Archive of SID

Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

Study of active secondary metabolites of *Streptomyces levis* isolated from north west soils of Iran and their in vitro and in vivo antibacterial effects

Ali Reza Dehnad[1]*, Rahib Abushov[2], Javad Hamedi[3], Mohammad Reza Nahaei[4,5], Haedeh Mobaiyen[4], Ali Zendehdel[6]

[1]Biotechnology Department, East Azerbaijan Research and Education Center Agricultural and Natural Resources, AREEO, Tabriz, Iran
[2]Research Center for New Antibiotics, Moscow, Russia
[3]Department of Microbiology, School of Biology, University of Tehran, Tehran, Iran
[4]Department of Microbiology, Islamic Azad University-Tabriz branch, Tabriz, Iran
[5]Departmentt of Microbiology, School of Medicine, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[6]Laboratory of Biotechnology, East Azerbaijan Research Center for Agriculture and Natural Resources, Organization for Research and Training, Tehran, Iran
*Corresponding author; E-mail: adehnad@abrii.ac.ir

Received: 2 Augest 2014 Accepted: 11 October 2014 First Published online: 9 July 2017
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2017 August;39(3):39-46

Abstract

Background: *Streptomyces levis* is a member of *Actinomycetes* family. Chemical compounds extracted from this bacterium have been used as antibiotics, anti-tumoral, anti-bacterial, anti-fungal, antiviral, anticancer factors. The purpose of this study, was to investigate different metabolites of *Streptomyces* strains isolated from north west soils, of Iran and antimicrobial effects of them.

Methods: The soil samples were taken from north west of Iran in 2010. The isolated bacteria were purified and identified by conventional methods. The metabolites of this bacterium were extracted by 7 different solvents (diethyl ether, dichloromethane, hexane, ethyl acetate, chloroform, methanol and water). The antimicrobial effects of metabolites were tested by disk agar diffusion method on Gram-positive and Gram- negative bacteria. The metabolites with antibacterial effects were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

Results: Metabolites produced from diethyl ether solvent affected Gram- positive and Gram- negative strains and 15 different compounds identified in the active metabolite of the bacterium. The main ingredients were: Docosanoic acid, methyl ester (11.578%), 9-12-octadecadienoic acid (2.961%), 5-Tetracosenois acid, methyl ester (8.389%), Bis (2-ethylhexyl) phthalate (2.153%), and D-alpha-Tocopherol (0.959%).

Conclusion: Results of this study showed that docosanoic acid, methyl ester (11.578%) and 5-tetracosenois acid methyl ester (8.389%), were the main metabolites of *Streptomyces levis* isolated from north west soils of Iran. Antimicrobial effects of extracts could be due to the presence of 1, 2-benzene dicarboxylic acid diisooctyl ester compounds and bis (2-ethylhexyl) phthalate in the metabolite.

Keywords: *Streptomyces levis*, Gas chromatography, Mass spectrometry, Metabolite, Antimicrobial effect, Histopathology

How to cite this article: Dehnad A.R, Abushov R, Hamedi J, Nahaei M.R, Mobaiyen H, Zendehdel A. [Study of active secondary metabolites of Streptomyces levis isolated from north west soil and their antibacterial effects, in vitro and in vivo]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2017 August;39(3):39-46. Persian.

© 2017 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

خواص ضد میکروبی، شیمیایی و هیستوپاتولوژی in vitro و in vivo متابولیت های ثانویه باکتری Streptomyces levis جداسازی شده از خاک های شمال غرب کشور

علیرضا دهناد*[۱]، راهب آباشوف[۲]، جواد حامدی[۳]، محمد رضا نهایی[۴]، هایده مبین[۵]، علی زنده دل[۶]

[۱] دپارتمان بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات واموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی،سازمان تحقیقات وآموزش کشاورزی ،تبریز- ایران
[۲] مرکز تحقیقات آنتی بیوتیک های جدید، مسکو، روسیه
[۳] گروه میکروبیولوژی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۴] گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی تبریز و مرکز تحقیقات دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۵] گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران
[۶] آزمایشگاه تخصصی بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات آموزش استان آذربایجان شرقی، سازمان تحقیقات و آموزش کشور، تهران، ایران
*نویسنده رابط؛ ایمیل: adehnad@abrii.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۳/۵/۱۱ پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۱۹ انتشار برخط: ۱۳۹۶/۴/۱۸
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. مرداد و شهریور ۱۳۹۶؛ ۳۹(۳): ۳۹-۴۶

چکیده

زمینه: باکتری *Streptomyces levis* از خانواده اکتینومیست ها می باشد. تاکنون ترکیبات شیمیایی جدا شده از این باکتری ها به عنوان آنتی بیوتیک، ضد تومور، ضد قارچ، ضد ویروس و ضد سرطان مورد استفاده قرار گرفته اند. هدف از این مطالعه، آنالیز متابولیت های حاصل از استرپتومایسس های جدا شده از منطقه شمال غرب کشور، بررسی اثرات ضد میکروبی و بررسی خاصیت ترمیم کنندگی زخم توسط آنها بود.

