Archive of SID

جداسازی و شناسایی میکسوباکتر تولیدکنندهٔ Myxothiazol و Althiomycin از خاک ایران

اعظم مرادی[۱]،محمد یعقوبی اوینی[۱]، غلامحسین ابراهیمی پور*[۱]، علیرضا قاسم پور[۲]

تاریخ دریافت :۱۳۹۵/۸/۲
تاریخ پذیرش :۱۳۹۵/۱۲/۱۱

چکیده

میکسوباکترها در دستهٔ باکتری‌های خاک قرار می‌گیرند که حرکت لغزشی دارند و اجسام زایشی ایجاد می‌کنند. جدایه میکسوباکتریایی ۱۱۸ از خاک منطقهٔ کوهرنگ چهارمحال و بختیاری جداسازی شد و فعالیت زیستی آن علیه پاتوژن‌های مختلف انسانی به روش رقت‌سازی در میکروپلیت مورد بررسی قرار گرفت. جدایه ۱۱۸، فعالیت ضدمیکروبی قابل توجهی علیه باکتری‌های شاخص E.coli و M.luteus نشان داد و از این رو، مورد مطالعهٔ بیشتر قرار گرفت. بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و توالی 16S rDNA باکتری نشان داد که این جدایه به گونهٔ M. fulvus تعلق دارد. به علاوه، درخت فیلوژنی رابطهٔ خویشاوندی این جدایه را باگونه M. fulvus تأیید کرد. به منظور بررسی فعالیت زیستی باکتری، استخراج حلالی محیط کشت انجام و عصارهٔ متانولی حاصل به وسیلهٔ HPLC فراکسیون‌گیری و علیه پاتوژن‌های حساس تست شد. آنالیز طیف سنجی جرمی نشان‌دهندهٔ حضور یون مولکولی آنتی‌بیوتیک‌های آلتیومایسین و میکسوتیازول در عصارهٔ متانولی محیط کشت این جدایه بود.

واژه‌های کلیدی: ***آنتی بیوتیک، درخت فیلوژنی، طیف سنجی جرمی، فعالیت زیستی***

مقدمه

در فرایند جستجو برای یافتن ترکیبات طبیعی مفید، غربالگری میکروارگانیسم‌هایی که تاکنون کمتر مطالعه‌شده‌اند، امکانِ یافتن متابولیت‌های جدید را افزایش می‌دهد. گزارشاتی موجود است که نشان می‌دهد میکسوباکترها تولیدکنندگان توانمند انواع زیادی از متابولیت‌های ثانویهٔ زیست فعال ضدباکتریایی و ضدقارچی هستند (Weissman & Müller, 2010). تا امروز در حدود ۱۰۰ ساختار پایه و ۵۰۰ مشتق از میکسوباکترها توصیف شده است که بسیاری از آنها به طور خاص توسط این گروه میکروبی تولید می‌شوند (Weissman & Müller, 2010). این میکروارگانیسم‌ها منابع خوبی برای ترکیبات جدید هستند، اما در غربالگری‌های دارویی به خوبی مطالعه نشده‌اند؛ زیرا، جداسازی آنها فرایندی طولانی و خالص‌سازی و نگهداری آنها دشوار است. همچنین، سویه‌هایی که به تازگی جداسازی می‌شوند، باید چندین بار به محیط‌های مایع مناسب انتقال داده شوند تا یک سوسپانسیون سلولی یکنواخت حاصل شود.

۱-گروه میکروبیولوژی و زیست فناوری میکروبی، دانشکده علوم و فناوری های زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
*(نویسنده مسئول: g-ebrahimi@sbu.ac.ir)
۲-پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

www.SID.ir

Archive of SID

اگرچه این روش تنها روش موجود است، برخی سویه‌ها همچنان به صورت پوسته، کلاف و گلوله‌های غضروف مانند رشد می‌کنند (Reichenbach & Höfle, 1999) میکسوباکترها به شکل میله‌های گرم منفی هستند که نسبتاً دارای رشد کندی هستند و چرخهٔ زندگی پیچیده‌ای دارند (Shimkets *et al*., 2006). آنها از خاک، مدفوع گیاه‌خواران، مواد گیاهی در حال فساد و پوست درختان زنده و مرده جداسازی شده‌اند. چندین جنبه از مراحل جداسازی آنها منحصر به این گروه از باکتری‌هاست:

۱- حرکت به روش لغزیدن (Gliding) و رفتار اجتماعی: میکسوباکترها روی سطح آگار می‌لغزند و بیوفیلم شفاف، نازک و پیچیده‌ای ایجاد می‌کنند و با حرکات هماهنگ شده به واسطهٔ سیگنال‌های بین سلولی به سمت مواد جذب‌کننده، مانند مدفوع خرگوش، حرکت می‌کنند (Dworkin, 1996).

۲- افتراق به میکسوسپورهای مقاومی که درون اجسام زایشی (Fruiting body) ایجاد می‌شوند. اجسام زایشی در هر گونه دارای شکل، رنگ و قوام خاصی است که یکی از ملاک‌های مهم شناسایی آنها می‌باشد (Shimkets *et al*., 2006).

۳- شکار انواع باکتری و مخمر که هضم آنها با استفاده از آنزیم‌های لیزکنندهٔ خارج سلولی متنوع و آنتی‌بیوتیک‌ها انجام می‌شود .

۴- بعضی از میکسوباکترها قادر به تجزیهٔ سلولز هستند (Shimkets *et al*., 2006).

