Archive of SID

غربالگری فعالیت ضد میکربی ارگانیسم های خاک چند ناحیه از شهرستان مشهد با روش Cross streak

*دکتر جواد بهروان، دکتر محمد رمضانی، دکتر اصغر حیدری

*گروه فارماکوگنوزی و بیوتکنولوژی دانشکده داروسازی و

بخش بیو تکنولوژی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

خلاصه

با توجه به تنوع زیستی قابل توجه خاك، امروزه در آزمایشگاه های تحقیقاتی بیوتکنولوژی وابسته به مراکز بزرگ دارویی جستجوی وسیعی در جهت یافتن داروهای مختلف و از جمله آنتی بیوتیکهای جدید با غربالگری باکتری های خاك انجام می گیرد. گرچه در نهایت تعداد محدودی از این ترکیبات جدید به مصرف بالینی می رسند، اما با توجه به ارزش و اهمیت این گروه از ترکیبات این امر هنوز ارزشمند بوده و در بر گیرنده منافع سرشاری برای گردانندگان صنایع بزرگ دارویی و صاحبان آزمایشگاههای مذکور می باشد. در این مطالعه مراحل مختلف یك روش غربالگری و جستجو برای یافتن عوامل ضد میکربی جدید انجام شد. ابتدا ازیازده ناحیه مختلف شهرستان مشهد نمونه های خاك با وسایل استریل برداشته شد و پس از مراحل جداسازی ارگانیسم های خاك با استفاده از روش cross streak یك صد ویازده تولید کننده عوامل ضد میکربی به دست آمد. روش توسعه یافته فوق می تواند جهت مطالعات غربالگری اولیه مورد استفاده قرار گرفته و به راحتی ارگانیسم های مولد آنتی بیوتیك را آشکار سازی کند. جداسازی و خالص سازی عوامل مذکور و همچنین بررسی سایر اثرات از جمله اثرات سیتوتوکسیك آنها به عنوان عوامل ضد توموری احتمالی در حال انجام است.

کلمات کلیدی :ضد میکربی، غربالگری، Cross streak test

مقدمه

تاریخچه استفاده از آنتی بیوتیکها به ۲۵۰۰ سال پیش بر می گردد یعنی زمانی که برخی اقوام چینی از دانه های سویای آلوده به قارچ و یا نان کپك زده جهت التیام زخمها استفاده می کردند. در سال ۱۹۲۸ میلادی الکساندر فلمینگ به خاصیت ضد باکتریایی ناشی از رشد قارچ پنی سیلیوم در پلیت های حاوی باکتری مورد آزمایش پی برد. اما به کاربرد این اکتشاف و اهمیت آن بلافاصله پی برده نشد و این اکتشاف تا سال ۱۹۴۰ فقط جنبه آکادمیك داشت. در سال ۱۹۴۰ پس از درك خاصیت درمانی پنی سیلین ها تحرکات زیادی در جهت کشف آنتی بیوتیك ها شروع شد (۲).

کشف و کاربرد آنتی بیوتیك های طبیعی در اواخر دهه ۱۹۴۰ و ۱۹۵۰ تاثیرشگرفی در کنترل بیماریهای عفونی و رشد صنعت مدرن داروسازی ایجاد نمود (۷). به عنوان مثال در سالهای بین ۱۹۸۹ تا ۱۹۹۵ بیش از ۶۰ در صد از داروهای ضد سرطان و ضد میکربی تایید شده یا فراورده هایی که برای آنها درخواست بررسی و تایید (pre-NDA) شده بود، از منشاء طبیعی به دست آمده بودند (۴).

امروزه به دلیل ایجاد مقاومت میکربی نسبت به آنتی بیوتیك های مورد استفاده و همچنین با توجه به خاصیت ضد سرطانی، ضد ویروسی و سایر کاربرد های محتمل آنتی بیوتیکهای جدید در انهدام آفات نباتی، حشرات و کرمها، دانشمندان در مراکز تحقیقاتی دانشگاهی و صنعتی به طور مداوم و گسترده ای جهت دستیابی به میکروارگانیسم های تولید کننده آنتی بیوتیك های جدید نمونه های خاك جمع آوری شده از سراسر جهان را مورد آزمایش قرار می دهند. بسیاری از برنامه های غربالگری برای شناسایی ارگانیسم های مولد