روش کار: در بهار۱۳۸۸از خاک مناطق شمال غرب کشور نمونه برداری و باکتری مورد نظر خالص سازی و تعیین هویت شد، متابولیت های آن توسط ۷ حلال (دی اتیل اتر، دی کلرومتان، هگزان، اتیل استات، کلروفرم، متانول و آب) استخراج شد. خواص ضد میکروبی متابولیت ها با روش دیسک دیفیوژن آگار روی میکروارگانیسم های گرم مثبت و منفی مورد بررسی قرار گرفت. متابولیت حاوی خواص ضد باکتریایی با روش کروماتوگرافی گازی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: تنها متابولیت اتری روی تمام سوش های میکروبی گرم مثبت و منفی اثر داشت و ۱۵ ترکیب در متابولیت فعال این باکتری ها شناسایی شد که عمده مواد آنها عبارت بودند از: Docosanoic acid methyl ester (٪ ۱۱/۵۷۸)، 12-octadecadienoic acid- (٪۲/۹۶۱)، Tetracosenois acid-methyl ester (٪ ۸/۳۸۹)، Bis (2-ethylhexyl) phthalate (٪ ۲/۱۵۳) و D-alpha-Tocopherol (٪ ۰/۹۵۹).

نتیجه گیری: یافته های این مطالعه نشان می دهد که Docosanoic acid methyl ester و Tetracosenois acid methyl ester- ترکیبات عمده متابولیت این باکتری‌ها را تشکیل می‌دهند. اثرات ضد میکروبی و ضد توموری می‌تواند به دلیل وجود ترکیبات 1,2-Benzenedicarboxylic acid diisooctyl ester و Bis(2-ethylhexyl) phthalate در متابولیت باشد. نتایج حاصل از بررسی هیستوپاتولوژی نشان داد که متابولیت حاصل از باکتری، بر زخم ناشی از استافیلوکوکوس، اثر ترمیمی قابل توجهی دارد.

کلید واژه ها: *Streptomyces levis*، کروماتوگرافی گازی، متابولیت، اثر ضد میکروبی، هیستوپاتولوژی

نحوه استناد به این مقاله: دهناد ع، آباشوف ر، حامدی ج، نهایی م، مبین ه، زنده دل ع. خواص ضد میکروبی، شیمیایی و هیستوپاتولوژی In vitro و In vivo متابولیت های ثانویه باکتری Streptomyces levis جداسازی شده از خاک های شمال غرب کشور. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۶؛ ۳۹(۳): ۳۹-۴۶

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

متابولیت های ثانویه، محصولات بیوسنتزی خاصی هستند که از متابولیت های اولیه مشتق می شوند. این فرآورده ها عمدتاً در گیاهان و میکروارگانیسم ها یافت می شوند. ظاهراً هیچ نقشی در بقای ارگانیسم مولد خود ندارند (۱). تاکنون بیش از ۲۳۰۰۰ متابولیت ثانویه فعال از میکروارگانیسم ها گزارش شده است. حدود ۱۰۰۰ نوع از این متابولیت‌ها، توسط اکتینومیست‌ها تولید می‌شوند (۲). اکتینومیست‌ها منبعی سرشار از انواع محصولات فعال زیستی از قبیل: مواد ضد قارچی، ضد میکروبی، علف کش-های طبیعی، داروهای ضد سرطان و عوامل سرکوب کننده ایمنی هستند (۲،۳). استرپتومایسس‌ها (*Streptomyces*) در راسته اکتینومیست‌ها (*Actinomycetes*) که باکتری‌های گرم مثبت، هوازی، شیمیوارگانوتروف، تولید کننده آندوسپور، بدون حرکت و رشته‌ای قرار دارند. استرپتومایسس ها طولانی ترین ژنوم را در بین باکتری‌های اکتینومیست دارا بوده و درصد C+G بسیار بالایی دارند. بزرگ بودن ژنوم، توانایی تولید انواع متابولیت های ثانویه را به این باکتری‌ها می‌دهد که آنتی بیوتیک‌ها از جمله این متابولیت‌ها می‌باشند (۴). پژوهش‌های مختلفی در مورد ترکیبات شیمیایی متابولیت ثانویه باکتری استرپتومایسس انجام گرفته است. آتا و همکاران در سال ۲۰۱۲ در بررسی متابولیت ثانویه *Streptomyces lydicus* AZ-55، ترکیب آنتی بیوتیکی پیچیده Natamycin را استخراج نمودند (۵). بن آمر مهدی و همکاران نیز متابولیت ثانویه *Streptomyces* sp.TN58 را مورد بررسی قرار دادند و ترکیبات مختلفی مانندbrevianamideF، Nβ-acetyltryptamine را کشف نمودند (۶). اسمایی و همکاران ترکیبات متابولیت ثانویه *Streptomyces* sp.TN256 را شناسایی و ترکیبات زیادی ازجمله ۱-Nonadecene و di-(2-ethylhexyl)phthalate که دارای اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی هستند را استخراج کردند (۷). در سال‌های اخیر با ایجاد مقاومت در باکتری ها، اثر آنتی بیوتیک‌ها بر روی باکتری‌ها کمتر شده و درمان بیماری های عفونی با مشکل مواجه شده است(۸). لذا برای مقابله با روند صعودی مقاومت دارویی، استفاده از ایزوله‌های تولید کننده آنتی بیوتیک جدید ضروری به نظر می رسد. (۹). یا با خواص گسترده ضدمیکروبی روی ارگانیسم های گرم مثبت، گرم منفی و خواص ضد مخمری و ضدقارچی می باشد و مطالعات مشابه انجام گرفته توسط سایر محققین احتمالاً حتی دارای اثرات ضدتوموری است(۱۰). متابولیت های ثانویه ای پس از خشک شدن عصاره خام با سیکلو هاکسان به منظور تهیه بقایای قطبی و غیر قطبی. خالص سازی توسط کروماتوگرافی ستون منجر به جداسازی پنج قطب و یک قطعه غیر قطبی شد.(۱۱،۱۲). تاثیر متابولیت‌های ثانویه اکتینومیست‌های جدید جدا شده از خاک را بر برخی از میکروارگانیسم‌های بیماری زا اثبات کردند(۱۳). ترمیم زخم پوستی روندی است که پس از جراحت، از طریق یک سری از اتفاقات هماهنگ بافتی شروع می‌شود و پوست را به سمت ترمیم و عملکرد حفاظتی خود هدایت می‌کند. التیام زخم پوستی شامل چند مرحله مختلف و پیچیده است. مراحل ترمیم زخم عبارتند از: ۱– فاز التهاب ۲– فاز تکثیر ۳– فاز تعمیر. در واقع هر یک از این فازها نیازمند اندرکنش مجموعه پیچیده ای از وقایع بین انواع سلول‌ها و مولکول‌ها می باشد (۱۴). از گذشته های دور پزشکان مصری، یونانی و هندی با توسعه روش‌های موثر در پی درمان زخم در کوتاه ترین زمان و با کم‌ترین عارضه بودند (۱۵). در حال حاضر قدرت ضد باکتریایی و خواص بیوشیمیایی متابولیت های ثانویه استرپتومایسس‌ها آنها را به یک منبع امید بخش در روند ترمیم زخم تبدیل کرده است (۱۶). SL-111 یک متابولیت ثانویه فعال جدا شده از *Streptomyces levis* است. هیچ مطالعه‌ای روی اثرات آن روی ترمیم زخم عفونی یا سوختگی انجام نگرفته است. هدف از تحقیق حاضر بررسی و یافتن مواد آنتی باکتریال جدید از میکروارگانسیم های خاک زی بومی ایران و بررسی میزان اثر SL-111 در تسریع ترمیم زخم عفونی در رت می باشد.

