

## مقاله تحقیقی

### غربال‌گری مولکولی ژن پپتید سنتتاز غیر ریبوزومی و مطالعه فعالیت آنتی‌بیوتیکی در دو اکتینوماست جدا شده از خاک‌های ایران

فائزه فلاح قهرودی<sup>۱</sup>، جواد حامدی<sup>۲\*</sup>، زرغام سپهری‌زاده<sup>۳</sup>، فاطمه محمدی‌پناه<sup>۲</sup>، حمید مقیمی<sup>۴</sup>، انسبه صالح قمری<sup>۴</sup>

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران
۲. دانشگاه تهران، مرکز پژوهشی کلکسیون میکروارگانیسم‌ها، تهران، ایران
۳. دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، آزمایشگاه بیوتکنولوژی دارویی، تهران، ایران
۴. دانشگاه تهران، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، تهران، ایران

\*مسئول مکاتبات: جواد حامدی، مرکز پژوهشی کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشگاه تهران  
تهران، صندوق پستی ۶۴۵۵-۱۴۱۵۵، تلفن: ۶۶۴۱۵۴۹۵، نمابر: ۶۶۴۱۵۰۸۱، پست الکترونیکی: [jhamed@ut.ac.ir](mailto:jhamed@ut.ac.ir)

محل انجام تحقیق: مرکز پژوهشی کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۱۸

تاریخ پذیرش: ۹۰/۶/۲۶

## چکیده

اکتینوماست‌ها از جمله جمعیت‌های اصلی میکروبی خاک هستند که در دیگر زیستگاه‌های طبیعی نیز به وفور یافت می‌شوند. این باکتری‌های رشته‌ای، مهم‌ترین منابع تولید متابولیت‌های جدید محسوب می‌شوند. پپتیدهای غیرریبوزومی، از جمله متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که به کمک گروه‌های آنزیمی ویژه‌ای با عنوان پپتید سنتتاز مستقل از ریبوزوم، non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) تولید می‌شوند. اعضای این گروه آنزیمی، شامل پروتئین‌های چند بخشی هستند که محدوده وسیعی از محصولات دارای فعالیت‌های متنوع، از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها، داروهای سرکوب‌گر سیستم ایمنی و سیدروفورها را تولید می‌کنند. در این پژوهش برای اولین بار به روش غربال‌گری مولکولی، حضور پپتید سنتتاز غیرریبوزومی در میان اکتینوماست‌های بومی ایران، مورد بررسی قرار گرفته است. به این منظور، ۱۸ اکتینوماست جدا شده از خاک‌های مناطق مختلف ایران، جدا و DNA آن‌ها با روش تغییر یافته رسوب با نمک استخراج شد. به منظور جداسازی ژن مولد NRPS در این باکتری‌ها، یک جفت پرایمر هتروژن، انتخاب و واکنش PCR، به منظور یافتن ژن NRPS در میان نمونه‌های DNA استخراج شده انجام شد. تعیین توالی محصولات به دست آمده، وجود NRPS را در ۲ جدایه تأیید کرد. آنالیز ترادف ژن ۱۶SrRNA سویه‌های UTMC01046 و UTMC00428 به ترتیب با *Streptomyces rectiviolaceus* DG026660، ۹۹/۵۷ درصد و با *Streptomyces rubiginosohelvolus* AB184240، ۱۰۰ درصد شباهت را نشان می‌دهد. این دو باکتری، فعالیت ضد میکروبی مناسبی علیه باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و مخمرها داشته‌اند، ولی بر *Aspergillus niger* بی‌اثر بوده‌اند.

واژه‌های کلیدی: اکتینوماست‌ها، آنتی‌بیوتیک، غربال‌گری مولکولی، ژن پپتیدهای غیرریبوزومی

## مقدمه

خاک از نظر زیستی، فیزیکی و تغذیه‌ای، یک محیط متغیر و پیچیده است. اکتینومایست‌ها از جمله باکتری‌های مهم خاک هستند که از نظر تولید متابولیت‌های ثانویه، بسیار اهمیت دارند. این باکتری‌ها منبع تولید بیش از ۸۵ درصد آنتی‌بیوتیک‌ها بوده (۱) و نیز دارای توانمندی‌های ویژه‌ای در تولید دیگر فرآورده‌های فعال زیستی، مانند آنتی‌بیوتیک‌ها (۲)، مهارکننده سیستم ایمنی (۳) و داروهای ضدسرطان هستند. فرآورده‌های حاصل از این باکتری‌ها در درمان بیماری‌های ناشی از اختلال فیزیولوژیک، به کار می‌رود (۴). در سال‌های اخیر، توانمندی این باکتری‌ها در مهار پلاک‌های بتامیلوئیدی در سلول‌های عصبی و درمان آلزایمر به اثبات رسیده است (۵).

به طور کلی از حدود ۲۳۰۰۰ متابولیت ثانویه فعال زیستی تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها، حدود ۴۵ درصد از آن‌ها توسط اکتینومایست‌ها تولید می‌شوند (۶). با افزایش توجه عمومی به تنوع زیستی و ژنتیکی از سال ۲۰۰۰ به بعد، تلاش دانشمندان امروزه روی برنامه‌های غربال‌گری میکروارگانیسم‌ها و به خصوص اکتینومایست‌ها به دلیل قابلیت ویژه آن‌ها بیشتر شده است (۷).