میکسوباکترها به‌طور معمول در خاک‌های خنثی یا کمی قلیایی یافت می‌شوند. آنها از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از جنگل‌های بارانی گرمسیری و از تندراهای قطبی، استپ‌ها، بیابان‌ها و باتلاق‌ها در سطح دریا و از ارتفاعات بالا جداسازی می‌شوند. با وجود این، دیده شده است که مناطق گرم و دارای فصول خشک از نظر تنوع میکسوباکترها غنی‌تر هستند (Dawid, 2000). ایران به لحاظ دارا بودن اقلیم زمستان گرم و مرطوب و تابستان خشک استپی مکان مناسبی برای میکسوباکترها به نظر می‌رسد، زیرا میکسوسپورها قادر به تحمل خشکی و دمای بالا هستند. در واقع، مطالعهٔ انجام شده توسط داوید (Dawid, 2000) نشان دهندهٔ میانگین بسیار بالای تعداد گونه‌ها بر نمونهٔ خاک در ایران است؛ همچنین، این مطالعه نشان می‌دهد که طیف گونه‌ها در ایران بسیار گسترده است.

هدف از انجام نوشتار حاضر که اولین مورد از این‌گونه مطالعات در ایران است، بررسی تولید متابولیت‌های ثانویهٔ زیست فعال در میکسوباکترهای بومی ایران است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

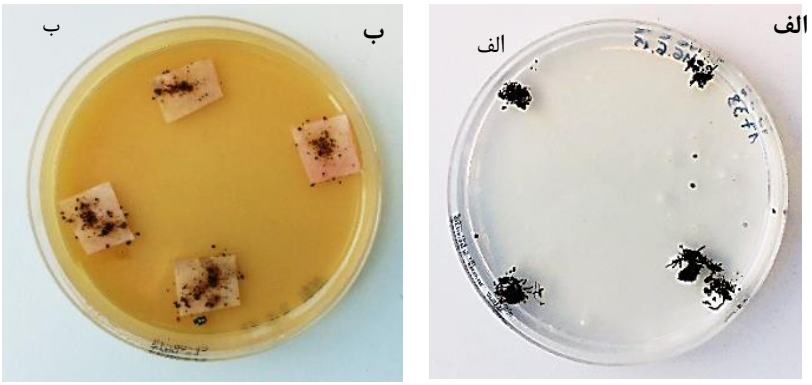
جدایه میکسوباکتر مورد بررسی از نمونهٔ خاک تونل اول زاینده‌رود، واقع در شهرستان کوهرنگ استان چهارمحال و بختیاری، جداسازی شد. این نمونه در اواخر فصل بهار سال ۱۳۹۲ جمع آوری شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جداسازی

کاهش آلودگی‌های قارچی، با خشک کردن کامل نمونهٔ جمع‌آوری شده در تاریکی و در معرض هوا انجام گرفت. دو روش برای جداسازی میکسوباکترها از نمونه استفاده گردید. در روش اول، محیط کشت WAT آگار (Shimkets *et al*., 2006) دارای سیکلوهگزامید (۱۰۰µg/ml) تهیه و باکتری *E. coli* به صورت متقاطع در وسط آن کشت داده شد. سپس یک نخود از نمونهٔ کاملاً خشک شده به هر چهار انتهای خطوط کشت *E. coli* منتقل (شکل ۱ الف) و پلیت در دمای ۳۰°C به مدت یک هفته گرماگذاری شد. سپس تشکیل جسم زایشی و خزش میکسوباکتر زیر لوپ دوچشمی Olympus SZX12 مورد بررسی قرار گرفت. در روش دوم، محیط ST21 آگار (Shimkets *et al*., 2006) دارای سیکلوهگزامید (۱۰۰µg/ml) تهیه و سلولز به عنوان منبع کربن به صورت چهار عدد کاغذ فیلتر استریل در ابعاد تقریباً ۲×۲ سانتی‌متر در چهار طرف پلیت قرار گرفت (شکل ۱ ب). به اندازهٔ یک نخود از نمونه به مرکز کاغذهای فیلتر منتقل و پلیت به مدت یک هفته در دمای ۳۰°C گرماگذاری و سپس تشکیل جسم زایشی و خزش میکسوباکتر بررسی شد.



شکل ۱: جداسازی میکسوباکتر جدایه ۱۱۸ در الف) محیط WAT آگار با کشت متقاطع *E.coli* و ب) ST21 آگار با کاغذ فیلتر

خالص‌سازی

خالص‌سازی در ابتدا با انتقال مستقیم رأس جسم زایشی جوان به محیط VY/2 آگار (Shimkets *et al*., 2006) به وسیلهٔ سرنگ انسولین انجام شد و این انتقال چندین مرتبه صورت گرفت. سپس جسم زایشی از این محیط به چهار رأس کشت متقاطع *E. coli* زنده روی محیط WAT آگار انتقال یافت. این انتقال تا خالص‌سازی کامل چندین مرتبه تکرار گردید

نگهداری بلند مدت

جدایه در محیط کشت مایع Myxoviresin (Shimkets *et al*., 2006) و به مدت ۱۲-۱۰ روز در rpm ۱۶۰ و ˚C ۳۰ کشت داده و از کشت مایع به دست آمده برای نگهداری بلند مدت در فریزر ˚C ۸۰- استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی و رده‌بندی

مورفولوژی اجسام زایشی با استفاده از لوپ دوچشمی Olympus SZX12 و سلول‌های رویشی و میکسوسپورها با استفاده از میکروسکوپ بررسی شد. شناسایی مورفولوژیک بر اساس کلید شناسایی رایشنباخ و دورکین انجام گرفت .