روش کار

نمونه های خاک از مناطق مختلف شمال غرب کشور جمع آوری و به منظور جداسازی اکتینومیست ها، رقت های 10^{-1} الی 10^{-4} به صورت سری تهیه گردیدند. از رقت های به دست آمده به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به پلیت های حاوی محیط کشت (Starch SCA(Casein Agar منتقل گردید. سپس این پلیت ها در انکوباتور با دمای ۲۷ الی ۲۹ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از گذشت ۷ روز، کلنی های مورد نظر بر اساس خواص مورفولوژیک انتخاب و به پلیت جدید حاوی همین محیط کشت منتقل گردیدند. این پلیت ها در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۵ روز انکوبه شدند. سپس تک کلونی‌های مورد نظر را به محیط مایع (International *Streptomyces* project medium) ISP انتقال داده و در انکوباتور شیکردار به مدت ۴–۳ روز قرار داده، و کشت اولیه تهیه گردید.

مقداری از باکتری خالص جداسازی شده از خاک، در یک ارلن مایر حاوی۲۵۰ میلی لیتر از محیط کشت (Muller Hinton MHB(Broth قرار داده شد. سپس به انکوباتور شیکردار، با دمای ۲۸درجه سانتی گراد و سرعت ۱۲۵ دور در دقیقه انتقال داده شد. پس از ۳۶ ساعت میزان کدورت محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. در مرحله دوم ۱۰ ارلن حاوی ۱۵۰ میلی لیتر از محیط کشت MHB انتخاب و ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون حاصل از مرحله قبل افزوده شد. همانند مرحله اول در انکوباتور شیکردار قرار گرفت. پس از ۹۶ ساعت، کل محیط-

www.SID.ir

Archive of SID

های کشت به مدت۲۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل دور ریخته شده و مایع رویی بعد از فیلتر شدن به ۷ قسمت مساوی تقسیم گردید. هر قسمت در یک ارلن مایر ریخته شده و ارلن ها شماره گذاری شدند. سپس به نسبت ۱:۱ حلال های آلی (دی اتیل اتر، دی کلرومتان، هگزان، اتیل استات، کلروفرم، متانول و آب) به ارلن مایرها افزوده شدند. ارلن‌مایرها به مدت ۱ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۷۵ دور در دقیقه قرار گرفتند. سپس محتویات ارلن‌ها به دکانتور انتقال داده شده و فاز مایع از فاز حلال جدا گردید. فازهای مایع که حاوی ترکیبات مورد نظراست، توسط دستگاه اواپوراتور در دمای ۳۴ درجه سانتی گراد و در فشار پایین تغلیظ شده و به حجم ۷ میلی لیتر رسانیده شد. سپس متابولیت ها در ظرف در بسته در دمای ۴ درجه در یخچال نگهداری شدند.

