

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

إِنَّا نَحْمَدُكَ يَا رَبُّ الْوَالِدِ الْغَلِيِّ

أَفْئِدَةُ الْوَالِدِ الْغَلِيِّ

٧٦٨٢٣



دانشگاه تهران

دانشکده علوم

۱۳۸۱ / ۹ / ۲۴

**غریبال سازی خاک به منظور جداسازی
اکتینومايست های مولد اريترومايسين**

استاد راهنما:

دکتر فریدون ملک زاده

اساتید مشاور:

جواد حامدی

دکتر نادر مقصودی

نگارش:

لیلی محمودیان

۴۲۵۹۸

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد

در

میکروبیولوژی

مهرماه ۱۳۸۱

۴۲۵۹۸

بسمه تعالی

اداره تحصیلات تکمیلی دانشگاه تهران

احتراماً به اطلاع می‌رساند که جلسه دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد خانم لیلی محمودیان

تحت عنوان: "غربال سازی خاک به منظور جداسازی اکتینو مایست های مولد اریترومایسین".

در تاریخ ۸۱/۷/۱۰ در محل دانشکده علوم دانشگاه تهران برگزار گردید.

هیات داوران بر اساس کیفیت پایان نامه، استماع دفاعیه و نحوه پاسخ به سوالات، پایان نامه ایشان را برای دریافت

درجه کارشناسی ارشد در رشته میکروبیولوژی معادل با هشت واحد با نمره ۹/۷۵ انورده و هفته دینج صدم با درجه عالی مورد تایید قرار داد.

هیات داوران

سمت	نام و نام خانوادگی	مرتبه دانشگاهی - دانشگاه امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر فریدون ملک زاده	استاد - تهران
۲- استاد مشاور	جواد حامدی	مربی - تهران
۳- استاد مدعو	دکتر نادر مقصودی	استادیار - دانشگاه امام حسین
	دکتر ظاهر نژادستاری	استادیار - تهران
۴- استاد مدعو	دکتر علی هاتف سلمانیان	استاد یار - مرکز تحقیقات مهندسی ژنتیک
۵- نماینده تحصیلات تکمیلی گروه	دکتر بهمن زینلی	استادیار - تهران

سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده

دکتر حسن ابراهیم زاده

مدیر گروه

دکتر حوری سپهری

سرپرست تحصیلات تکمیلی گروه

دکتر بهمن زینلی

تقدیم به :

روح پاک پدرم

مادر فداکارم

همسر مهربانم

برادر عزیز و

خواهران خوبم.

چکیده:

با توجه به اهمیت جستجو و جدا سازی سویه‌های مولد آنتی‌بیوتیک و نظر به اهمیت آنتی‌بیوتیک اریترومايسين ، در این تحقیق به جستجوی سویه‌های مولد این آنتی‌بیوتیک در خاک‌های مناطق مختلف ایران اعم از خاک‌های کویری ، جنگلی و کوهستانی پرداخته شد. برای دستیابی به این مقصود ، در ابتدا انتخاب محیط کشت مناسب برای جداسازی سویه‌های اکتینومايست مولد اریترومايسين انجام پذیرفت . نتایج آزمایشها نشان داد که از بین محیط‌های کشت گلیسرول کازئین آگار، گلیسرول آرژینین آگار، Czapack آگار، نشاسته آگار، گلوکز عصاره مخمر آگار، محیط کشت "گلیسرول - آرژینین آگار" برای جدا سازی اکتینومايست‌های مولد اریترومايسين ، مناسب تشخیص داده شد. و نیز به عنوان عامل انتخابی از آنتی‌بیوتیک اریترومايسين در محیط کشت استفاده شد. پس از آن اقدام به نمونه برداری از خاک‌های مناطق مختلف کشور گردید.