آنتی‌بیوتیک‌های پپتیدی، از مهم‌ترین ترکیبات زیستی فعال هستند که به دو روش ریبوزومی و مستقل از ریبوزوم، ساخته می‌شوند. پپتیدهای غیرریبوزومی که توسط آنزیم پپتید سنتتاز غیرریبوزومی *NRPSnon-ribosomal peptide synthetase* (synthetase) سنتز می‌شود، شامل خانواده‌ای متنوع از محصولات طبیعی با محدوده وسیعی از فعالیت‌های زیستی است. از این گروه می‌توان به داروهای سرکوب‌گر ایمنی، بیوسورفاکتانت‌ها، سیدروفورها (۷)، عوامل بیماری‌زا، ترکیبات ضد میکروبی و ترکیبات ضد سرطان اشاره کرد (۸). آنتی‌بیوتیک‌های بلئومایسین و ونکومایسین، دو گروه مهم از آنتی‌بیوتیک‌های پپتیدی غیرریبوزومی هستند.

آنزیم‌های سازنده پپتیدهای غیرریبوزومی، یک کمپلکس آنزیمی متشکل از بخش‌های جداگانه است

که هر کدام مسؤول اتصال یک مونومر مشخص به محصول پپتیدی نهایی است. در سنتز همه پپتیدهای غیرریبوزومی، سه بخش وجود دارد که برای طول‌سازی پپتیدها ضروری است. بخش آدنیلاسیون (A)، پروتئین حامل پپتیدیل (PCP) یا تیولاسیون و بخش متراکم کردن (C)، که به ترتیب، کار شناسایی سوبسترا و فعال‌سازی، تکثیر زنجیره پپتیدی در حال رشد و انتقال به مرکز کاتالیتیک مربوطه و شکل‌گیری پیوند پپتیدی برای سنتز اسکلت پپتیدی را بر عهده دارند، بنابراین یک بخش اساسی هر واحد NRPS هستند. چهارمین واحد کاتالیتیک ضروری پپتیدهای غیرریبوزومی، که با جدا کردن محصول از آنزیم در ارتباط است، بخش تیواستراز (TE) است. بخش TE که در واحد خاتمه قرار دارد و رهایی پپتید را توسط هیدرولیز یا حلقوی کردن محصول، کاتالیز می‌کند (۹). هدف اصلی این پژوهش، غربال‌گری جدایه‌های اکتینومایست جدا شده از خاک‌های ایران و بررسی فراوانی ژن *NRPS* به روش مولکولی است.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌های خاک

تعداد ۱۸ نمونه خاک از زیستگاه‌های متنوع و طبیعی از مناطق مختلف کشور از عمق ۳ تا ۲۰ سانتی‌متری از سطح خاک، جمع‌آوری و در دمای ۴°C نگهداری شد. هر نمونه خاک به منظور آزاد شدن اسپورهای اکتینومایست متصل به ذرات خاک، با کوبیدن به صورت پودر درآمد. سپس هر نمونه، از الک با قطر منافذ ۲mm عبور داده شد. نمونه‌های آماده شده خاک، در پلیت شیشه‌ای سترون ریخته شد و در معرض هوای آزمایشگاه به مدت ۷۲ ساعت خشک گردید.

### محیط‌های جداسازی اکتینومایست‌ها و کشت

#### نمونه‌های خاک

رقت‌های مناسب از نمونه‌های خاک آماده شده در محیط‌های گلیسرول-آرژینین آگار و AV آگار

سلول‌ها، از SET buffer 567 (75mM)  $\mu$ l NaCl; 25 mM EDTA pH 8; 20 mM 50 mg/  $\mu$ l, Tris-HCl لیزوزیم با غلظت 50 mg/ml، از پروتئیناز K با غلظت 20 mg/ml به همراه  $\mu$ l 60 از محلول SDS 10 درصد استفاده شد. فرآیند پروتئین‌زدایی توسط محلول NaCl 5M و کلروفرم انجام شد. به منظور رسوب دادن DNA، 1/6 حجم ایزوپروپانول اضافه شد و سپس ویال به مدت 30-15 دقیقه در 20- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در نهایت به منظور حذف بقایای نمک و رطوبت، الکل 70 درصد اضافه شد. به منظور حل کردن رسوب DNA،  $\mu$ l 100 از بافر TE (Tris 10 mM، EDTA 1 mM، pH 8) استفاده شد.

#### تأیید استخراج DNA

به منظور تأیید عمل استخراج DNA، الکتروفورز با ژل آگارز 1 درصد و جریان 7 ولت بر سانتی‌متر به مدت 30 دقیقه انجام شد. در نهایت، ژل با محلول اتیدیوم برمایید با غلظت 1  $\mu$ g/ml رنگ‌آمیزی شد و در زیر نور UV با طول موج 254 نانومتر، از لکه‌ها عکس برداری شد.

#### غربال‌گری و آنالیز ژن‌های 16SrRNA و NRPS

برای تکثیر ژن NRPS و ژن 16SrRNA از میان نمونه‌های DNA اکتینومیست‌ها از پرایمرهای پیشنهاد شده توسط Sacido (14) و Kumar (15) استفاده شد.

(10) کشت داده شد. محیط‌های کشت به مدت 21 روز در دمای 28°C گرماگذاری شد. به منظور جلوگیری از رشد قارچ‌ها روی محیط‌های جداسازی، به تمامی محیط‌های کشت، پس از اتوکلاو کردن، 100  $\mu$ g/ml آنتی‌بیوتیک سیکلوهگزیمید سترون شده با صافی 0.45  $\mu$ m اضافه شد.