برای تعیین خواص ضد میکروبی متابولیت و ترکیبات اصلی آنها از روش انتشار روی دیسک (Disk Diffusion Method) استفاده شد. میکروارگانیسم‌های مورد استفاده عبارت بودند از: اشرشیا کولی (ATCC1399)، باسیلوس سرئوس (ATCC 1431)، یرسینیا انتروکولیتیکا (ATCC 35669) و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 29213). متابولیت های آماده شده از مرحله قبل روی دیسک‌های کاغذی استریل (با قطر ۶ میلی متر) به مقدار ۵۰۰ میکرولیتر (به دلیل رقت متابولیت موثر) ریخته شد و به مدت ۲ روز در انکوباتور ۳۵ درجه نگهداری شد، تا حلال های باقی مانده کاملاً تبخیر شوند. دیسک‌ها روی محیط کشت آگار آلوده به باکتری های مورد آزمایش (معادل $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$CFU/ml) قرار داده شدند. قطر هاله عدم رشد بعد از ۲۴ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه تعیین شد. همچنین اثر ضد میکروبی این متابولیت ها در مقایسه با آنتی بیوتیک های جنتامایسین و آموکسی کلاو به عنوان شاهد مورد بررسی قرار گرفت. برای اثبات خواص ضدمیکروبی متابولیت ها، حلال ها به تنهایی به عنوان شاهد بررسی گردیدند (۸).

برای آنالیز متابولیت های حاصل از کشت باکتری از روش(Gas Chromatography Mass Spectrometry)GC-MS با استفاده از دستگاهی با مشخصات زیر استفاده گردید: از نوع HP مدل Agilent 19091S-433ساخت کشور کانادا با ستونی به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه ۰/۲۵میکرومتر از نوع HP-5MS. دمای آون از ۶۰ تا ۳۰۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۴/۵ درجه سانتی گراد بر دقیقه افزایش یافت. گاز حامل هلیوم با سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه و انرژی یونیزاسیون ۷۰ev استفاده شد.

در این پژوهش حیوانات به ۵ گروه پنج تایی تقسیم گردیدند: ۱-گروه کنترل کاذب یا گروه شاهد؛ فقط زخم در آنها ایجاد شد (بدون تلقیح عامل عفونت و تیمار آن). ۲-گروه کنترل منفی؛ ضمن ایجاد زخم، زخم نیز عفونی شد. ۳-گروه تیمار یک؛ عفونی شده و تیمار شده با دوز بالای درمان. ۴-گروه تیمار دو؛ عفونی شده و تیمار شده با دوز متوسط درمان. ۵-گروه تیمار سه؛ عفونی و تیمار شده با دوز پایین درمان. در این تحقیق از ۲۵ سر موش های سفید آزمایشگاهی (رت) از نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰gr استفاده گردید. همه موش‌ها در قفس‌های انفرادی به مدت ۱۴روز در حیوان خانه دانشکده علوم پزشکی دانشگاه آزاد تبریز تحت شرایط استاندارد، با سیکل روشنایی و خاموشی طبیعی و دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند. برای ایجاد زخم در موش ها تحت تزریق مخلوطی از کتامین و زایلازین با نسبت ۳:۱ تحت بیهوشی قرار گرفتند. بعد از بیهوشی کامل موش، موهای ناحیه dorsal (پشت گردن، بین دو کتف) موش با تیغ تراشیده شده و ناحیه مذکور توسط الکل ۷۰٪ بتادین و گاز استریل ضد عفونی شد. در مرحله بعد با قرار دادن مارکر فلزی لبه تیز در قسمت تراشیده شده پوست، دایره ای به قطر تقریبی ۸mm علامت گذاری شد. سپس پوست پشت گردن حیوان را با استفاده ار پنس دندانه دار بالا آورده و بوسیله قیچی جراحی، پوست ناحیه علامت گذاری شده به طور کامل (Full-Thickness) در شرایط غیر عفونی برداشته شد. بلافاصله زخم عفونی شد. جهت عفونی کردن زخم از باکتری *Staphylococcus aureus* (ATTC 25952) با رقت $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ CFU/ml و حجم۰/۵cc در محل زخم تزریق شد. گروه شاهد هیچ گونه عفونت و تیمار دارویی دریافت نکردند. گروه کنترل منفی، فقط در روز صفر (روز جراحی) رقت مذکور از باکتری بیماری زا را دریافت نمودند. درگروه‌های تیمار بعد از القای عفونت به بستر زخم روزانه (از روز صفر تا چهارده) دوزهای بالا (۱۰۰٪) و دوزهای متوسط (۵۰٪) و دوزهای پایین (۲۵٪) از متابولیت دارویی به صورت پماد بر روی زخم عفونی استعمال شد.

در روزهای ۰،۳،۷،۱۰،۱۴ یک موش به طور تصادفی از همه گروه ها انتخاب کرده و با دوز بالایی از اتر کشته شد. سپس کل زخم با نواحی پوست مجاور (حدود ۲ میلیمتر) با تیغ اسکالپل برداشته شد. سپس زخم ها با محلول سرم فیزیولوژی شسته شده و در فرمالین۱۰٪ در شیشه های پنی سیلین نگهداری شد. بعد از تثبیت کامل، از نمونه‌ها مقاطع بافتی تهیه شده و با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. بعد از بررسی پاتولوژی، پارامترهای ارزیابی روند ترمیم، تشکیل عروق خونی، ادم، نکروز، التهاب و تشکیل اپیتلیوم جدید مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها

بعد از جداسازی و شناسایی باکتری های حاصل از مناطق شمال غرب کشور، باکتری *Streptomyces levis* با کد ایزوله ۱۱۱ و باکتری *Streptomyces calvus* با کد ایزوله ۶۷۳ برای آزمایشات بیشتر انتخاب شدند. در ادامه با توجه به نتایج حاصل از اثرات

www.SID.ir

Archive of SID

متابولیت های این دو باکتری بر روی سوش های میکروبی، باکتری *S. levis* انتخاب شد (جدول شماره ۱).