در این پژوهش از میان ۱۴۷ نمونه خاک مختلف ، ۱۱۰ سویه اکتینومايست جداسازی و پس از کشت دادن تک‌تک آنها در محیط تولید اریترومايسين، مایع فرمانتاسیون به روش سنجش بیولوژیک علیه باکتری حساس مورد بررسی قرار گرفت و بر این اساس ۱۱ سویه به دلیل ایجاد هاله عدم رشد در محیط سنجش میکروبیولوژیک اریترومايسين مولد آنتی‌بیوتیک شناخته شدند. سویه‌های فوق بار دیگر در محیط تولید کشت داده شد و استخراج اریترومايسين احتمالی با دقت زیاد انجام گردید. آنتی‌بیوتیک استخراج شده به روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مورد سنجش قرار گرفت و در نهایت ۳ سویه مولد اریترومايسين تشخیص داده شد. به منظور تعیین بازده تولید، سویه‌ها در محیط کشت تولید اریترومايسين کشت شده و به روش اسپکتروفتومتری ، اریترومايسين تام موجود در مایع فرمانتاسیون اندازه‌گیری گردید. بر این اساس بازده تولید

سویه‌ها حدود ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تعیین شد. قابل ذکر است بازده تولید اریترومايسين در سویه وحشی *Saccharopolyspora erythraea* ATCC 11635، ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بوده است.

شناسایی سویه‌ها به روش شیمیوتاکسونومی و میکروسکوپ الکترونی انجام گرفت و بر این اساس، سویه‌ها تا حد جنس شناسایی گردید.

با توجه به اینکه از میان ۱۱ سویه مولد اریترومايسين شناخته شده، ۵ سویه در جنس *Saccharopolyspora* قرار دارد و از آن جهت که مهمترین سویه صنعتی مولد اریترومايسين، در این جنس قرار دارد، اقدام به بررسی سویه‌های جدا شده با کمک پرایمر تشخیصی این جنس که مربوط به بخشی از توالی 16srDNA که در این جنس حفظ شده می‌باشد در واکنش PCR گردید که در نتیجه مشخص شد هیچکدام از سویه‌ها در این جنس قرار نمی‌گیرد که خود تائیدی بر آزمایش‌های شیمیوتاکسونومی و میکروسکوپ الکترونی بوده است و نتایج حاصل نشان می‌دهد که احتمالاً یکی از سویه‌های جدا شده به جنس *Nocardioidea* و دو سویه دیگر به جنس *Streptomyces* تعلق دارد. به احتمال با ایجاد جهش و نوترکیبی یا روش‌های دیگر بتوان میزان تولید اریترومايسين را در این سویه‌ها بالا برد و لازمه این کار انجام پژوهش فراتر می‌باشد که بعلاوه محدود بودن زمان از حیثه این پایان نامه خارج است.

با تشکر از :

✓ اساتید ارجمند جناب آقای دکتر ملک زاده، جناب آقای دکتر حامدی و جناب آقای دکتر مقصودی که همواره از راهنمایی های بی شائبه و دلسوزانه ایشان بر خوردار بوده ام.

✓ جناب آقای دکتر ستاری و جناب آقای دکتر سلمانیان که زحمت داوری این پایان نامه را پذیرفتند.

✓ خانواده ام

و

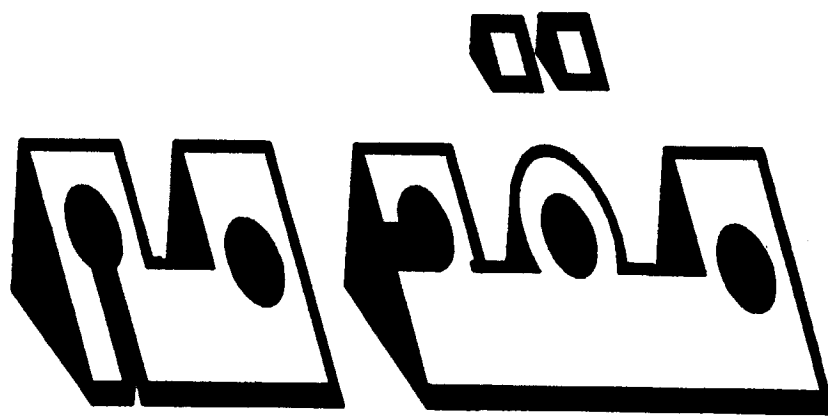
✓ تمام دوستان عزیزى که در انجام این تحقیق یار و یاورم بوده اند.