#### خالص‌سازی و نگهداری سویه‌های اکتینومیست

##### جداسازی شده

پس از طی مدت زمان گرماگذاری، کلنی‌های اکتینومیست رشد یافته بر روی محیط‌های جداسازی، انتخاب شد و کشت خالص از آن‌ها روی محیط ISP2 (عصاره مخمر 4 g/l - عصاره مالت 10 g/l - گلوکز 4 g/l - آگار 15 g/l) با pH 7/3 تهیه شد. (11)

##### استخراج DNA

به منظور استخراج DNA، جدایه‌ها در یک محیط غنی (گلیسرول 20 گرم در لیتر، پیتون 10 گرم در لیتر و عصاره مالت 30 گرم در لیتر) (12) به مدت 5-2 روز در دمای 28 درجه سانتی‌گراد و دور 220 rpm رشد داده شده و زیست توده حاصل، به منظور استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج DNA، طبق روش رسوب با نمک پیشنهاد شده توسط Kieser در سال 2000 (13) با کمی تغییر مورد استفاده قرار گرفت. مقدار 20-10 میلی‌گرم زیست توده با محلول EDTA با غلظت 10 mM و pH 8 شسته شد. به منظور تخریب

جدول 1- توالی‌های پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های NRPS و 16SrRNA و دمای اتصال آن‌ها.

مرجع	دمای اتصال (C°)	اندازه ژن	توالی پرایمر (5'→3')	پرایمر	ژن تکثیر شده
15	66/9	700 Bp	GCSTACSYSATSTACACSTCSGG	A3F	NRPS
	64/6		SASGTCVCCSGTSCGGTAS	A7R	
16	60/9	1500 bp	AAG AGT TTG ATC ATG GCT CAG	9F	16SrRNA
	67		AGG AGG TGA TCC AAC CGC A	1541R	

پرایمرها، 0.15 mM از dNTPs، 50-100 ng/ $\mu$ l از Taq از DNA استخراج شده، 2U آنزیم

برای واکنش PCR، مخلوط واکنش با حجم نهایی 60  $\mu$ l شامل، 1-0.5  $\mu$ M از هر کدام از

در روش استفاده از محیط جامد، قطعاتی به قطر خارجی ۸۵ میلی‌متر و ارتفاع ۵ میلی‌متر از اکتینومایست‌های رشد کرده در محیط ISP2، در روزهای هفتم و دهم برداشته شد و روی محیط‌های تلقیح شده با سویه‌های استاندارد مورد نظر قرار گرفت. سپس پلیت‌ها به منظور انتشار ماده ضد میکروبی، به مدت ۸-۴ ساعت در یخچال قرار داده شد و سپس به انکوباتور ۳۷ درجه منتقل گردید. بعد از ۲۴-۱۸ ساعت، قطر نواحی عدم رشد در اطراف قطعات آگار به وسیله کولیس با دقت ۰/۱ میلی‌متر، اندازه‌گیری و میانگین سه تکرار در مورد هر نمونه، ثبت شد.

در روش بررسی اثر ضد میکروبی جدایه‌های منتخب در محیط مایع، جدایه‌های منتخب پس از رشد روی محیط ISP2 آگاردار، به محیط‌های پیش‌کشت شامل ISP2 برات و محیط پیشنهاد شده توسط Reading and Cole, 1977 تلقیح و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳-۲ روز انکوباسیون شد. با مشاهده هیف‌های در حال تکثیر و عدم حضور اسپور، ۵ درصد حجمی از محیط مناسب به محیط تولید تلقیح شد. بررسی فعالیت آنتی‌بیوتیکی در مایع تخمیر در روز پنجم با استفاده از سیلندرهایی با ارتفاع ۱۰ میلی‌متر، قطر داخلی ۶ میلی‌متر و قطر خارجی ۸ میلی‌متر، انجام شد. بعد از ۲۴-۱۸ ساعت قطر نواحی عدم رشد در اطراف سیلندرها به وسیله کولیس با دقت ۰/۱ میلی‌متر اندازه‌گیری و میانگین سه تکرار در مورد هر نمونه ثبت شد (۱۷).

در روش سنجش فعالیت آنتی‌بیوتیکی در عصاره محیط کشت استخراج شده با حلال، مایع تخمیر حاصل از کشت جدایه‌ها در محیط تولید در روزهای سوم، پنجم و هفتم با حجم مساوی حلال اتیل‌استات استخراج شد. حلال استخراج در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و فشار کم، تبخیر و دیسک‌های کاغذی حاوی بخش استخراج شده، تهیه گردید. فعالیت ضد میکروبی دیسک‌ها با استفاده از سویه‌های استاندارد در محیط جامد سنجیده شد. در این روش به منظور مقایسه بیشترین میزان فعالیت در روزهای مختلف، عصاره حاصل در روزهای سوم، پنجم و

polymerase با بافر ۱x و ۱mM از  $MgCl_2$  به همراه روغن معدنی و ۱۰ درصد DMSO تهیه شد (این مواد از شرکت سیگما تهیه شد). به منظور پیدا کردن دمای اتصال مناسب پرایمرها، از روش PCR با شیب دمایی استفاده شد. واسرشت اولیه دو رشته DNA در دمای ۹۵ درجه و مدت زمان ۵ دقیقه انجام شد و ۳۵ چرخه تکثیر شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۲ دقیقه در ۶۲-۵۲ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از این مراحل، محصول PCR به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به منظور تکمیل نهایی سنتز DNA نگه داشته شد. محصول PCR به منظور بررسی‌های بعدی، در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. تعیین توالی محصولات PCR توسط شرکت ماکروژن کره انجام شد و توالی ژن‌ها با ژن‌های ثبت شده در بانک ژنی مورد مقایسه قرار گرفت.