بررسی اثر ضد میکروبی باکتری *S.levis* نشان داد که متابولیت اتری این باکتری بر روی باکتری *B.cereus* بیشترین اثر و بر روی باکتری *Y.enterocolitica* کم‌ترین اثر باز دارندگی رشد به ترتیب با قطر هاله ۱۶ و۱۲ میلی‌متر را ایجاد کرده است. متابولیت اتیل استاتی این باکتری تنها بر روی باکتری *E.coli* با قطر هاله بازدارندگی رشد ۱۵ میلی متر اثر داشته است. متابولیت حاصل از سایر حلال ها هیچ‌گونه اثری بر باکتری ها نداشتند. در بررسی ترکیبات متابولیت اتری باکتری، ۱۵ ترکیب که شامل ۲۳/۶۹۲ در صد کل متابولیت بود، تشخیص داده شد. در متابولیت اتری باکتری *S.levis* ۱۳-Docosenoic acid,methyl ester (۱۱/۵۷۸ درصد) 9-12-octadecadienoic acid,methyl ester (۲/۹۶۱ درصد) Tricosanoic acid,methyl ester (۲/۰۸۸ درصد) ۱۵- Tetracosanoic cid,methyl ester (۸/۳۸۹ درصد) و Bis (2-ethylhexyl) phthalate (۲/۱۵۳ درصد) فراوان ترین اجزاء متابولیت بودند. جدول شماره دو ترکیب های تشکیل دهنده متابولیت، زمان بازداری و درصد کمی را نشان می دهد.

نتایج کلی مربوط به تغییرات بافت سطح زخم در طی روزهای ۰،۳،۷،۱۰،۱۴ پس از ایجاد زخم در جدول شماره۳ و شکل شماره ۱ ارائه شده است. همان گونه که انتظار می رفت با گذشت زمان، ترمیم سطح زخم در گروه شاهد از روند کاهشی برخودار بود. مطابق اطلاعاتی که در جدول شماره ۳ ارائه شده است، روند بهبود زخم در گروه کنترل منفی، به دلیل عفونی بودن زخم با کندی همراه است. این در حالی است که در گروه های تیمار شده به خصوص تیمار با دوز پایین، روند بهبود زخم با سرعت انجام گرفت.

جدول ۱: نتایج ضد میکروبی متابولیت های باکتری *S.levis* و *S.calvus* بر علیه تعدادی از باکترهای استاندارد

کد ایزوله	نام میکروارگانیسم	دی اتیل اتر	دی کلرو متان	هگزان	اتیل استات	کلروفرم	متانول	آب
۱۱۱#	*E.coli*	*۱۴	–	–	۱۵	–	–	–
۱۱۱	*B.cereus*	۱۶	–	–	–	–	–	–
۱۱۱	*Y.enterocolitia*	۱۲	–	–	–	–	–	–
۱۱۱	*S.aureus*	۱۴	–	–	–	–	–	–
۶۷۳##	*E.coli*	–	–	–	۱۲	۱۱	–	–
۶۷۳	*B.cereus*	–	–	–	۱۴	۱۳	–	–
۶۷۳	*Y.enterocolitia*	–	–	–	–	–	–	–
۶۷۳	*S.aureus*	–	۱۴	۱۲	۱۱	۱۱	–	–

* اعداد ارائه شده برحسب میلیمتر بوده ونشانگر هاله عدم رشد است.
#، Streptomyces levis
##، Streptomyces calvus

جدول ۲: ترکیب های تشکیل دهنده متابولیت *S.levis* حاصل از آنالیز کروماتوگرافی گازی