www.SID.ir

Archive of SID

آنتی بیوتیک منجر به جداسازی میکربهایی می شود که آنتی بیوتیکهای شناخته شده ای تولید می کنند. از طرف دیگر، علیرغم تنوع زیستی بالای میکروارگانیسمها و توانایی بالقوه آنها در تولید متابولیت های ثانویه، بر طبق برخی تخمین ها، تنها ازگونه های باکتری ۱۰ درصد و از گونه های قارچ ۴ درصد آنها شناسایی شده اند که این اهمیت برنامه های غربالگری سریع در جهت شناسایی متابولیت های ثانویه با منشاء میکربی را به خوبی روشن می کند (۳).

به منظور شنا سایی و جداسازی اولیه ارگانیسم های مولد مواد ضد میکربی، روشهای غربالگری سریع از قبیل روش cross streak و droplet overlay bioassay method ابداع شده است (۵). در این مطالعه روش cross streak با توجه به استاندارد بودن و سریعتر بودن روش مورد استفاده قرار گرفت.

هنگامی که میکروارگانیسم تولید کننده یک آنتی بیوتیک جدید شناسایی می شود، آنتی بیوتیک مربوطه در مقادیر زیاد تولید و خالص شده و به منظور بررسی سمیت و فعالیت درمانی در حیوانات عفونی شده تست می شود. اکثر آنتی بیوتیک های جدید از این تست های حیوانی رد می شوند، ولی در عین حال تعداد اندکی از آنها از این تست با موفقیت عبور می کنند. در نهایت مفید بودن تعداد کمی ازآنتی بیوتیک ها، از نظر طبی اثبات می شود و کاربرد بالینی پیدا می کنند(۶).

مواد و روش کار

محیط های کشت: Nutrient Broth (Oxoid)، Soybean Casein Digesd Broth (Merck) و Nutrient Agar (Oxoid) طبق دستور العمل کارخانه سازنده تهیه شده و پس از اتوکلاو کردن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و در فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع مورد استفاده قرار گرفتند.

مواد شیمیایی: آب مقطر استریل جهت رقیق سازی، گلیسیرین (Merck)، توین ۸۰، اتانل ۷۰ درصد جهت ضد عفونی کردن وسایل و محلول سدیم هیپوکلریت ۱٪ (وایتکس رقیق شده) جهت ضد عفونی سطوح، نرمال سالین استریل جهت رقیق سازی نمونه های خاك مورد استفاده قرار گرفتند. آنتی بیوتیك های استاندارد شامل پودر اکسی تتراسیکلین و کلر آمفنیکل از آزمایشگاه کنترل میکربی دانشکده داروسازی تهیه شدند.

میکروارگانیسمهای تولید کننده آنتی بیوتیك از خاك اطراف ریشه گیاهان مناطق مختلف در مشهد (جدول۱) جداسازی گردیدند.

نمونه های فوق در تست cross streak علیه سویه های باکتری و قارچ استاندارد بشرح مندرج در جدول ۲ مورد استفاده قرار گرفتند. این ارگانیسم ها از کشت های ذخیره آزمایشگاه کنترل میکربی دانشکده داروسازی مشهد، خریداری شده از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران بودند.

نمونه برداری: ریشه گیاهان در محل های نمونه برداری از خاك بیرون آورده شد. خاك اطراف ریشه در پلیت های استریل تکان داده شد و پلیت ها سریعا به آزمایشگاه منتقل شدند.

روش کار: از نمونه خاك مقدار نیم گرم در یك لوله آزمایش در پیچ دار حاوی ۹/۵ میلی لیتر سرم نرمال سالین استریل ریخته شد. سوسپانسیون حاصله به مدت ده دقیقه توسط دستگاه همزن مخلوط گردید سپس توسط یك پیپت یك میلی لیتر از سوسپانسیون برداشته شده و در لوله درپیچ دار حاوی ۹ میلی لیتر سرم نرمال سالین استریل ریخته شد. پس از مخلوط کردن کامل، رقتهای نزولی 10^{-3} تا 10^{-10} تهیه گردید. رقتهای 10^{-5} تا 10^{-10} انتخاب شده و پس از هم زدن از قسمت میانی سوسپانسیون یك میلی لیتر به هر یك از دو پلیت بزرگ استریل منتقل شد. سپس ۱۵تا۲۰ میلی لیتر از محیط کشت جامد مذاب (۵۰ °C –۴۸) اضافه شده و پس از بهم زدن سریع و بستن پلیت ها در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت دو هفته نگهداری شدند. پس از طی زمان انکوباسیون لازم از پرگنه های ایزوله که از نظر مرفولوژیك غیر تکراری بودند کشت خالص تهیه شد(۱). این کشت های