#### بررسی اثر آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های منتخب

به منظور بررسی طیف فعالیت ضد میکروبی جدایه‌ها، از ۵ گونه میکروارگانیزم استاندارد، *Bacillus subtilis* UTMC 01416، *Pseudomonas* 01404، *aeruginosa* MRSA UTMC 01401 (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) UTMC 01431، *Candida albicans* UTMC 01430 و *niger* استفاده شد. کشت‌های ۲۴ ساعته از باکتری‌ها روی محیط نوترینت آگار، کشت ۲۴ ساعته از مخمر و ۹۶ ساعته قارچ روی محیط PDA تهیه شد. به این منظور، سوسپانسیون با غلظت حدود  $10^8 \times 1/5$  سلول در هر میلی‌لیتر از سویه‌های باکتریایی و مخمیری در سرم فیزیولوژیک تهیه شد و مقدار ۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون در سطح محیط‌های مولر هینتون برای باکتری‌ها و PDA برای قارچ، گسترانیده شد (۱۶). برای بررسی اثر ضد میکروبی جدایه‌های منتخب، از سه روش محیط جامد، مایع و سنجش فعالیت آنتی‌بیوتیکی در عصاره استخراج شده با حلال، استفاده شد.

Maximum Likelihood و Parsimony بررسی شد (۱۸). بررسی اعتبار شاخه‌های درخت رسم شده برای باکتری‌ها، با استفاده از نرم‌افزار Bootstrap analysis صورت گرفت. برای مقایسه توالی‌های *NRPS* از توالی موجود در پایگاه اطلاعات ژنومی GenBank و نرم‌افزار Blast استفاده شد.

### نتایج

#### جداسازی اکتینوماست‌ها و غربال‌گری ژن *NRPS*

روی ۱۸ سویه جداسازی شده از خاک، پس از انجام PCR، نوارهایی با اندازه حدود ۷۰۰ bp به عنوان ژن تکثیر شده *NRPS* در نظر گرفته شد و غربال‌گری مولکولی صورت گرفت. نتایج آزمایش‌های انجام شده در مورد ۱۸ جدایه اکتینوماست، وجود ژن *NRPS* را در ۲ سویه نشان داد. مکان جداسازی، نوع تیمار و نوع محیط کشت به کار رفته برای دو سویه دارای ژن و نیز سویه TMC00893، به عنوان یکی از سویه‌های فاقد این ژن، در جدول ۲ و ژن تکثیر شده، در تصویر ۱ آورده شده است.

هفتم، تغلیظ شد و پس از تهیه دیسک از عصاره حاصل، هر دیسک روی محیط مولر هینتون و یا PDA که از قبل با میکروارگانسیم پاتوژن کشت داده شده بود، قرار گرفت و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور گرم‌گذاری شد.

#### آنالیز بیوانفورماتیک

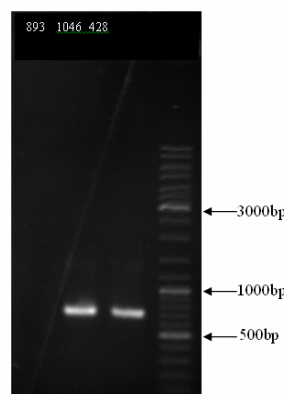
توالی ژن‌های ۱۶SrRNA و *NRPS* با استفاده از نرم‌افزار BioEdit، مرتب شد و سپس توسط برنامه Chromas pro مورد بررسی قرار گرفت.

برای مقایسه توالی ژن‌های ۱۶SrRNA سویه‌ها با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعات ژنومی GenBank و نیز سایت EzTaxon، از نرم‌افزار Blast استفاده شد. ترتیب‌بندی توالی سویه‌های مورد بررسی با توالی‌های مرتبط با هر کدام از جنس-ها، با استفاده از نرم‌افزار ClustalX انجام گرفت. سپس درخت فیلوژنی پس از مرتب کردن توالی ژن 16 SrRNA گونه‌های نزدیک با هر جنس در نرم-افزار ClustalX با استفاده از نرم‌افزار Mega و به روش Maximum Neighbor Joining.

جدول ۲- دو باکتری جدا شده دارای ژن *NRPS* و یک نمونه فاقد این ژن و محل جداسازی از خاک آن‌ها.

نام باکتری	محل جداسازی	محیط جداسازی
UTMC00428	خاک‌های شنی همدان	AV agar
UTMC01046	ریزوسفر خاک‌های اصفهان	GAC agar
UTMC00893	مناطق غیر ریزوسفری فارس	AV agar

بررسی توالی‌ها و مقایسه آن‌ها با ژن‌های *NRPS* ثبت شده در GenBank، نشان می‌دهد که دو سویه UTMC00428 و سویه UTMC01046، دارای ترادف ژن *NRPS* بوده و این ترادف به ترتیب با ۷۲ درصد و ۹۱ درصد، مشابهت با ژن‌های ثبت شده در بانک‌های ژنی را داشته‌اند (جدول ۳).



تصویر ۱- تکثیر ژن *NRPS* در ۳ جدایه اکتینوماست.

جدول ۳ - سویه‌های اکتینومایست دارای ژن *NRPS*

شماره دسترسی در GenBank	نزدیک‌ترین باکتری از نظر شباهت در ژن <i>NRPS</i>	میزان شباهت در ژن	کد سویه جدا شده
AB432438.1	<i>Streptomyces kitasatoensis</i>	۷۲ درصد	UTMC00428
AP009493.1	<i>Streptomyces griseus subsp. griseus</i>	۹۱ درصد	UTMC01046

این سویه‌ها به ترتیب با *Streptomyces* AB184240 و *rectiviolaceus* DG026660 و *Streptomyces rubiginosohelvolus* ۹۹/۵۷، درصد و ۱۰۰ درصد شباهت دارند (جدول ۴).