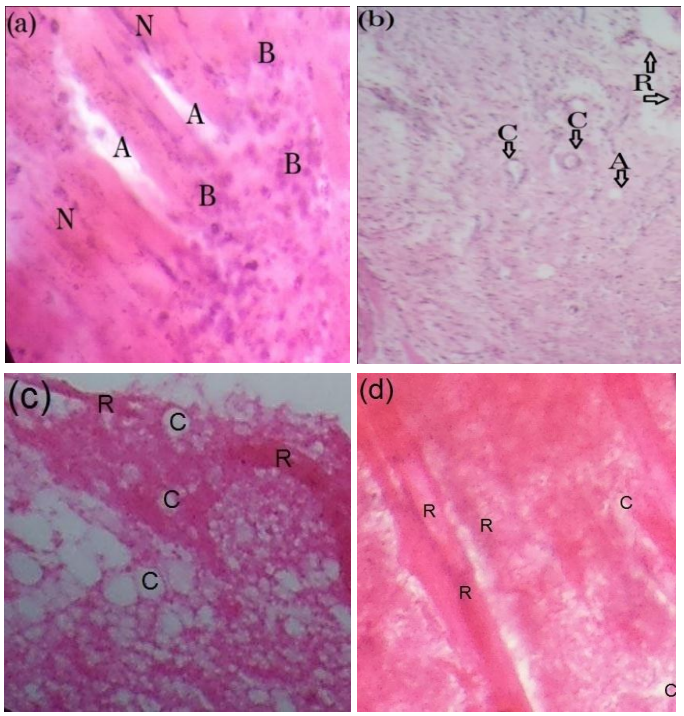
ردیف	نام ترکیب	زمان بازداری	درصد
۱	Eicosane	۶۴/۸	۱۴۸/۰
۲	Docosenoic acid, methyl ester	۵۴/۱۰	۵۷۸/۱۱
۳	(2-Methoxy-4-methylphenyl)-8-methoxy	۷۳/۱۰	۰/ ۱۱
۴	Ethyl2-trimethylsilydibenzothiophene-3-carboxyl	۰۸۳/۱۱	۳۲۰/۰
۵	Cyproterone-acetate	۱۳۱/۱۱	۰۹۶/۰
۶	12-octadecadienoic acid ,methyl ester	۲۷۵/۱۱	۹۶۱/۲
۷	Tricosanoic acid, methyl ester	۶۰۹/۱۱	۰۸۸/۲
۸	Tetracosenoic acid, methyl ester	۱۱۱/۱۲	۳۸۹/۸
۹	Pyrano[3′,4′:6,7]indolizino[1-2-b]quinoline-3	۱۹۵/۱۲	۰/۵۷۱
۱۰	Bis(2-ethylhexyl)phthalate	۷۵۶/۱۲	۱۵۳/۲
۱۱	2-Benzenedicarboxylic acid ,diisooctyl ester	۸۶۴/۱۲	۳۸۴/۰
۱۲	Trivinil-S-TRIAZINE-2,4-6(1H,3H,5H)-TRIONE	۹۳/۱۲	۷۹۱/۰
۱۳	Zingiberenol	۴۸/۱۳	۰۱۷/۱
۱۴	PERFLUORO-2-METHYLPENTENE	۸۳۶/۱۴	۵۲/۰
۱۵	D.alpha-Tocopherol	۴۵۷/۱۵	۰/۹۵۹

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳: بررسی هیستوپاتولوژی ابعاد مختلف پروسه ترمیم زخم در همه گروه ها

روز های جراحی	گروه های درمانی	تشکیل اپیتلیوم جدید	تشکیل عروق خونی	ادم	نکروز	التهاب
روزصفر	زخم	−	−	++	+++	++
روز۳	گروه کنترل منفی	−	−	++	+++	++
	گروه شاهد	−	−	+++	+	+++
	دوز پایین	−	−	++	+	+++
	دوز متوسط	−	−	++	+	+++
	دوز بالا	−	−	+	+	+++
روز۷	گروه کنترل منفی	−	−	++	++	++
	گروه شاهد	+	+	+/−	+/−	−
	دوز پایین	+	++	+	+/−	+
	دوز متوسط	+	+	+	+/−	+
	دوز بالا	+	+	+	+	++
روز۱۰	گروه کنترل منفی	−/+	+	+	+	+
	گروه شاهد	+−	+−	−	−	−
	دوز پایین	+++	+++	−	−	+/−
	دوز متوسط	+++	+++	−	−	+/−
	دوز بالا	+	+	+	+	+/−
روز۱۴	گروه کنترل منفی	++	+	+/−	−/+	+/−
	گروه شاهد	++−	+−	−	−	−
	دوز پایین	+++	++	−	−	−
	دوز متوسط	+++	++	−	−	−
	دوز بالا	++	++	−	−	−



شکل ۱: اشکال پاتولوژی در روزهای ۱۰،۱۴،۳،۷

شکل ۱: (a): ناحیه زخم درگروه تیمار شده بامتابولیت دارویی ۵۰٪ باکتری *S.levis* (b): ناحیه زخم روز۳، وجود التهاب چشمگیر است. (c): ناحیه زخم روز۷، کاهش التهاب، ایجاد مویرگ جدید و فیبروبلاست. ناحیه زخم روز۱۰، افزایش عروق خونی، تشکیل اپیتلیوم جدید. (d): ناحیه زخم روز۱۴، تشکیل اپیتلیوم، کلاژن. (ادم با حرف A، التهاب با حرف B، عرق خونی با حرف C، اپیتلیوم جدید با حرف R نشان داده شده است.)

