مقاله تحقیقی

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

فائزه فلاح قهرودی[۱]، جواد حامدی*[۲]، ضرغام سپهری‌زاده[۳]، فاطمه محمدی‌پناه[۲]، حمید مقیمی[۴]، انسیه صالح قمری[۴]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، 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 زیست شناسی، پردیس علوم، تهران، تهران، ایران

***مسؤول مکاتبات:** جواد حامدی، مرکز پژوهشی کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشگاه تهران تهران، صندوق‌پستی ۶۴۵۵-۱۴۱۵۵، تلفن: ۶۶۴۱۵۴۹۵، نمابر: ۶۶۴۱۵۰۸۱، پست الکترونیکی: jhamedi@ut.ac.ir

محل انجام تحقیق: مرکز پژوهشی کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۱۸ تاریخ پذیرش:۹۰/۶/۲۶

چکیده

اکتینومایست‌ها 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 محدودهٔ 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 اکتینومایست‌های بومی ایران، مورد بررسی قرار گرفته است. به این منظور، ۱۸ اکتینومایست جدا شده از خاک‌های مناطق مختلف ایران، جدا و DNA آن‌ها با روش تغییر یافته رسوب با نمک استخراج شد. به‌منظور 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 در۲ جدایه تائیدکرد. آنالیز ترادف ژن ۱۶SrRNA سویه‌های UTMC00428 و UTMC01046 به ترتیب با *Streptomycesrectiviolaceus* DG026660، ۹۹/۵۷ درصد و با AB184240 *Streptomyces rubiginosohelvolus*۱۰۰ درصد شباهت را نشان می‌دهد. این دو باکتری، فعالیت ضدمیکروبی مناسبی علیه باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و مخمرها داشته‌اند، ولی بر *Aspergillus niger* بی‌اثر بوده‌اند.

واژه‌های کلیدی: اکتینومایست‌ها، آنتی بیوتیک، 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) سنتز می‌شود، شامل خانواده‌ای متنوع از محصولات طبیعی با محدودهٔ وسیعی از فعالیت‌های زیستی است. از این گروه می‌توان به داروهای سرکوب‌گر ایمنی، بیوسورفاکتانت‌ها، سیدروفورها (۷)، عوامل بیماری‌زا، ترکیبات ضدمیکروبی 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 طویل‌سازی 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 کاتالیت 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 آماده سازی 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 $۴^{o}C$ 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

(۱۰) کشت داده شد. محیط‌های کشت به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۸°C گرماگذاری شد. به منظور جلوگیری از رشد قارچ‌ها روی محیط‌های جداسازی، به تمامی محیط‌های کشت، پس از اتوکلاو کردن، ۱۰۰µg/ml آنتی‌بیوتیک سیکلوهگزیمید سترون شده با صافی ۰/۴۵µm اضافه شد.

خالص‌سازی و نگهداری سویه‌های اکتینومایست جداسازی شده

پس از طی مدت زمان گرماگذاری، کلنی‌های اکتینومایست رشد یافته بر روی محیط‌های جداسازی، انتخاب شد و کشت خالص از آن‌ها روی محیط ISP2 (عصاره مخمر ۴ g/l - عصاره مالت ۱۰g/l- گلوکز ۴ g/l- آگار ۱۵g/l) با pH ۷/۳ (۱۱) تهیه شد.