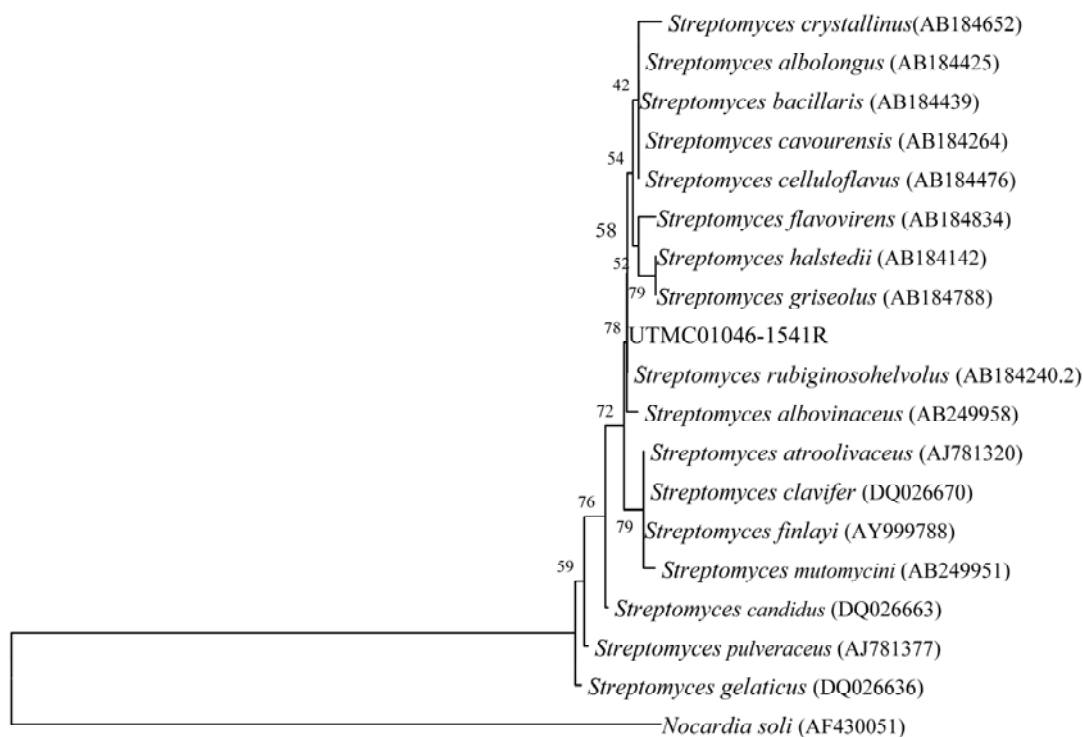
تعیین توالی ژن SrRNA16 نتایج حاصل از تعیین توالی ترادف‌های ژن SrRNA16 دو سویه دارای ژن *NRPS* در بانک ژنی EzTaxon نشان می‌دهد که

جدول ۴ - میزان تشابه جدایه‌های دارای ژن *NRPS* با اکتینومایست‌های ثبت شده بر اساس ترادف ژن ۱۶SrRNA.

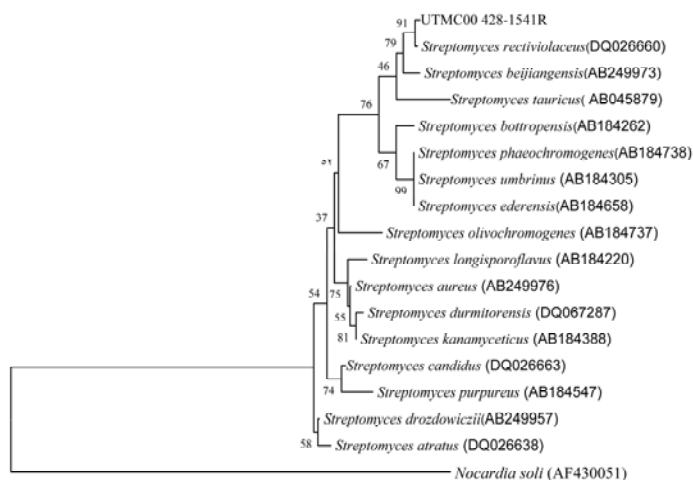
نام سویه	شماره دسترسی در GenBank	نزدیک‌ترین خویشاوند باکتری از نظر تکاملی ژن ۱۶SrRNA	میزان تشابه در ترادف
UTMC00428	DG026660	<i>Streptomyces rectiviolaceus</i>	۹۹/۵۷۴ درصد
UTMC01046	AB184240	<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i>	۱۰۰ درصد

ثبت شده در بانک ژنی EzTaxon نشان داده شده است.

در تصاویر ۲ و ۳، درخت فیلوژنتیک سویه‌های فوق و میزان خویشاوندی آن‌ها با نزدیک‌ترین سویه‌های



تصویر ۲ - دندروگرام ژن ۱۶SrRNA و موقعیت فیلوژنتیک جدایه UTMC01046.



تصویر ۳- دندروگرام ژن *StrRNA* ۱۶ و موقعیت فیلوژنیک جدایه UTMCO0428.