بررسی خصوصیات بیوشیمیایی باکتری با آزمون API ZYM® برای بررسی ۱۹ واکنش آنزیمی و تعیین پروفایل آنزیمی باکتری صورت گرفت. دمای بهینهٔ رشد باکتری با کشت روی پلیت VY/2 آگار در سه دمای ۲۲، ۳۰ و ۴۴ °C تنظیم شد؛ گرماگذاری به مدت حداقل یک هفته انجام گرفت و مقایسهٔ قطر رشد باکتری در سه دما صورت پذیرفت. برای تعیین pH بهینه، محیط VY/2 آگار با pH های پنج، شش، هفت، هشت و نه تهیه و جدایه روی آنها منتقل شد. گرماگذاری در دمای ۳۰ °C به مدت حداقل یک هفته انجام گرفت. سپس قطر رشد باکتری در پنج pH اندازه‌گیری و بهترین pH رشد تعیین گردید. ۱۳ پلیت VY/2 آگار حاوی ۱۳ نوع آنتی‌بیوتیک با غلظت ذکر شده در جدول ۱ برای تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری استفاده شد. باکتری به این پلیت‌های آنتی‌بیوتیک انتقال یافت و حداقل به مدت یک هفته در ۳۰ °C گرماگذاری شد. بعد از این مدت، رشد یا عدم رشد باکتری در حضور آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

جدول۱: آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده در شناسایی و غلظت آنها

آنتی‌بیوتیک	غلظت نهایی
پلی‌میسن ۱۰ mg/ml	۵۰ µg/ml
جنتامیسین ۱۰ mg/ml	۵۰ µg/ml
اکسی‌تتراسایکلین ۱۰ mg/ml	۱۰ µg/ml
آمپی‌سیلین ۱۰ mg/ml	۱۰۰ µg/ml
کلرامفنیکل ۹ mg/ml	۳۰ µg/ml
اسپکتریومایسین ۱۰ mg/ml	۵۰ µg/ml
کانامایسین ۱۰ mg/ml	۵۰ µg/ml
سفالوسپورین ۱۰ mg/ml	۵۰ µg/ml
فوزیدیک اسید ۱۰ mg/ml	۵۰ µg/ml
باسیتراسین ۱۰ mg/ml	۵۰ µg/ml
تیواسترپتون ۱۰ mg/ml	۵۰ µg/ml
تری‌متوپریم ۱۰ mg/ml	۵۰ µg/ml
هیگرومایسین ۱۰ mg/ml	۱۵۰ µg/ml

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: سیکل دمایی PCR

مرحله	زمان (min)	دما (°C)
واسرشت اولیه	۵	۹۵
۳۴ چرخه واسرشت	۰/۵	۹۴
اتصال پرایمر	۰/۵	۵۲
طویل سازی	۲	۷۲
طویل سازی نهایی	۱۰	۷۲

به منظور بررسی فیلوژنتیکی جدایه، استخراج DNA طبق پروتکل استاندارد باکتری‌های گرم منفی و با استفاده از کیت Invisorb Spin Plant Mini (Invitek, Germany) انجام گرفت. DNAی جداسازی شده با واکنش PCR و با استفاده از پرایمرهای یونیورسال F27 و R1525 و برنامه دمایی جدول ۲ تکثیر یافت. در مرحلهٔ بعد محصول PCR با استفاده از کیت NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) خالص و توالی‌یابی با همان پرایمرها انجام شد. توالی‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SeqMan II نسخهٔ شش به هم متصل شدند تا توالی کامل ژن حاصل شود؛ سپس، این توالی با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی EzBioCloud مقایسه گردید. درخت فیلوژنی جدایه مورد مطالعه به وسیلهٔ نرم‌افزار MEGA نسخهٔ شش به روش حداکثر شباهت (Maximum liklihood method) با ۱۰۰ بار همانندسازی و در مقایسه با توالی سویه‌های شاخص گونه‌های مختلف میکسوباکترها رسم شد. از *Hymenobacter kanoulensis* T-3 که یک غیرمیکسوباکتر حرکت‌کننده به روش خزش است، به عنوان خارج از گروه برای رسم درخت فیلوژنتیک استفاده شد.

غربالگری فعالیت ضدمیکروبی

یک پیش‌کشت از جدایه میکسوباکتریایی ۱۱۸ در محیط Myxoviresin تهیه و ۱۰ mL از آن به محیط کشت Myxoviresin حاوی دو درصد رزین XAD4 (Sigma, USA) تلقیح و به مدت ۱۲ روز در ۱۶۰ rpm و ۳۰ °C رشد داده شد. سپس رزین و توده‌های میکسوباکتر از محیط کشت جدا و بعد از شستشو با آب دیونیزه، با ۷۰ mL استون استخراج گردید. عصارهٔ استونی در ۴۰ °C با روتاری (Heidolph, Germany) خشک و ۱ mL متانول به آن اضافه شد. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصارهٔ متانولی جدایه میکسوباکتریایی ۱۱۸ با استفاده از روش رقت‌سازی در میکروپلیت ۹۶ چاهکی (Wiegand *et al*, 2008) علیه میکروارگانیسم‌های شاخص شامل *Escherichia coli* (DSM 116)، *Escherichia coli* TolC، *Staphylococcus aureus* (Newman)، *Candida albicans* (DSM 1665)، *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 19882)، *Bucillus subtilis* (DSM10s)، *Micrococcus luteus* (DSM1790)، *Chromobacterium violaceum* (DSM30191)، *Pichia anomala* (DSM6766)، *Mycobacterium smegmatis* (ATCC700084) و *Mucor himalis* (DSM2656) از گروه کلکسیون سویه

www.SID.ir

Archive of SID

میکروبی (MISG) مرکز هلم هولتز (HZI) در برانشوایگ آلمان مورد مطالعه قرار گرفت. از محیط کشت مولر هینتون براث (MHB) برای باکتری‌های شاخص و محیط کشت MYC (Cazin *et al.*, 1989) برای مخمر و قارچ شاخص استفاده شد. کدورت باکتری‌های آزمون در محیط کشت MHB ۰/۰۵ مک فارلند و کدورت قارچ و مخمرهای آزمون در محیط کشت MYC ۰/۰۱ مک فارلند بود. در صورتی‌که عصاره در رقت‌های بیشتر از یک هشتم روی هر کدام از میکروارگانیسم‌ها ایجاد بازدارندگی می‌کرد، با HPLC و طیف سنجی جرمی مورد بررسی قرار می‌گرفت.