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA، جدایه‌ها در یک محیط غنی (گلیسرول ۲۰ گرم در لیتر، پپتون ۱۰ گرم در لیتر و عصاره مالت ۳۰ گرم در لیتر) (۱۲) به مدت ۵-۲ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دور ۲۲۰rpm 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 ۲۰۰۰ (۱۳) با کمی تغییر مورد استفاده قرار گرفت. مقدار ۲۰-۱۰ میلی‌گرم زیست توده با محلول EDTA با غلظت ۱۰mM و pH ۸ شسته شد. به منظور تخریب سلول‌ها، از SET buffer 567 (75mM) µl NaCl; 25 mM EDTA pH 8;20 mM Tris-HCl, ۵۰ µl لیزوزیم با غلظت 50 mg/ ml، ۹ µl از پروتئیناز K با غلظت 20 mg/ ml، به‌همراه ۶۰ µl از محلول SDS ۱۰ درصد استفاده شد. فرآیند پروتئین‌زدایی توسط محلول NaCl 5M و کلروفرم انجام شد. به منظور رسوب دادن DNA، ۰/۶حجم ایزوپروپانول اضافه شد و سپس ویال به مدت۳۰-۱۵ دقیقه در۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در نهایت به منظور حذف بقایای نمک و رطوبت، الکل۷۰ درصد اضافه شد. به منظور حل کردن رسوب DNA، ۱۰۰µl از بافر TE(Tris 10 mM، EDTA 1mM با pH ۸) استفاده شد.

تایید استخراج DNA

به منظور تأیید عمل استخراج DNA، الکتروفورز با ژل آگارز ۱درصد و جریان ۷ ولت بر سانتی‌متر به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. در نهایت، ژل با محلول اتیدیوم برماید با غلظت ۱µg/ ml رنگ‌آمیزی شد و در زیر نور UV با طول موج ۲۵۴ نانومتر، از لکه‌ها عکس‌برداری شد.

غربال‌گری و آنالیز ژن‌های ۱۶SrRNA و *NRPS*

برای تکثیر ژن *NRPS* و ژن ۱۶ SrRNA از میان نمونه‌های DNA اکتینومایست‌ها از پرایمرهای پیشنهاد شده توسط Sacido (۱۴) و Kumar (۱۵) استفاده شد.

جدول۱- توالی‌های پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های *NRPS* و ۱۶ SrRNA و دمای اتصال آن‌ها.

ژن تکثیرشده	پرایمر	توالی پرایمر(۵'→۳')	اندازه ژن	دمای اتصال(C°)	مرجع
NRPS	A3F	GCSTACSYSATSTACACSTCSGG	۷۰۰Bp	۶۶/۹	۱۵
	A7R	SASGTCVCCSGTSCGGTAS		۶۴/۶	
۱۶SrRNA	9F	AAG AGT TTG ATC ATG GCT CAG	۱۵۰۰bp	۶۰/۹	۱۶
	1541R	AGG AGG TGA TCC AAC CGC A		۶۷	

برای واکنش PCR، مخلوط واکنش با حجم نهایی ۶۰µl شامل، ۱-۰/۵ µM از هر کدام از پرایمرها، ۰/۱۵mM از dNTPs، ۱۰۰-۵۰ng/µl از DNA استخراج شده، ۲U آنزیم Taq

polymerase با بافر ۱x و ۱mM از $MgCl_2$ به همراه روغن معدنی و۱۰ 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 ضدمیکروبی جدایه‌ها، از ۵ گونه میکروارگانیسم استاندارد، *Bacilus subtilis* UTMC 01416، UTMC 01404 *Pseudomonas aeruginosa*، MRSA UTMC 01401 (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*)، UTMC 01431 *Aspergilus niger* و *Candida albicans* UTMC 01430 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 $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ سلول در هر میلی‌لیتر از سویه‌های باکتریایی و مخمری 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 ضدمیکروبی جدایه‌های منتخب، از سه روش محیط جامد، مایع و سنجش فعالیت آنتی‌بیوتیکی در عصاره استخراج شده با حلال، استفاده شد.

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 ضدمیکروبی، 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 ضدمیکروبی جدایه‌های منتخب در محیط مایع، جدایه‌های منتخب پس از رشد روی محیط ISP2 آگاردار، به محیط‌های پیش‌کشت شامل ISP2 براث 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 ۰/۱میلی‌متر 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 ضدمیکروبی 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

هفتم، تغلیظ شد و پس از تهیه دیسک از عصاره حاصل، هر دیسک روی محیط مولرهینتون و یا PDA که از قبل با میکروارگانیسم پاتوژن کشت داده شده بود، قرار گرفت و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور گرماگذاری 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 Neighbor Joining، Maximum Parsimony و Maximum Likelihood 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.