### نتایج بررسی فعالیت ضد میکروبی سویه‌های

#### مولد ژن *NRPS* در محیط مایع

در جدول ۶، فعالیت ضد میکروبی دو جدایه UTMCO0428 و UTMCO1046 در محیط مایع نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، فعالیت ضد میکروبی این سویه‌ها در محیط مایع، بهتر است و در این شرایط، جدایه‌های فوق، علیه باکتری‌های گرم منفی و مخمرها نیز فعالیت داشته‌اند. در هر صورت، این دو جدایه، علیه *Aspergillus niger* بی‌اثر بوده‌اند.

### نتایج بررسی فعالیت ضد میکروبی سویه‌های

#### دارای ژن *NRPS* در محیط جامد

در جدول ۵ نتایج بررسی فعالیت ضد میکروبی دو سویه UTMCO0428 و UTMCO1046 در محیط جامد نشان داده شده است. هر دو این جدایه‌ها، فعالیت ضد میکروبی کمی بر علیه باکتری‌های گرم مثبت *Bacillus subtilis* و MRSA دارند، ولی بر باکتری گرم منفی، قارچ و مخمر، بی‌اثر بوده‌اند.

جدول ۵- بررسی فعالیت ضد میکروبی جدایه‌های UTMCO0428 و UTMCO1046 در محیط جامد در روزهای

مختلف علیه *Bacillus subtilis* و MRSA.

MRSA		<i>Bacillus subtilis</i>		سویه
روز دهم	روز هفتم	روز دهم	روز هفتم	
۱۰ mm	۱۳ mm	۱۰ mm	۱۲ mm	UTMCO0428
۱۲ mm	۱۰ mm	۱۲ mm	۱۰ mm	UTMCO1046

ضدمیکروبی باشد، به همین دلیل، با تغلیظ ماده ضدمیکروبی و سنجش فعالیت آن به روش انتشار در دیسک، فعالیت ضدمیکروبی حتی در مقادیر کم سنجیده شد. (جدول ۷)

با این وجود، نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که جدایه‌های منتخب، علیه *A.niger* بی‌اثر بوده‌اند. (جدول ۷)

### نتایج بررسی فعالیت آنتی‌بیوتیکی عصاره کشت

با توجه به این‌که آزمایش‌های بررسی اثر ضدمیکروبی جدایه‌ها، بدون انجام آزمایش‌های بهینه‌سازی و در شرایط غیربهینه انجام شده بود، ممکن بود پاسخ مشاهده شده مبنی بر عدم فعالیت علیه *A.niger* ناشی از غلظت کم ترکیب

جدول ۶- فعالیت ضد میکروبی جدایه‌های UTMC00428 و UTMC01046 در محیط مایع در روز پنجم.

UTMC01046	UTMC00428	سویه
۲۰ mm	۱۹ mm	<i>B.subtilis</i>
۲۷ mm	۳۰ mm	MRSA
۱۸ mm	۱۲ mm	<i>P.aeruginosa</i>
۱۸ mm	۱۲ mm	<i>C.albicans</i>
-	-	<i>A.niger</i>

جدول ۷- نتایج بررسی فعالیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها با روش انتشار از دیسک در روزهای مختلف.

UTMC01046			UTMC00428			سویه
هفتم	پنجم	سوم	هفتم	پنجم	سوم	روز
۲۹ mm	۱۲ mm	۹ mm	۱۱ mm	۱۲ mm	-	<i>B.subtilis</i>
۱۶ mm	۱۱ mm	۹ mm	۱۲ mm	۱۵ mm	۱۰ mm	MRSA
۱۷ mm	۱۶ mm	۱۵ mm	۱۱ mm	۱۵ mm	۹ mm	<i>P.aeruginosa</i>
۲۱ mm	۱۸ mm	۱۳ mm	۸ mm	۱۲ mm	-	<i>C.albicans</i>
-	-	-	-	-	-	<i>A.niger</i>

### بحث

با توجه به کاربرد گوناگون و گسترده پپتیدهای غیر ریبوزومی در عرصه زیست‌فناوری، در این پژوهش، فراوانی و تنوع ژن *NRPS* در اکتینومایست‌های جدا شده از مناطق مختلف ایران، مورد بررسی قرار گرفته است. از جمله آنتی‌بیوتیک‌های *NRPS* می‌توان آنتی‌بیوتیک گلیکوپپتیدی ونکوماسین را نام برد که در درمان پیش‌گیرانه و عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری‌های گرم مثبت به کار می‌رود (۱۹). قبلاً نشان داده شده که ژن *NRPS* در میکروارگانیزم‌های حاوی ژنوم‌های کوچک‌تر از ۳Mb کمیاب است، یا اصلاً وجود ندارد. ظرفیت کد کردن این ژن‌ها در ژنوم‌های با اندازه ۳ برابر بزرگ‌تر، افزایش پیدا کرده و در اکتینوباکترها تا ۱/۹ برابر افزایش می‌یابد. اکتینومایست‌ها با توجه به داشتن ژنوم بزرگ‌تر در مقایسه با دیگر باکتری‌ها، امکان بیشتری برای استفاده از بخش بزرگ‌تری از ظرفیت ژنوم خود (۱۰-۵ درصد) برای تولید متابولیت‌های ثانویه دارند. از آنجایی که هیچ‌کدام از گروه‌های تاکسونومیک دیگر، ظرفیت بالای کد کردن *NRPS* را ندارند، تلاش‌های بیشتری روی اکتینومایست در جهت کشف آنتی‌بیوتیک انجام شده است (۲۰).

