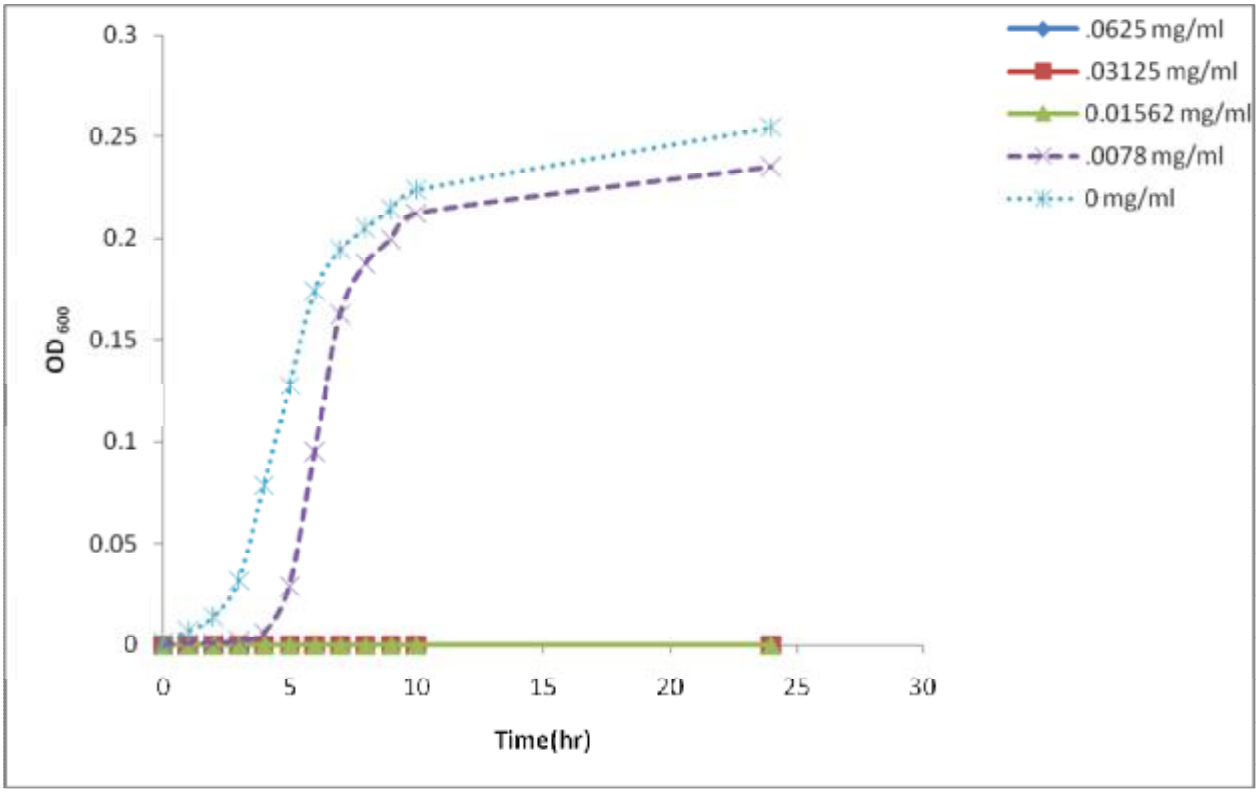
به منظور به دست آوردن محیط کشت مناسب برای رشد باکتری *E.coli* O157:H7 به نحوی که پلی-ال-آرژینین در آن رسوب نکند، رشد باکتری در محیط کشت های مختلف با رشد باکتری در TSB مقایسه گردید(جدول1).

جدول1. بررسی رشد باکتری *E.coli* O157:H7 و میزان رسوب دهی پلی-ال-آرژینین (0/25mg/ml) در محیط کشت های انتخابی .