www.SID.ir

Archive of SID

خالص جهت انجام تست cross streak به شرح زیر مورد استفاده قرار گرفتند. جهت انجام تست cross streak مراحل زیر انجام شد. ابتدا میکرو ارگانیسم جدا شده از خاک به صورت کاملایکنواخت در یک نیمه پلیت ۲۰ سانتی متری کشت شد و پس از دو تا چهار ده روز انکوباسیون در ۲۵ درجه سانتی گراد (تا هنگام رسیدن به فاز ثابت رشد) میکروارگانیسم های ذکر شده در جدول ۲ به صورت عمودی با فاصله نیم سانتی متر از حاشیه منطقه رشد کشت و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. بعد از زمان مذکور منطقه عدم رشد در فاصله بین ارگانیسم جدا شده از خاک و ارگانیسم های معرف به عنوان نشانه احتمال تولید مواد باکتریواستاتیک و/یا باکتریسید درنظر گرفته شد. در صورت وجود ناحیه مهاری، از ارگانیسم تولید کننده کشت ذخیره ۲۰ درصد گلیسرول تهیه و در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

نتایج و بحث

در این پروژه جمعا بر روی ۹۵۰ سویه جدا شده از خاک تست cross streak انجام گردید (تصویر ۱).

این غربالگری وسیع که با استفاده از ۹۵۰ سویه جدا شده از خاک علیه ارگانیسم های ذکر شده در جدول ۲ انجام گرفت و منجر به شناسایی یکصد ویازده سویه با نتایج مثبت (جدول ۳) گردید.

چنانچه از نتایج به دست آمده استنباط می شود، بیشترین فعالیت ضد میکربی مربوط به اثرات ضد باسیلوس سابتیلیس و استافیلوکوک ارئوس و کاندیدا آلبیکنس بود و فقط تعداد محدودی از نمونه ها (SA64 ، SA31 و SA66) دارای اثرات قابل توجه بر روی باکتریهای گرم منفی بودند. همچنین تعداد ارگانیسم جدا شده مولد ترکیبات ضد میکربی در مناطق مختلف متفاوت بود. در این مورد، غنی ترین نمونه های مورد

جدول ۱ : محل های برداشت خاک جهت جداسازی میکروارگانیسم های تولید کننده عوامل ضد میکرب.

کد محل برداشت شده	محل برداشت نمونه	تعداد نمونه جدا شده دارای اثر ضد میکربی
A, R, L, I	نقاط مختلف در محوطه پردیس دانشگاه علوم پزشکی مشهد	۲۱
N	منطقه ای در شمال شرقی شهرک نجفی شهرستان مشهد	۸
P	منطقه ای درحاشیه بلوار وکیل آباد شهرستان مشهد	۵
K,T	محوطه حیاط خوابگاه بوستان انقلاب دانشگاه علوم پزشکی مشهد	۸
W,F	پارک ملت ومیدان آزادی شهرستان مشهد	۳۳
B	اطراف پژوهشکده بوعلی مشهد	۳۶

جدول ۲: میکروارگانیسم های معرف (مورد استفاده جهت cross streak) در مقابل باکتری های جدا شده از خاک.

ATCC**	PTCC*	طبقه بندی	درجه حرارت کشت	میکرب مورد استفاده
۸۷۳۹	۱۳۳۰	باسیل گرم منفی	۳۷ °C	*Escherichia coli*
۶۶۳۳	۱۰۲۳	باسیل گرم مثبت	۳۷ °C	*Bacillus subtilis*
۲۹۷۳۷	۱۳۳۷	کوکسی گرم مثبت	۳۷ °C	*Staphylococcus aureus*
۱۰۰۳۱	۱۰۵۳	باسیل گرم منفی	۳۷ °C	*Klebsiella pneumoniae*
۹۰۲۷	۱۰۷۴	باسیل گرم منفی	۳۷ °C	*Pseudomonas aeroginosa*
۱۰۲۳۱	۵۰۲۷	قارچ	۲۵°C	*Candida albicans*