غربال‌گری توانمندی‌های زیست‌فناوری در میکروارگانیزم‌ها به دو روش کلاسیک و مولکولی انجام می‌شود. در روش کلاسیک، ابتدا جدایه در محیط مناسب برای تولید فرآورده مورد نظر، کشت داده می‌شود و پس از طی دوره مناسب که بسته به نوع فرآیند و میکروارگانیزم مولد، از چند ساعت تا چند هفته، متغیر است، محصول تولید شده در مایع تخمیر، به روش‌های مستقیم و غیرمستقیم، ردیابی و سنجیده می‌شود. روش مولکولی، سریع‌تر است و نیازی به صرف وقت فوق ندارد. در این روش می‌توان ژن مولد محصول فوق را در جدایه مورد نظر ردیابی کرد. این کار می‌تواند با سرعت بیشتر و با صرف هزینه کمتری انجام شود. به‌علاوه، با بررسی ترادف ژن تولید شده با ترادف‌های ثبت شده از بانک‌های ژنی می‌توان به تفاوت ژن‌های ارزیابی شده با ژن‌های موجود پی برد که این تفاوت‌ها می‌تواند نشان‌دهنده محصولی نوین باشد.

اکتینومایست‌ها، میکروارگانیزم‌های پیش‌تاز در تولید متابولیت‌های ثانویه فعال زیستی، از جمله ترکیبات ضدباکتریایی هستند به دلیل اهمیت اقتصادی این باکتری‌ها، تلاش‌های زیادی برای جداسازی و تولید متابولیت‌های ثانویه توسط اکتینومایست‌ها به عمل آمده است.



ضمناً همان‌گونه که در بخش‌های پیشین گفته شد، به طور کلی برای سنجش فعالیت آنتی‌بیوتیک (در محیط جامد و مایع)، ابتدا اکتینومایست، روی محیط جامد ISP2 کشت داده شده و بعد از مدت زمان مناسب، عصاره کشت و یا برشی از محیط آگار-دار در محیط مولر هینتون آگار که از قبل با سویه حساس مورد نظر کشت داده شده بود، قرار داده می‌شود. سپس این پلیت به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در انکوباتور قرار می‌گیرد تا معلوم شود که انتشار ماده آنتی‌بیوتیکی از پانچ اکتینومایست موجب جلوگیری از رشد سویه حساس را فراهم می‌کند یا خیر. با توجه به تفاوت سرعت تولید آنتی‌بیوتیک اکتینومایست‌های متفاوت، زمان برداشت نمونه می‌تواند متفاوت باشد. به همین دلیل، در پژوهش حاضر، این آزمایش در روزهای هفتم و دهم، برای کشت جامد و در روز سوم، پنجم و هفتم، برای کشت مایع تکرار شده است. نتایج به دست آمده، در جدول‌های ۴ و ۵ آورده شده است. علت تفاوت نتایج به دست آمده در دو روش جامد و مایع می‌تواند ناشی از عوامل متعددی باشد که مهم‌ترین آن، تفاوت حلالیت آنتی‌بیوتیک در محیط آبی و آلی است. به عنوان مثال، آنتی‌بیوتیک اریترومایسین به صورت خالص، حلالیت بسیار ناچیزی در آب دارد (حدود ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) (۱۷)؛ در حالی که این آنتی‌بیوتیک در سویه‌های صنعتی به میزان چند گرم در لیتر در مایع فرمانتاسیون تجمع می‌یابد (۲۴). در واقع، علت انجام آزمایش در دو محیط مایع و نیز آنتی‌بیوتیک استخراج شده، درک تفاوت اثر ترکیب ضد میکروبی تولید شده است.

در پژوهش‌های انجام شده توسط Sacido (۱۴) Pathom-aree (۲۱) و Cao (۲۲) نیز وجود ژن *NRPS* در تعدادی از جدایه‌های اکتینومایست گزارش شده است.

نتایج به دست آمده، وجود پپتیدهای غیرریبوزومی را در اکتینومایست‌های بومی مطالعه شده، از طریق غربال‌گری مولکولی نشان می‌دهد. همچنین نتایج به دست آمده، حاکی از وجود فعالیت ضد میکروبی در جدایه‌های اکتینومایست دارای ژن‌های فوق است.

در این پژوهش، ۱۸ جدایه اکتینومایست، از خاک‌های کشور جدا و وجود ژن *NRPS* در دو جدایه تأیید شد. این جدایه‌ها فعالیت ضد میکروبی مناسبی داشته‌اند. این نتایج نشان‌گر وجود ژن *NRPS* در جدایه‌های اکتینومایست بومی ایران است. هر دو باکتری *Streptomyces sp.* UTMC00428 و *Streptomyces sp.* UTMC01046 دارای توانمندی تولید آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف بر علیه باکتری‌های گرم مثبت، منفی و *Candida albicans* هستند. وسیع‌الطیف بودن اثر آنتی‌بیوتیک‌های تولید شده، احتمال کاربرد آن‌ها را بیشتر می‌کند. در هر صورت، هر دو باکتری، علیه *Aspergillus niger* بی‌اثر بوده‌اند. *Candida albicans* و *Aspergillus niger* عامل بسیاری از بیماری‌های سیستمیک در افراد دارای نقص در سیستم ایمنی هستند. درمان این بیماری‌ها می‌تواند توسط آمفوتریسین B و ایتراکونازول انجام شود. همچنین وریکنازول، طیف وسیعی از فعالیت ضدقارچی بر علیه عفونت‌های سیستمیک قارچی ایجاد شده توسط *Candida*، *Aspergillus* و *Chryptococcus* دارد. ولی فلوکونازول و نیز برخی ترکیبات دیگر، فقط روی جنس *Candida* و عفونت‌های ناشی از آن مؤثر و روی جنس *Aspergillus*، تأثیر بسیار کمی دارند. این مشاهدات، نشان‌گر تفاوت مکانیسم مقاومت در *Aspergillus* و *Candida* است (۲۳).