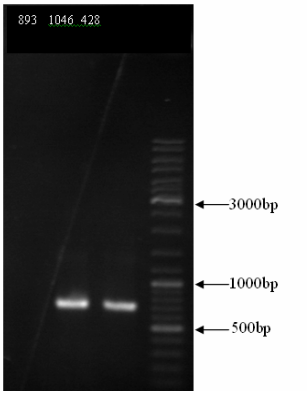
نتایج

جداسازی اکتینومایست‌ها 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 اکتینومایست، 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.

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
۱	UTMC00428	خاک‌های شنی همدان	AV agar
۲	UTMC01046	ریزوسفر خاک‌های اصفهان	GAC agar
۳	UTMC00893	مناطق غیر ریزوسفری فارس	AV agar



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

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).

جدول ۳ - سویه‌های اکتینومایست دارای ژن *NRPS*.

کد سویه جداشده	میزان شباهت در ژن	نزدیک‌ترین باکتری از نظر شباهت در ژن*NRPS*	شماره دسترسی در GenBank
UTMC00428	۷۲درصد	*Streptomyces kitasatoensis*	AB432438.1
UTMC01046	۹۱درصد	*Streptomyces griseus subsp. griseus*	AP009493.1

تعیین توالی ژن SrRNA16

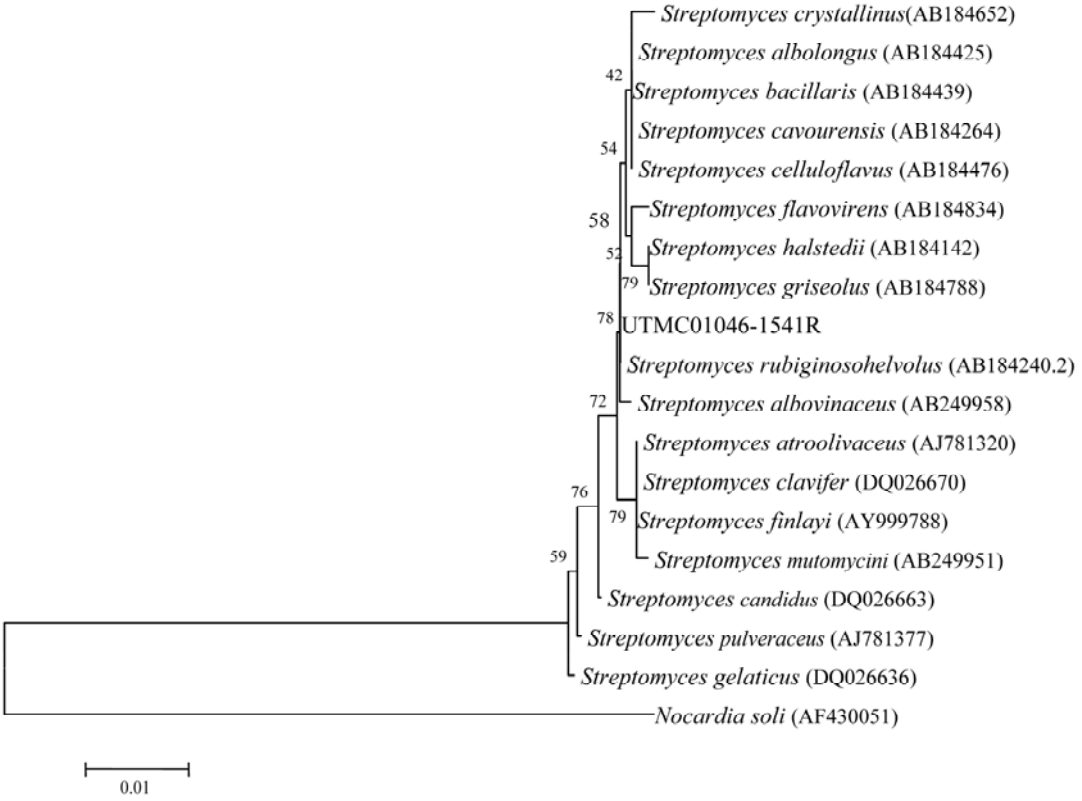
نتایج حاصل از تعیین توالی

ترادف‌های ژن SrRNA16 دو سویه دارای ژن *NRPS* در بانک ژنی EzTaxon نشان می‌دهد که این سویه‌ها به ترتیب با *Streptomyces rectiviolaceus* DG026660 و AB184240 *Streptomyces rubiginosohelvolus*، ۹۹/۵۷ درصد و ۱۰۰ درصد شباهت دارند (جدول ۴).

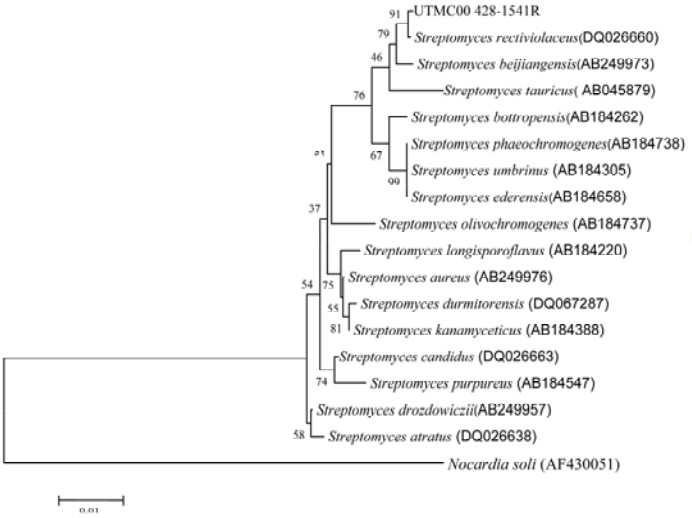