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

مقاومت میکروب‌ها به آنتی‌بیوتیک ها روز به روز در حال افزایش است. اکتینومیست‌ها به عنوان تولیدکنندگان آنتی‌بیوتیک مورد توجه خاص قرار گرفته اند و روش‌های مختلفی نیز از جمله مهندسی متابولیت و غربال گری سوش‌های مستعد برای جداسازی متابولیت‌های ثانویه میکروارگانیسم‌ها در حال انجام می‌باشد. کارایی آنها در موارد متعدد به اثبات رسیده است. Ouhdouch و همکاران تاثیر متابولیت‌های ثانویه اکتینومیست‌های جدید جدا شده از خاک مراکش را بر برخی میکروارگانیسم‌های بیماری زا اثبات کردند (۱۳). از سویی دیگر با توجه به جدید بودن متابولیت‌ها، و با در نظر گرفتن نتایج مطالعات مشابه، به احتمال زیاد این آنتی‌بیوتیک‌ها، بر سوش‌های مقاوم موثر خواهند بود. لذا با توجه به مطالعات انجام شده می‌توان امیدوار بود که در آینده‌ی نزدیک سوش‌های بومی تولید کننده متابولیت‌های آنتی‌بیوتیکی علیه میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها شناسایی گردند. گزارش‌های زیادی در خصوص متابولیت سوش های مختلف باکتری استرپتومایسس وجود دارد. در زیر به نمونه هایی از آنها اشاره می شود. در تحقیقی که توسط Elleuch و همکاران صورت گرفت، در حلال اتیل استاتی از *Streptomyce* sp TN262 ۸ ترکیب ضدمیکروبی شناسایی شد که می‌توان به، tryptophol، cineromycin B، ۱-acetyl-β-carboline اشاره کرد (۹). در مطالعه دیگری که روی متابولیت گونه *Streptomyces avidinii* strain SU4 توسط Sudha و همکاران صورت گرفت، bis(2-methylpropyl)ester،2-benzenedicarboxylic acid۱ (۱۲/۱۷در صد)، isooctyl phthalate (۱۵/۲۹درصد) و چند ترکیب دیگر به عنوان ترکیبات با خواص ضد سرطانی شناسایی شدند (۱۰). در مطالعه Kavitha و همکاران که در سال۲۰۱۰ بر روی متابولیت گونه *Streptomyces* sp. TK-VL-333 انجام شد، 1H-indole-3-carboxylic acid و acetic acid-2-hydroxy-6-(3-oxo-butyl)-phenyl ester، به عنوان ترکیبات با خواص ضدمیکروبی شناسایی شدند (۱۱). در گزارش دیگری توسط Kavitha و همکاران که روی *Nocardia levis* MK-VL_113 انجام گرفت، ترکیبات Bis(2-ethylhexyl) phthalate و Bis(5-ethylheptyl) phthalate به عنوان مواد عمده تشکیل دهنده متابولیت، با خواص ضد باکتریایی روی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی و نیز خواص ضد قارچی و ضد مخمر گزارش شد (۱۲). در مطالعه حاضر، خواص ضد میکربی متابولیت حاصل از گونه *S.levis* مورد بررسی قرار گرفت. شایان ذکر است تاکنون گزارشی درباره این باکتری انتشار نیافته است. طبق تعریف زخم عمیق (Full-thickness)، زخمی است که شامل لایه‌های درم واپیدرم پوست می شود، که ممکن است عمق آن به لایه ماهیچه ای فیبری و حتی به استخوان نیز برسد (۱۷). متابولیت های ثانویه استرپتومایسس‌ها نیز به عنوان منبعی برای اهداف پزشکی که ممکن است موجب تسریع در روند ترمیم زخم شود، شناخته شده اند (۱۸). در طی یک تحقیق Abe و همکاران از باکتری *Streptomyces nobili* ماده SEK-1005 که یک پپتید حلقوی است را استخراج نمودند. این ماده نوعی عامل ضدالتهاب جدید بوده و امکان دارد موجب تسریع ترمیم زخم گردد. در مطالعه حاضر، اثرات معمول متابولیت *S.levis* با مطالعه Abe و همکاران شباهت داشت (۱۹). پماد حاصل از غلظت ۲۵٪ و ۵۰٪ از متابولیت باکتری استرپتومایسس موجب تسریع در روند ترمیم زخم شد (جدول ۳). ترمیم زخم فرآیند پیچیده‌ای است. مرحله اول ترمیم زخم همراه با مهاجرت سلول های دفاعی از رگ خونی به محل زخم می‌باشد. به دنبال این مرحله بافت پیوندی تشکیل شده و مرحله بعدی ترمیم با تشکیل اسکار مشخص می‌شود. طبق نتایج هیستوپاتولوژی در این تحقیق، بافت پوششی، بافت گرانولاسیون جدید که شامل سلول‌های اندوتلیال، ماکروفاژها، فیبروبلاست ها و اجزاء ماتریکس خارج سلولی است، در پمادهای ۲۵٪ و۵۰٪ متابولیت باکتری به طور چشمگیری افزایش یافته است. که امکان دارد به سبب بهبود رگ‌زایی و تشکیل اپی تلیوم جدید و از طرف دیگر کاهش التهاب و فعالیت ضد میکروبی متابولیت باشد (شکل۱). جالب توجه اینکه با کاهش دوز دارویی روند بهبود زخم عفونی سرعت می‌یابد. این احتمالاً به خاطر وجود فاکتورهای مضر دیگری در متابولیت باکتری می باشد که با افزایش دوز متابولیت در روند ترمیم زخم، اختلال ایجاد می‌کند. مطالعات نشان می‌دهد در متابولیت گونه مذکور، ۲ ترکیب موثر Bis(2-ethylhexyl) phthalate و 1,2-Benzenedicarboxylic acid diisooctyl ester, وجود دارد. طبق گزارشات Bis(2-ethylhexyl) phthalate دارای خواص گسترده ضدمیکروبی روی ارگانیسم های گرم مثبت، گرم منفی و خواص ضد مخمری و ضدقارچی می باشد. 1,2-Benzenedicarboxylic acid diisooctyl ester با توجه به مطالعات مشابه انجام گرفته توسط سایر محققین احتمالاً دارای اثرات ضدتوموری است (۱۰،۱۲).