بیشترین فعالیت جدایه‌های UTMC00428 و UTMC01046 به ترتیب در روزهای پنجم و هفتم بوده است. اگرچه این سنجش‌ها در شرایط غیربهبینه انجام شده و مسلماً با بهینه‌سازی شرایط تولید، بازده تولید و نیز بهره‌وری (میزان آنتی‌بیوتیک تولید شده در گذر زمان) بیشتر خواهد شد. در شرایط کنونی می‌توان گفت قدرت تولید آنتی‌بیوتیک سویه UTMC01046، ۲/۴۱ درصد بیشتر از سویه UTMC00428 است. ولی با توجه به شباهت کمتر از ۷۲ درصد سویه UTMC00428 نسبت به نزدیک‌ترین سویه منسوب، احتمال نوین بودن ترکیب در سویه اخیر، بیشتر از سویه UTMC01046 است.

### تقدیر و تشکر

مؤلفین، تشکر و قدردانی خود را از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران ریاست جمهوری، بابت حمایت مالی این طرح به شماره ۸۷۰۲۶/۰۸ و

از خانم پرستو صبائی فرد، پژوهشگر مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران، بابت کمک‌های علمی و فنی اعلام می‌دارند.

### منابع مورد استفاده

- Onaka, H., 2006. Biosynthesis of heterocyclic antibiotics in actinomycetes and an approach to synthesize the natural compounds. *Actinomycetologica* 20:62-71.
- Strohl, W. R., 2004. Antimicrobials. In *microbial diversity and bioprospecting*. Edited by Bull AT. ASM Press 336-355.
- Mann, J., 2001. Natural products as immunosuppressive agents. *Nat Prod Rep* 18: 417-430.
- Chiani, M., Akbarzadeh, A., Farhangi, A., Mehrabi, MR., 2010. Production of desferrioxamine B (Desferal) using corn steep liquor in *Streptomyces pilosus*. *Pak J Biol Sci* 13:1151-5.
- Eftekharzadeh, B., Hamed, J., Mohammadipanah, F., Khodagholi, F., Maghsoudi, N., Klenk, H. P., 2010. Inhibition of oxidative stress-induced amyloid  $\beta$  formation in NT2 neurons by culture filtrate of a strain of *Streptomyces antibioticus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:1805-1811.
- Berdy, J., 2005. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot* 58: 1-26.
- Oliveira, P. H., Batagov, A., Ward, J., Baganz, F., Krabben, P., 2006. Identification of erythrobractin, a hydroxamate-type siderophore produced by *Saccharopolyspora erythraea*. *Appl Microbiol* 42: 375-380.
- Parungao, M., Maceda, E. B. G., Villano, M. A. F., 2007. Screening of antibiotic-producing actinomycetes from marine, brackish and terrestrial sediments of Samal Island, Philippines. *J Res Sci Comput Engin* 4: 29-38.
- Strieker, M., Tanovic, A., Marahiel, A. M., 2010. Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Curr Opin Struc Biol* 20: 234-240.
- Nonomura, H., Ohara, Y., 1969. Distribution of actinomycetes in soil. VI. A culture method effective for both preferential isolation and enumeration of *Microbispora* and *Streptosporangium* strains in soil. *J Ferment Technol* 47: 463-469.
- Wink, J., 2002. The Actinomycetales, An order in the class of Actinobacteria important to the pharmaceutical industry-Electronic manual. Aventis Pharma Deutschland GmbH 12: 58,63.
- Reading, C., Cole, M., 1977. Clavulanic acid: a B-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agent Chemoth* 11: 852-857.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., Hopwood, D. A., 2000. Preparation and analysis of genomic and plasmid DNA, in *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation 8: 169-171.
- Sacido, A., Genilloud, O., 2004. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microbial Ecol* 49: 10-24.
- Kumar, V., Bharti, A., Gusain, O., Bisht, S. G., 2010. An improved method for isolation of genomic DNA from filamentous actinomycetes. *J Sci Eng Tech Mgt* 2: 10-13.
- Wikler, M. A., Cockerill, F. R., Craig, W. A., 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard. *Clin Lab Standards Inst* 26: 7-9.
- Demuth, E. J., 2008. The United States Pharmacopeia, Biological test and assay: Antibiotics-microbial assay: cylinder-plate assay. *Port City Press* 91-96.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5: 150-163.
- Donadio, S., Monciardini, P., Socio, M., 2007. Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. *Nat Prod Rep* 24:1073-1109.
- McManus, M., 1997. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am J Health-Syst Pharm* 54: 1420-1433.

21. Pathom-aree, W., Stach, J. E. M., Ward, A. C., Horikoshi, K., Bull, A. T., Goodfellow, M., 2006. Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment from the Mariana Trench. *Extremophiles* 10: 181-189.
22. Cao, Y., Jiang, Y., Wang, Q., Zhao, L., Jin, R., Jiang, C., 2010. Diversity and bioactivity of cultured actinomycetes in Sichuan and Yunnan. *Acta Microbiol Sin* 50: 995-1000.
23. Yoshimi, N., 2002. Antifungal drugs in fungal infections, *Handbook of fugal biotechnology*, second edition 34: 273-292.
24. Hamed, J., Malekzadeh, F., Saghafinia, A. E., 2004. Enhancing of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* NUR001 with common and uncommon oils. *J Ind Microbiol Biotechnol* 31: 447-456.