شناسایی متابولیت

عصارهٔ متانولی به صورت اتوماتیک و در حجم پنج مایکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق شد. HPLC با دستگاه Agilent 1100 مجهز به ستون X-Bridge (Waters, Milford, USA) با ذرات ۳/۵ µm و ابعاد ۱۰۰ mm×۲/۱ و مجهز به یک آشکارساز DAD (۴۰۰-۲۰۰ nm)، با سیستم حلالی A شامل بافر آمونیوم استات ۰/۰۵ میلی‌مولار pH= ۵ و B شامل استونیتریل و بافر آمونیوم استات ۰/۰۵ میلی مولار در شدت جریان ۰/۳ mL/min انجام یافت. فرکسیون‌گیری به روش برش زمانی هر ۳۰ ثانیه به صورت خودکار در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای صورت گرفت. فراکسیون‌ها با دستگاه MiniVap (Porvair Sciences, UK) در جریان نیتروژن ۴۰ ˚C خشک و چاهک‌های پلیت با ۱۵۰ مایکرولیتر میکروارگانیسم شاخص حساس به این عصاره تلقیح شد.

سپس از عصارهٔ متانولی برای انجام LC/MS استفاده شد که شامل یک سیستم HPLC، Agilent 1200 مجهز به آشکارساز DAD (۶۰۰-۲۰۰ nm) در اتصال به یک اسپکترومتر جرمی maXis UHR-TOF (Bruker Daltonics, USA) بود. عصاره به وسیلهٔ یک ستون ACQUITY UPLC BEH C18 (Waters, Milford, USA)، در ابعاد ۵۰ mm×۲/۱ و با ذرات µm ۱/۷ آنالیز گردید. شرایط کروماتوگرافی برای انجام LC/MS به این صورت بود: دمای محفظهٔ ستون ۴۰ ˚C، شدت جریان mL/min ۰/۶، حلال A (۰/۱ درصد فرمیک اسید)، حلال B (استونیتریل حاوی ۰/۱ درصد فرمیک اسید)، شیب غلظت ۵ درصد B در دقیقه ۰/۵ تا ۹۵ درصد B در دقیقه ۱۰ و ثابت در ۹۵ درصد B تا دقیقه ۱۹/۵. یون‌سازی به روش ESI در حالت مثبت انجام شد و نتایج با نرم‌افزار Bruker Compass Data Analysis 4.2 مورد بررسی قرار گرفت. ترکیبات فعال بر اساس مقایسهٔ نتایج LC/MS، طیف UV و زمان بازداری در HPLC با پایگاه داده‌های Myxobase (HZI, Germany) شناسایی شدند.

نتایج و بحث

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی جدایه ۱۱۸

جدایه ۱۱۸ از خاک به روش طعمه‌گذاری با کشت *E. coli* جداسازی و به روش انتقال مستقیم از فروتینگ بادی خالص سازی

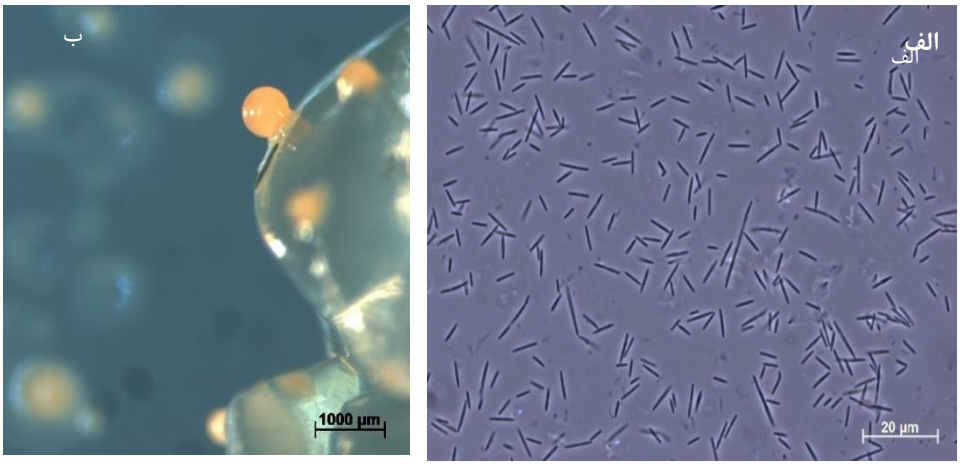
www.SID.ir

Archive of SID

شد. این جدایه میکسوباکتر گرم منفی، هوازی و دارای سلول‌های میله‌ای کشیده با دو انتهای گرد بود و اجسام زایشی کروی و نارنجی رنگی تولید می‌کرد که شباهت آن با جنس *Myxococcus* را نشان می‌داد (شکل۲). رشد جدایه ۱۱۸ در محدودهٔ pH= ۶-۹ و بهینه pH= ۷ و محدودهٔ دمایی ˚C ۲۰-۳۵ و بهینه ˚C ۳۰ مشاهده شد.

خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک جدایه ۱۱۸ با ۴ گونه جنس *Myxococcus* در جدول ۳ مقایسه شده است. مقایسه نتایج به دست آمده از آزمون API ZYM جدایه ۱۱۸ با گونه های *Myxococcus* (جدول ۳) نشان داد که مشخصات بیوشیمیایی جدایه با گونه *M. fulvus* منطبق است.