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان می دهد که Docosanoic acid methyl ester و 5-Tetracosenois acid methyl ester ترکیبات عمده متابولیت باکتری را تشکیل می دهند. اثرات ضد میکروبی و ضد توموری می تواند به دلیل وجود ترکیبات-1,2 Benzenedicarboxylic acid diisooctyl ester و-Bis(2 ethylhexyl) phthalate در متابولیت باشد. نتایج حاصل از بررسی هیستوپاتولوژی نیز نشان داد متابولیت حاصل از باکتری، بر زخم ناشی از استافیلوکوک، اثر ترمیمی قابل توجهی دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

قدردانی

در نهایت از همکارانی که در انجام آزمایشات ما را یاری نمودند به خصوص آقای مهندس کوثری در پژوهشکده جابربن حیان دانشگاه تبریز و آقای دکتر صدیق در مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشکده پزشکی تبریز کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. Bibb MJ. Regulation of secondary metabolism in *streptomycetes*. *Curr Opin Pharmacol* 2005; **8**(2): 208-215. doi: 10.1016/j.mib.2005.02.016
2. Olano C, Lombo F, Mendez C, Salas JA. Improving production of bioactive secondary metabolites in Actinomycetes by metabolic engineering. *Metab Eng* 2008; **10**(5): 281-292. doi: 10.1016/j.ymben.2008.07.001
3. Oskay M, Tamer AU, Azeri C. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from of farming soils of Turkey. *Afr J Biotechnol* 2004; **3**(9): 441-446. doi: 10.5897/AJB2004.000-2087
4. Claessen D, De Jong W, Dijkhuizen L, Wosten HA. Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky. *Trends Microbiol* 2006; **14**: 313-319. doi: 10.1016/j.tim.2006.05.008
5. Atta HM, El Sayed AS, El Desoukey MA, Hassan M, El Gazar M. Biochemical studies on the Natamycin antibiotic produced by *Streptomyces lydicus*: Fermentation, extraction and biological activities. *J Chem Soc* 2012; Article in press.
6. Ben Ameur Mehdi R, shaaban KA, Rebai IK, Smaoui S, Bejar S, Mellouli L. Five naturally bioactive molecules including two rhamnopyranoside derivatives isolated from the *Streptomyces* sp. strain TN58. *Nat Prod Res* 2009; **23**(12): 1095-1107.
7. Smaoui S, Mathieu F, Elleuch L, Coppel Y, Merlina G, Karray-Rebai I, et al. Taxonomy, purification and chemical characterization of four bioactive compounds from new *Streptomyces* sp. TN256 strain. *World J Microbiol Biotechnol* 2012; **28**(3): 793-804. doi: 10.1007/s11274-011-0872-6
8. Ilic SB, Konstantinovic SS, Todorovic ZB, Lazic ML, Veljkovic VB, Jokovic N, et al. Characterization and Antimicrobial Activity of the Bioactive Metabolites in *Streptomycete* Isolates, *Mikrobiologiia* 2007; **76**(4): 480-487. doi: 10.1134/S0026261707040066
9. Elleuch L, Shaaban M, Smaoui S, Mellouli L, Karray-Rebai I, Fourati-Ben Fguira L, et al. Bioactive Secondary Metabolites from a New Terrestrial *Streptomyces* sp. TN262. *Appl Biochem Biotechnol* 2010; **162**(2): 579-593 doi: 10.1007/s12010-009-8808-4
10. Sudha S, Masilamani SM. Characterization of cytotoxic compound from marine sediment derived actinomycete *Streptomyces avidinii* strain SU4. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; **2**(10): 770-773. doi: 10.1016/S2221-1691(12)60227-5
11. Kavitha A, Prabhakar P, Vijayalakshmi M, Venkateswarlu Y. Purification and biological evaluation of the metabolites produced By *Streptomyces* sp. TK-VL-333. *Res Microbiol* 2010; **161**(5): 335-345. doi: 10.1016/j.resmic.2010.03.011
12. Kavitha A, Prabhakar P, Vijayalakshmi M, Venkateswarlu Y. Production of bioactive metabolites by *Nocardia levis* MK-VL-113. *Lett Appl Microbiol* 2009; **49**(4): 484-490. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02697.x
13. Ouhdouch Y, Barakate M, Finance C. Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. *Eur J Soil Biol* 2001; **37**(2): 69-74. doi: 10.1016/S1164-5563(01)01069-X
14. Stroncek JD, Bell N, Reichert WM. Instructional PowerPoint presentations for cutaneous wound healing and tissue response to sutures. *J Biomed Mater Res A* 2009; **90**(4): 1230-1238. doi: 10.1002/jbm.a.32158
15. Townsend CM, Daniel Beauchamp R, Mark Evers B, Mattox KL. *Sabiston textbook of surgery*. 16th ed. USA, 2007; PP: 85-91, 131-144.
16. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol* 2007; **127**(5): 988-1008. doi: 10.1038/sj.jid.5700786
17. Stipcevic T, Piljac A, Piljac G. Enhanced healing of full-thickness burn wounds using di-rhamnolipid. *Burns* 2006; **32**(1): 24-34. doi: 10.1016/j.burns.2005.07.004
18. Csupor D, Blazso G, Balogh A, Hohmann J. The traditional Hungarian medicinal plant Centaurea sadleriana Janka accelerates wound healing in rats. *J Ethnopharmacol* 2010; **127**(1): 193-195. doi: 10.1016/j.jep.2009.09.049
19. Abe Y, Inagaki K, Fujiwara A. Wound healing acceleration of a novel transforming growth factor-β inducer SEK-1005, *Eur J Pharmacol* 2000; **408**: 213-18. doi: 10.1016/S0014-2999(00)00766-4

www.SID.ir