* Persian type culture collection, ** American type culture collection

www.SID.ir

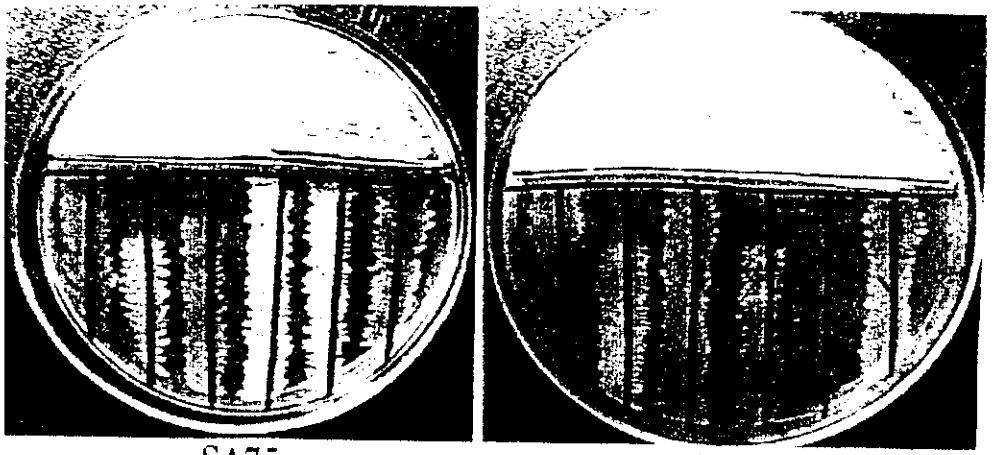
Archive of SID

جدول ۳: مشخصات ارگانیسم های جدا شده از خاک و میزان پاسخ در تست cross streak (با توجه به وسعت مطالعه و نتایج حاصله تنها نتـایج در مـورد سویه های که وسیع الطیف ، دارای اثر بر بیش از سه ارگانیسم، بوده اند ذکر شده است)

مشخصات میکروارگانیسم				میزان مهار رشد(mm) در تست Cross streak					
ردیف	نام قدیمی	نام جدید	محل برداشت	*E. coli*	*P.aeroginosa*	*K.pneumonia*	*B. subtilis*	*S. aureus*	*C. albicans*
۱	$A10^{-8}$ 4a	**SA11**	A	۱۵	–	–	۲۵	۵	–
۲	$A10^{-1}$ 1a	**SA16**	A	۴۰	۵۰	۲۵	۴۰	۲۰	–
۳	$A10^{-6}$ 1 (X)	**SA20**	A	۳۵	۴۸	۳۰	۴۲	۱۷	–
۴	$A10^{-8}$ 1a (y)	**SA21**	A	۴۱	۵۰	۲۸	۵۳	۲۵	–
۵	$I10^{-10}$ 5a	**SA26**	I	۳۰	۲۰	–	۴۵	–	–
۶	$R10^{-7}$ 1all	**SA28**	R	۱۰	–	–	۳۵	۲۰	–
۷	P10-6 3al	**SA30**	P	۴	–	۲	۲	۱۱	–
۸	N10-6 1a	**SA38**	N	–	–	–	۳	۳	۱۰
۹	F10-8 3	**SA46**	F	۹	–	–	۸	۸	–
۱۰	K10-8 1a	**SA60**	K	۷	–	–	۱۰	۹	۹
۱۱	T10-6 4al	**SA65**	T	۵	–	۳	۳	۲	–
۱۲	W10-6 4	**SA69**	W	۱۰	–	–	۴۰	–	۵۰
۱۳	W10-7 1al	**SA70**	W	۱۱	۹	۳	۲۰	۱۸	۳۰
۱۴	W10-8 3a	**SA73**	W	۱	–	–	۳	۳	۳
۱۵	W10-9 1	**SA74**	W	۵۰	–	–	۸	۲۰	–
۱۶	W10-8 2bD	**SA75**	W	۱۰	–	–	۲	۱۳	–
۱۷	W10-6 1a	**SA79**	W	۱	–	–	۷	۱۰	۵
۱۸	–	**MNT300**	B	۵	–	–	۸	–	۱۰
۱۹	–	**MNT301**	B	۸	-	–	۴	۷	–
۲۰	–	**MNT305**	B	۶	۳	۸	۶	۶	۴
۲۱	–	**MNT311**	B	۴	–	–	۶	۴	۵
۲۲	–	**MNT313**	B	–	۷	۷	–	–	۵
۲۳	–	**MNT314**	B	–	۷	–	۵	۶	–
۲۴	–	**MNT321**	B	–	۵	–	۱۰	–	۶
۲۵	–	**MNT329**	B	۸	۶	۴	۸	۴	۱۲
۲۶	–	**MNT332**	B	–	۸	–	۹	۶	–
۲۷	–	**MNT334**	B	۵	–	۴	۶	–	–