مقاومت جدایه به آمپی‌سیلین، باسیتراسین، اسپکتینومایسین، سفالوسپورین، جنتامایسین، پلی مایسین، فوزیدیک اسید، تری متوپریل و هایگرومایسین و حساسیت آن به اکسی تتراسایکلین، کانامایسین، تیوستریپتون و کلرامفنیکل به همراه خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی جدایه ۱۱۸ نشان داد که این جدایه بر اساس کلید شناسایی رایشنباخ و دورکین به گونهٔ *M. fulvus* تعلق دارد.



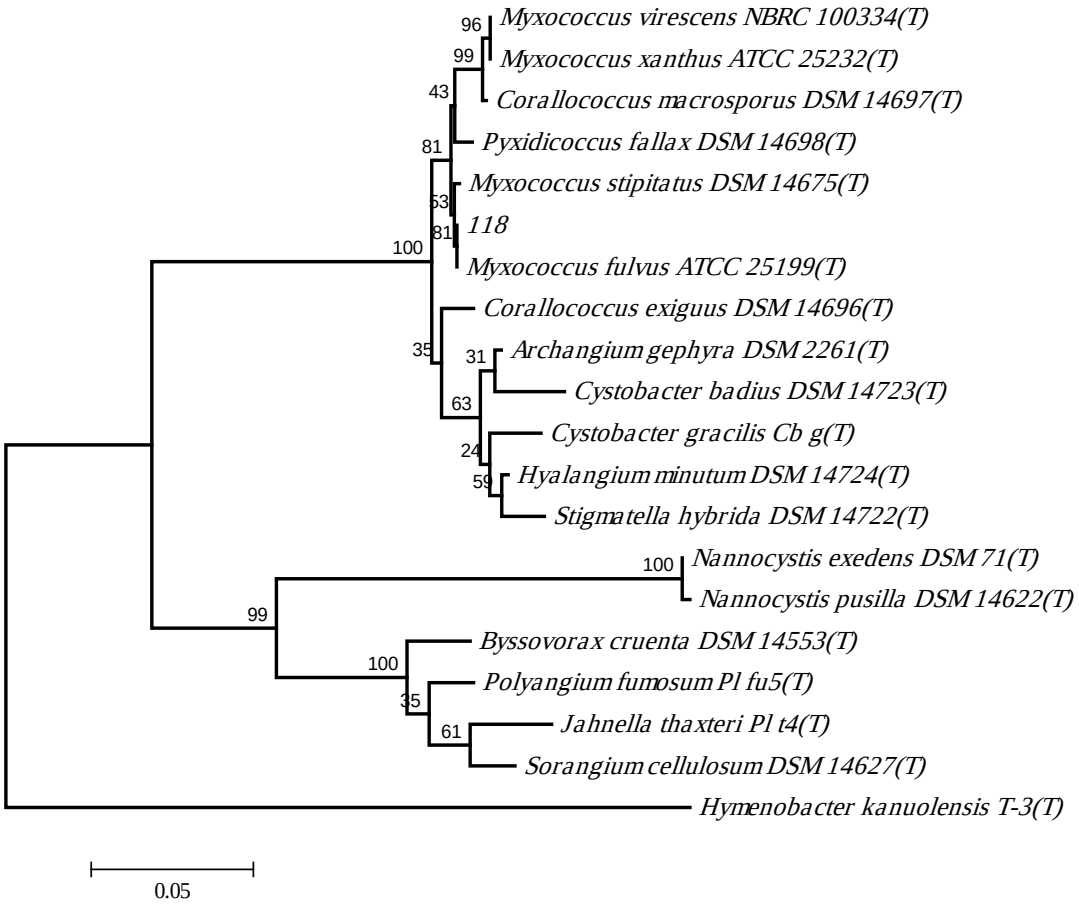
شکل۲: جدایه ۱۱۸ الف) سلول‌های رویشی باریک و بلند با دوانتهای گرد و ب) جسم زایشی کروی، بزرگ، بدون پایه و منفرد که مشخصهٔ جنس *Myxococcus* است.

آنالیز توالی 16S rDNA جدایه ۱۱۸ و آنالیز فیلوژنتیک آن

مقایسهٔ توالی۱۳۲۰ بازی 16S rDNA جدایه ۱۱۸ با توالی سویه‌های شاخص میکسوباکترها در پایگاه اطلاعاتی EzBioCloud نشان داد که این جدایه شباهت ۱۰۰ درصد با سویه *M. fulvus* ATCC 25199 داشت (شکل ۳). درخت فیلوژنتیک رسم شده به روش حداکثر شباهت در بین گونه‌های مختلف میکسوباکترها نیز تعلق این جدایه به گونه *M. fulvus* را تأیید می‌کند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۳: درخت فیلوژنتیک سویه‌های شاخص برخی از گونه‌های میکسوباکتر و جدایه ۱۱۸ نشان‌دهندهٔ شباهت آن با گونهٔ *M. fulvus* است. سه زیر راستهٔ میکسوباکترها در شکل به خوبی از یکدیگر جدا شده‌اند. اعداد در محل گره‌ها Bootstrapها را نشان می‌دهد. مقیاس نشان‌دهندهٔ میزان تفاوت در توالی گونه‌هاست.

کشت مایع میکسوباکتر

جدایه ۱۱۸ در محیط کشت مایع Myxoviresin به صورت توده‌ای و غیرهموژن رشد کرد و حتی با چندین بار انتقال در کشت مایع در طول چند ماه، کشت هموژن ایجاد نشد. از این رو برای ادامهٔ بررسی از توده‌های باکتریایی استفاده شد.