جدول ۴- میزان تشابه جدایه‌های دارای ژن*NRPS* با اکتینومایست‌های ثبت شده بر اساس ترادفژن 16SrRNA.

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

در تصاویر ۲ و ۳، درخت فیلوژنتیک سویه‌های فوق و میزان خویشاوندی آن‌ها با نزدیک‌ترین سویه‌های ثبت شده در بانک ژنی Eztaxon نشان داده شده است.



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



تصویر ۳- دندروگرام ژن ۱۶SrRNA و موقعیت فیلوژنیک جدایه UTMC00428.

نتایج بررسی فعالیت ضدمیکروبی سویه‌های دارای ژن *NRPS* در محیط جامد

در جدول ۵ نتایج بررسی فعالیت ضدمیکروبی دو سویه UTMC00428 و UTMC01046 در محیط جامد نشان داده شده است. هر دو این جدایه‌ها، فعالیت ضدمیکروبی کمی بر علیه باکتری‌های گرم مثبت *Bacillus subtilis* و MRSA دارند، ولی بر باکتری گرم منفی، قارچ و مخمر، بی‌اثر بوده‌اند.

نتایج بررسی فعالیت ضدمیکروبی سویه‌های مولد ژن *NRPS* در محیط مایع

در جدول ۶، فعالیت ضدمیکروبی دو جدایه UTMC00428 و UTMC01046 در محیط مایع نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، فعالیت ضدمیکروبی 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.

جدول ۵- بررسی فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌های UTMC00428 و UTMC01046 در محیط جامد در روزهای مختلف علیه *Bacillus sutilis* و MRSA.