محیط کشت مایع	تعداد سلول/ml	میزان تشکیل رسوب
TSB	28×10^8	+++
LB	$19/4\times10^8$	++
0.5%Peptone+0.2%Yeast extract+0.5%Nacl	$14/3\times10^8$	++
0.5%Peptonr+0.2%Yeast extract	$17/4\times10^8$	++
0.5%Petone+0.2%Glucose+0.5%Nacl	$16/6\times10^8$	+
0.5%Peptone+0.2%Glucose	$15/1\times10^8$	+
PBS	-	-
PBS+ 0.1% Glucose	2×10^8	-
PBS+0.5% Peptone+0.1% Glucose	$13/3\times10^8$	+

PBS+0.25% peptone+0.1% Glucose	$12/6\times10^{8}$	+
PBS+0.1% Peptone+0.1% Glucose	12×10^{8}	-

در محیط کشت های حاوی مخلوط پپتون-گلوکز، پپتون- عصاره مخمر، پپتون-گلوکز- نمک، پپتون- عصاره مخمر- نمک و LB رشد باکتری خوبی مشاهده شد. افزودن پلی-ال-آرژینین با غلظت 0/25 mg/ml به هر یک از محیط کشت های مورد آزمایش فاقد باکتری باعث کدورت محیط کشت و تشکیل رسوب شد. تشکیل رسوب محیط PBS مشاهده نگردید و رشد باکتری بسیار کم بود. به منظور افزایش رشد باکتری در PBS درصدهای مختلفی از پپتون و گلوکز به PBS اضافه شد و در هر مورد رشد باکتری و برهمکنش محیط با پلی-ال-آرژینین (با غلظت 0/25 mg/ml) مورد بررسی قرار گرفت. در محیط‌های PBS که حاوی درصد بالایی از پپتون (بیش از 0/1%) بودند، رشد باکتری و تشکیل رسوب هر دو مشاهده شد. در محیط کشت PBS که حاوی 0/1% پپتون و 0/1% گلوکز بود رشد باکتری و عدم تشکیل رسوب پلی-ال-آرژینین در این محیط مشاهده شد. MIC پلی-ال-آرژینین در این محیط کشت 0/01562mg/ml بدست آمد(شکل2).



شکل2. رشد *E.coli* O157:H7 در محیط کشت PBS حاوی 0/1% گلوکز و پپتون درحضور و عدم حضور غلظت‌های مختلف پلی -ال -آرژینین.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه، اثر محیط کشت های مختلف بر روی حلالیت پپتید ضدمیکروبی پلی-ال-آرژینین و رشد باکتری *E.coli* O157:H7 بررسی شد. در محیط کشت TSB افزودن غلظت‌های مختلف پلی-ال-آرژینین به محیط منجر به رسوب پلی-ال-آرژینین و کدورت محیط شد. به نظر می‌رسد علت تشکیل رسوب برهمکنش پلی-ال-آرژینین با اجزای با بار منفی محیط کشت باشد همچنانکه در محیط‌های انتخابی مشابه که حاوی درصدهای بالایی از پپتون وعصاره مخمر هستند پلی-ال-آرژینین رسوب کرد.

در این مطالعه مشخص شد که اجزای محیط کشت روی رشد باکتری، حلالیت پلی-ال-آرژینین و فعالیت ضدمیکروبی آن تأثیرگذار است. پلی-ال-آرژینین در محیط PBS حاوی پپتون با غلظت 0/1% فعالیت ضدباکتریایی از خود نشان داد.

منابع

1. Mohammadi, K.; Karim, G.; Razavilar, V.; Hanifian, S. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University*. **2009**, 10(4), 346-351.

2. Deng, Y.; Ryu, J.H.; Beuchat, L.R. *Int J Food Microbiol*. **1998**, 45, 173–184.

3. Potter, R.; Hansen, L.T.; Gill, T.A. *Int J Food Microbiol*. **2005**, 103, 23-34.

4. Kuwano, K.; Tanaka, N.; Shimiz, T.; Nagatoshi, K.; Noub, S.; Sonomotoc, K. *Int J Antimicrob Agents*. **2005**, 26, 396-402.

5. Hansen, L.T.; T.A.Gill. *J Appl Microbiol*. **2000**, 88, 1049-1055.

6. Conte, M.; Aliberti, F.; Fucci, L.; Piscopo, M. *World J Microbiol Biotechnol*. **2007**, 23, 1679-1683.

7. Grisi, T.C.S. de L.; Gorlach-Lira, K. *Braz J Microbiol*. **2005**, 36, 151-156.

8. Rawat, A.; Yang, T.; Hussain, A.; Ahsan, F. *Pharm Res*. **2007**, 25(4), 936-948.

9. Schwieger, C.; Blume, A. *Biomacromolecules*. **2009**, 10, 2152–2161.

10. Mitchell, D.J.; Kim, D.T.; Steinman, L.; Fathman, C.G.; Rothbard, J.B. *J Peptide Res*. **2000**, 56, 318-325.