فعالیت ضدمیکروبی و ترکیبات فعال زیستی جدایه ۱۱۸

نتایج حاصل نشان داد که عصارهٔ متانولی جدایه ۱۱۸ (حاصل از محیط کشت Myxoviresin) قوی‌ترین فعالیت ضدمیکروبی خود را علیه میکروارگانیسم‌های گرم منفی *E. coli* TolC تا رقت یک شانزدهم و گرم مثبت *M. luteus* تا رقت یک سی و دوم نشان می‌دهد. بنابراین عصاره با HPLC فراکسیون‌گیری و آزمون زیستی علیه این دو میکروارگانیسم انجام یافت. آزمون فعالیت ضدباکتریایی فراکسیون‌های HPLC نشان داد که فراکسیون‌های دقایق شش تا هشت دارای فعالیت زیستی بودند. بررسی LC/MS منجر به شناسایی دو پیک با فعالیت ضدمیکروبی در دقایق ۵/۶۷ الی ۵/۹۱ و ۱۵/۲۴ تا ۱۵/۳۰ شد. پیک ابتدایی یون مولکولی $[M+Na]^+$ با *m/z* ۴۶۲/۰۵۱۱ و پیک دوم یون مولکولی $[M+H]^+$ با *m/z* ۴۸۸/۲۰۴۰ را نشان دادند (شکل۴ الف).

www.SID.ir

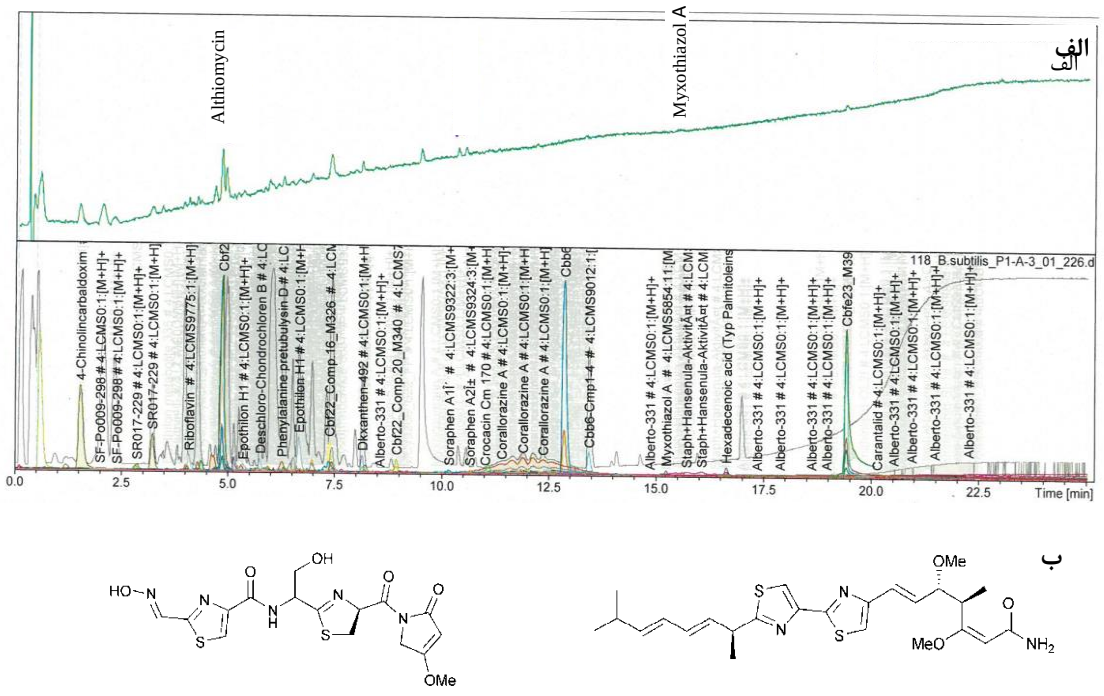
Archive of SID

مقایسهٔ نتایج به دست آمده از زمان بازداری و وزن مولکولی این پیک‌ها با پایگاه داده‌ها و به وسیلهٔ نرم‌افزار منجر به شناسایی این پیک‌ها به عنوان آلتیومایسین و میکسوتیازول A شد (شکل۴ب)

فعالیت ضدمیکروبی و ترکیبات فعال زیستی جدایه ۱۱۸

نتایج حاصل نشان داد که عصارهٔ متانولی جدایه ۱۱۸ (حاصل از محیط کشت Myxoviresin) قوی‌ترین فعالیت ضدمیکروبی خود را علیه میکروارگانیسم‌های گرم منفی *E. coli* TolC تا رقت یک شانزدهم و گرم مثبت *M. luteus* تا رقت یک سی و دوم نشان می‌دهد. بنابراین عصاره با HPLC فراکسیون‌گیری و آزمون زیستی علیه این دو میکروارگانیسم انجام یافت. آزمون فعالیت ضدباکتریایی فراکسیون‌های HPLC نشان داد که فراکسیون‌های دقایق شش تا هشت دارای فعالیت زیستی بودند. بررسی LC/MS منجر به شناسایی دو پیک با فعالیت ضدمیکروبی در دقایق ۵/۶۷ الی ۵/۹۱ و ۱۵/۲۴ تا ۱۵/۳۰ شد. پیک ابتدایی یون مولکولی $[M+Na]^+$ با *m/z* ۴۶۲/۰۵۱۱ و پیک دوم یون مولکولی $[M+H]^+$ با *m/z* ۴۸۸/۲۰۴۰ را نشان دادند (شکل۴ الف). مقایسهٔ نتایج به دست آمده از زمان بازداری و وزن مولکولی این پیک‌ها با پایگاه داده‌ها و به وسیلهٔ نرم‌افزار منجر به شناسایی این پیک‌ها به عنوان آلتیومایسین و میکسوتیازول A شد (شکل۴ب).