سویه	*Bacillus subtilis*		MRSA	
	روز هفتم	روز دهم	روز هفتم	روز دهم
UTMC00428	۱۲ mm	۱۰ mm	۱۳ mm	۱۰ mm
UTMC01046	۱۰ mm	۱۲ mm	۱۰ mm	۱۲ mm

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 عدم‌فعالیت علیه *A.niger*، ناشی از غلظت کم ترکیب 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)

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

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

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

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

بحث

غربال‌گری توانمندی‌های زیست‌فناوری در میکروارگانیسم‌ها 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 میکروارگانیسم 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، میکروارگانیسم‌های 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.

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 ونکومایسین 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 میکروارگانیسم‌های حاوی ژنوم‌های کوچک‌تر از۳Mb کمیاب است، یا اصلاً وجود ندارد. ظرفیت کدکردن 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).

در این پژوهش، ۱۸ جدایه اکتینومایست، از خاک‌های کشور جدا و وجود ژن *NRPS* در دو جدایه تائید شد. این جدایه‌ها فعالیت ضدمیکروبی 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*، تاثیر بسیار کمی دارند. این مشاهدات، نشان‌گر تفاوت مکانیسم مقاومت در *Candida* و *Aspergillus* است (۲۳).

بیشترین فعالیت جدایه‌های UTMC00428 و UTMC01046 به ترتیب در روزهای پنجم و هفتم بوده است. اگرچه این سنجش‌ها در شرایط غیربهینه انجام شده و مسلما 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.

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 ضدمیکربی 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 ضدمیکروبی در جدایه‌های اکتینومایست دارای ژن‌های فوق 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 صبائی‌فرد، پژوهشگر مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران، بابت کمک‌های علمی و فنی اعلام می‌دارند.

منابع مورد استفاده

1. Onaka, H., 2006. Biosynthesis of heterocyclic antibiotics in actinomycetes and an approach to synthesize the natural compounds. Actinomycetologica 20:62-71.
2. Strohl, W. R., 2004. Antimicrobials. In microbial diversity and bioprospecting. Edited by Bull AT. ASM Press 336-355.
3. Mann, J., 2001. Natural products as immunosuppressive agents. Nat Prod Rep18: 417-430.
4. Chiani, M., Akbarzadeh, A., Farhangi, A., Mehrabi, MR., 2010. Production of desferrioxamine B (Desferal) using corn steep liquor in Streptomyces pilosus. Pak J Biol Sci13:1151-5.
5. Eftekharzadeh, B., Hamedi, J., Mohammadipanah, F., Khodagholi, F., Maghsoudi, N., Klenk, H. P., 2010. Inhibition of oxidative stress-induced amyloid β formation in NT2 neurons by culture filtrate of a strain of Streptomyces antibioticus. Appl Microbiol Biotechnol 86:1805–1811.
6. Berdy, J., 2005. Bioactive microbial metabolites. J Antibiot 58: 1–26.
7. Oliveira, P. H., Batagov, A., Ward, J., Baganz, F., Krabben, P., 2006. Identification of erythrobactin, a hydroxamate-type siderophore produced by Saccharopolyspora erythraea. Appl Microbiol 42: 375-380.
8. 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.
9. Strieker, M., Tanovic, A., Marahiel, A. M., 2010. Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. Curr Opin Struc Biol 20: 234-240.
10. Nonomura, H., Ohara, Y., 1969. Distribution of actinomycetes in soil. VI. A culture method effective for both preferential isolation and enumuration of Microbispora and Streptosporangium strains in soil. J Ferment Technol 47: 463-469.
11. Wink, J., 2002. The Actinomycetales, An order in the class of Actinobacteria important to the pharmaceutical industry-Electronic manual. Aventis Pharma Deutschland Gmbh12: 58,63.
12. Reading, C., Cole, M., 1977. Clavulanic acid: a B-lactam from Streptomyces clavuligerus. Antimicrob Agent Chemoth 11: 852-857.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Demuth, E. J., 2008. The United States Pharmacopeia, Biological test and assay: Antibiotics-microbial assay: cylinder-plate assay. Port City Press 91-96.
18. Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Brief Bioinform 5: 150–163.
19. 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.
20. 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. Hamedi, 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.