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۱: نمونه ای از تست Cross streak. همانگونه که در متن توضیح داده شده سویه جدا شده از خاک در نیمه بالایی پلیت کشت داده شده و بعد از رشد کامل، نمونه های مربوط به ارگانیسم های معرف براساس الگوهای خط کشی شده در پشت پلیت تلقیح و بعد از گرمخانه گذاری به مدت ۴۸-۲۴ ساعت نتایج خوانده شد.

آزمایش از محل دارای کد F و B به دست آمد. در مورد تولید مواد ضد قارچی نیز برخی از سویه های تحت مطالعه مانند SA70، SA69، SA82، MNT300، MNT320، MNT323 و MNT329 اثرات قابل توجهی از خود نشان دادند که نتایج مزبور نیز در جدول ۳ آمده است. از نکات قابل توجه، جداسازی ارگانیسم های تولید کننده ترکیبات وسیع الطیف مانند SA20، SA21، SA70، MNT305، MNT311، MNT313 و MNT329 بود.

شرایط انکوباسیون در این پروژه به صورت هوازی بود و کار بر روی نمونه های بی هوازی انجام نگرفت. نمونه های زیادی در این پروژه وجود داشتند که در زیر سطح آگار رشد نموده بودند و بعد از واکشت آنها در شرایط هوازی رشدی مشاهده نشد. از دیگر محدودیت های روش cross streak که بایستی مد نظر قرار گیرد، عدم شناسایی ارگانیسم های مولد آنتی بیوتیك داخل سلولی را می توان نام برد. چنانچه یك ارگانیسم یك آنتی بیوتیك داخل سلولی یا متصل به میسلیوم ها تولید کند با این روش قابل ردیابی نخواهد بود. از نکات مثبت حائز اهمیت که بایستی به آن اشاره نمود، این نکته است که بسیاری از عوامل دارای اثرات ضد میکربی دارای اثرات سیتوتوکسیك، ضد سرطان، ضد انگل و ضد کرم می باشند که برخی از این تست ها بر روی مواد جدا شده هم اکنون در حال انجام است. تلاش در جهت خالص سازی و بررسی ساختمان شیمیایی مواد مربوطه نیز از سایر جوانبی است که در دست تحقیق قرار دارد.

قدردانی و تشکر

بخشی از این مطالعه به عنوان پایان نامه دانشجویی و با مساعدت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام گرفته است. لذا محققین این پروژه بر خود فرض می دانند که نهایت سپاس و قدردانی خود را از معاونت محترم و اعضاء شورای محترم پژوهشی دانشگاه اعلام نمایند.

References

1- Alef K. and Nannipier P., Methods in applied soil microbiology and biochemistry, Academic press, London, 1995, 150-151.
2- Brook T.D. and madigan M.T., Biology of microorganisms, Prentice-Hall International Inc., London, 1991.
3- Bull T., Goodfellow M. and Howard Slatter J., 1992, Biodiversity as a source of innovation in biotechnology, Annual Review of Microbiology, 46 : 17-30.
4- Cragg G. M., Newman D. J., Snader K. M., 1997, Natural products in drug discovery and development, Journal of Natural Products, 60 (1):52-60.
5- Huck T. A., Porter N., Bushell M. E., 1991, Positive selection of antibiotic-producing soil isolates, Journal of General Microbiology, 137: 2321-2329.
6- Lancini G. and Lorenzetti R., Biotechnology of antibiotics and other bioactive microbial metabolites. Plenum press, 1993, 70-94.
7- Sanchez-Puelles J. M., Elson S. W., 1997, The impact of biodiversity and chemical diversity on drug discovery, S. G. M., 121-123.

www.SID.ir