ب



شکل ۴: شناسایی متابولیت‌های فعال جدایه ۱۱۸. الف) پروفایل عصارهٔ متانولی کشت در LC/MS به همراه پیک‌های آنالیزشده. ب) ساختار مولکولی میکسوتیازول در راست وآلتیومایسین در چپ قرار دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۳: مقایسهٔ ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی جدایه ۱۱۸ و سویه‌های مرتبط فیلوژنتیکی *Myxococcus*

	گونه‌های *Myxococcus*				
	جدایه ۱۱۸	*M. fulvus*	*M. stipitatus*	*M. xanthus*	***M. virescens***
خصوصیات					
قرمز کنگو	+	+	+	+	+
سلولز	-	-	-	-	-
اکسیداز	-	-	-	-	-
کاتالاز	+	+	+	+	+
رشد ۴۴ °C	-	-	-	-	-
نفوذ به درون آگار	-	-	-	-	-
	API ZYM				
آلکالین فسفاتاز	+	+	+	+	+
استراز (C4)	+	+	+	+	+
استراز لیپاز (C8)	+	+	+	+	+
لیپاز (C12)	+	+	+	+	+
لوسین آریل آمیداز	+	+	+	+	+
والین آریل آمیداز	+	+	+	+	+
سیستئین آریل آمیداز	+	+	+	+	+
تریپسین	+	+	+	+	+
آلفا کیموتریپسین	-	-	+	+	+
اسید فسفاتاز	+	+	+	+	+
نفتول	+	+	+	+	+
فسفوهیدرولاز آلفا	+	+	+	-	-
گالاکتوزیداز بتا گالاکتوزیداز	+	+	-	-	-
بتا گلوکورونیداز	+	+	-	-	-
آلفا گلوکوزیداز	+	+	-	-	-
بتا گلوکوزیداز	+	+	-	-	-
N-استیل بتا گلوکوزآمینیداز	+	+	+	-	+
آلفا مانوزیداز	-	-	-	-	-
آلفا فوکوزیداز	-	-	-	-	-

در این مطالعه، جدایه میکسوباکتریایی ۱۱۸ از نمونهٔ خاک برداشته شده از منطقهٔ کوهرنگ چهارمحال و بختیاری ایران جداسازی

www.SID.ir

Archive of SID

شد. به طور کلی جداسازی میکسوباکترها به دلیل کندی رشد مشکل است زیرا احتمال آلودگی با باکتری‌های سریع‌الرشد و قارچ‌ها بیشتر می‌شود؛ به طوری که، حتی بازیابی کشت خالص سویه‌های جداسازی شده نیز به خاطر آلودگی‌ها مشکل و زمان‌بر است (Shimkets *et al*., 2006). تاکسونومی میکسوباکترها بر پایهٔ خصوصیات مورفولوژیکی مانند شکل و اندازهٔ سلول‌های رویشی و میکسوسپورها، رنگ و نوع اجسام زایشی و خزش باکتری است (Spröer *et al*., 1999) بررسی این خصوصیات نشان داد که سویه ۱۱۸ به گونه *M. fulvus* تعلق دارد که اولین بار توسط Thaxter در سال ۱۸۹۲ شرح داده شد (Rosenberg *et al*., 2014). در ابتدا رده‌بندی میکسوباکترها بر اساس مورفولوژی انجام می‌شد که تمایز بین گونه‌های مختلف بسیاری از جنس‌ها را مشکل می‌ساخت. اخیراً شناسایی فیلوژنتیکی بر اساس آنالیز توالی 16S rDNA در کنار سایر روش‌های شناسایی برای میکسوباکترها انجام می‌شود. توالی‌یابی ژن 16S rRNA نیز شناسایی این جدایه به عنوان *M. fulvus* را تأیید کرد. جداسازی و خالص‌سازی این گونه به دلیل اجسام زایشی که خارج از سطح آگار رشد و میکسوسپور فراوانی تولید می‌کند، نسبت به برخی میکسوباکترها که در داخل آگار رشد کرده و خزش و اجسام زایشی ضعیفی تولید می‌کنند، آسان‌تر است (Zhang *et al*., 2003).

میکسوباکترها پتانسیل بالایی برای تولید متابولیت‌های ثانویه از خود نشان می‌دهند که این به دلیل وجود مکانیسم‌های جدید عملکردی و تولید است که مختص این دسته از باکتری‌ها می‌باشد . به منظور ارزیابی توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه جدایه ۱۱۸ فرایند کشت، استخراج و آزمون فعالیت ضدمیکروبی انجام یافت که نشان داد که این جدایه فعالیت ضدباکتریایی بالایی علیه *E. coli* و *M. luteus* دارد. بررسی‌های HPLC و LC/MS عصاره منجر به شناسایی آنتی‌بیوتیک آلتیومایسین و میکسوتیازول شد. آلتیومایسین یک بازدارندهٔ سنتز پروتئین از دستهٔ پپتیدهای حلقوی است که فرایند ترجمه را در مرحلهٔ پپتیدیل ترانسفر مختل می‌کند (Fujimoto *et al*., 1970). این ترکیب قبلاً در استرپتومایسس‌ها و سپس در میکسوباکترها گزارش شده است (Kunze *et al*., 1982). این ترکیب یکی از متابولیت‌های نادر میکسوباکتریایی است که به متابولیت‌های تولید شده توسط دیگر میکروارگانیسم‌ها شباهت دارد . این متابولیت وسیع‌الطیف با سمیت سلولی پایین، فعالیت مناسبی را علیه سلول‌های پروکاریوت نشان می‌دهد.

میکسوتیازول ترکیب دیگر شناسایی شده در جدایه ۱۱۸ از دستهٔ بی‌تیازول‌هاست که فعالیت ضدباکتریایی با مکانیسم ناشناخته دارد (Weissman & Müller, 2010)، اما فعالیت ضدقارچی خود را از طریق مهار کمپلکس III تنفسی اعمال می‌کند .. بسیاری از ترکیبات میکسوباکتریایی این مکانیسم عمل را دارند، اما این روش در میان ترکیبات طبیعی به‌دست‌آمده از سایر باکتری‌ها نادر است (Degli Esposti, 1998). همان‌گونه که در شکل (۴ الف) مشاهده می‌شود، این ترکیب با غلظت بسیار کم توسط جدایه مورد مطالعه تولید می‌شود؛ به همین علت، آثار ضدقارچی در عصارهٔ متانولی مشاهده نشده است. هر چند که می‌توان با انجام بهینه‌سازی در محیط کشت میزان تولید آن را افزایش داد (Weissman & Müller, 2010). شناسایی این ترکیبات نشان داد که فرایند کشت، استخراج و غربالگری فعالیت زیستی به درستی انجام شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه گیری کلی

جدایه ۱۱۸ نتایج امیدبخشی در آزمون‌های ابتدایی نشان می‌دهد که می‌تواند اهمیت این منبع جدید و بالقوه را برای تولید این آنتی‌بیوتیک‌ها خاطرنشان سازد. همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که جستجو برای جداسازی سویه‌های میکسوباکتر تولید کننده ترکیبات ضد میکروبی از خاک های ایران نتیجه‌بخش است و می‌توان با گسترش نمونه‌گیری‌ها به مناطقی با شرایط اکولوژیکی خاص انتظار یافتن گونه‌ها و ترکیبات جدیدی را داشت که به عنوان ترکیب پیشرو برای توسعه دارو های جدید مورد استفاده قرار می‌گیرند.

سپاسگزاری

نویسنده از مؤسسهٔ Helmholtz Centrum for Infection Research (HZI) شهر برانشوایگ آلمان به دلیل فراهم نمودن تجهیزات و حصول این نتایج تشکر می‌کند.

منابع

Cazin, J., Wiemer, D.F., and Howard, J.J. (1989) Isolation, growth characteristics, and long-term storage of fungi cultivated by attine ants. Applied and environmental microbiology, 55(6): 1346-1350.

Dawid, W. (2000) Biology and global distribution of myxobacteria in soils. FEMS microbiology reviews, 24(4): 403-427.

Degli Esposti, M. (1998) Inhibitors of NADH–ubiquinone reductase: an overview. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1364(2): 222-235.

Dworkin, M. (1996) Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. Microbiological reviews, 60(1): 70.

Fujimoto, H., Kinoshita, T., Suzuki, H., and Umezawa, H. (1970) Studies on the mode of action of althiomycin. The journal of antibiotics, 23(6): 271-275.

Kunze, B., Reichenbach, H., Augustiniak, H., and Höfle, G. (1982) Isolation and identification of althiomycin from Cystobacter fuscus (Myxobacterales). The journal of antibiotics, 35(5): 635-636.

Reichenbach, H. (2001) Myxobacteria, producers of novel bioactive substances. Journal of industrial microbiology and biotechnology, 27(3): 149-156.

Reichenbach, H., and Höfle, G. (1999) Myxobacteria as producers of secondary metabolites. Drug discovery from nature: 149-179..

Spröer, C., Reichenbach, H., and Stackebrandt, E. (1999) The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 49(3): 1255-1262.

Weissman, K.J., and Müller, R (2010) Myxobacterial secondary metabolites: bioactivities and modes-of-action. Natural product reports, 27(9): 1276-1295.

www.SID.ir

Archive of SID

Wiegand, I., Hilpert, K., and Hancock, R.E. (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature protocols, 3(2): 163-175.

Zhang, L., Wang, H., Fang, X., Stackebrandt, E., and Ding, Y. (2003) Improved methods of isolation and purification of myxobacteria and development of fruiting body formation of two strains. Journal of microbiological methods, 54(1): 21-27.

www.SID.ir

Archive of SID

Isolation and Identification of a Myxobacterium Producing Myxothiazol and Althiomycin from Iran Soil

A. Moradi[1], M.Yaghoubi Avini, G. Ebrahimipour[1]*, A. Ghasempour[2]

Received: 2016.10.23
Accepted:2017.3.1

Abstract

Myxobacteria are soil bacteria that move by gliding and have an astonishing life cycle culminating in fruiting body formation. The myxobacterial strain no.118 was isolated from unexplored soil of **Koohrang** County, **Chaharmahal**-*o*-**Bakhtiari** Province and tested for potential antimicrobial activity against various human pathogens. On the basis of results, strain 118 significantly inhibited growth of *E. coli* and *M. luteus* therefore was used for further characterization. Analysis of morphological, biochemical and 16S rRNA gene sequence indicated that this strain belongs to the genus *Myxococcus*. In addition, neighbor-joining phylogenetic tree confirmed the relationships of this strain to other members of *Myxococcus* genera. In order to explore the potential bioactivities, extract of the fermented broth culture was prepared with organic solvent extraction method. The methanol extract was subjected to HPLC fractionation against sensitive pathogens. LC/MS analysis resulted in the identification of Myxothiazol and Althiomycin antibiotics in methanol extract of the strain no. 118.

.**Keywords: Myxothiazol and Althiomycin antibiotics, antimicrobial activity, Myxococcus**

1-Department of Microbiology and Microbial Technology, Faculty of Biological Sciences and Technologies, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

(Corresponding Author:* g-ebrahimi@sbu.ac.ir**)**

2-Department of Microbiology and Microbial Technology, Faculty of Biological s and Technologies, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

(*Corresponding Author*:* g-ebrahimi@sbu.ac.ir**)**

www.SID.ir