۱	مقدمه
۵	پیشینه پژوهش
۷	متابولیت‌های ثانویه
۷	آنتی‌بیوتیک‌ها
۸	اثر ضد میکروبی
۹	طبیعت شیمیایی آنتی‌بیوتیک‌ها
۱۱	خانواده‌های شناخته شده آنتی‌بیوتیک‌ها
۱۲	ماکرو لیدها
۱۳	اریترومايسين و ساختار شیمیایی آن
۱۵	مکانیسم عمل اریترومايسين
۱۵	چرخه سنتز اریترومايسين
۱۸	طیف اثر اریترومايسين و خواص دارو شناختی آن
۱۹	کاربردهای درمانی اریترومايسين
۲۰	میکروارگانيسم‌های مولد آنتی‌بیوتیک و اهمیت اکتینومايست در میان آنها
۲۱	اکتینومايست‌ها
۲۲	ویژگیهای ریخت شناسی اکتینومايست‌ها
۲۴	اکولوژی اکتینومايست‌ها
۲۶	نقش زیستی آنتی‌بیوتیک‌ها در اکولوژی اکتینومايست‌ها
۲۷	رشد و تولید مثل در اکتینومايست‌ها
۲۸	نیازهای کشت اکتینومايست‌ها
۲۸	طبقه‌بندی اکتینومايست‌ها
۳۰	سویه‌های مولد اریترومايسين
۳۳	وسایل، مواد و روش‌ها
۳۳	مواد شیمیایی مورد استفاده
۳۴	وسایل و دستگاهها
۳۴	سویه‌های مورد استفاده
۳۴	محلول‌های ذخیره
۳۴	محلول ذخیره محیط CSL agar:

۳۵ محلولهای ذخیره بافر تانک و ژل الکتروفورز (TBE)
۳۵ محلول ذخیره TBE 10X (pH= ۸/۳)
۳۵ بافر فسفات ۳ (pH= ۸)
۳۵ روش ها
۳۶ انتخاب محیط کشت مناسب برای جداسازی اکتینومایست ها
۳۶ محیط های جدا سازی اکتینوماسیت ها
۳۶ محیط گلیسرول - کازئین آگار (pH= ۷)
۳۷ محیط آرژینین گلیسرول (pH= ۷±۰/۱)
۳۷ محیط نشاسته - آگار (pH= ۷)
۳۸ محیط Czpack agar (pH= ۷)
۳۸ گلوکز - عصاره مخمر - آگار (pH= ۶/۸)
۳۸ انتخاب تیمار مناسب برای جدا سازی اکتینومایست ها
۳۹ روش کشت دادن نمونه خاک در محیط کشت : (روش رقت های متوالی)
۳۹ جدا سازی و خالص سازی سویه ها
۴۰ ترکیب محیط CSL agar
۴۰ نگهداری سویه ها
۴۰ کشت سویه های جدا شده برای بررسی توان تولید آنتی بیوتیک
۴۱ ترکیب محیط پیش کشت (pH = ۷)
۴۱ ترکیب محیط کشت فرمانتاسیون (pH = ۶/۸)
۴۲ بررسی اریترومایسین در مایع فرمانتاسیون
۴۲ سنجش بیولوژیک آنتی بیوتیک به روش سیلندر - پلیت
۴۲ تهیه اینوکولوم
۴۲ ترکیب محیط کشت آنتی بیوتیک آگار (۱) (pH = ۶/۶)
۴۳ تهیه پلیت سنجش
۴۴ استخراج اریترومایسین از مایع فرمانتاسیون (برای روش های TLC و HPLC)
۴۵ شناسایی اریترومایسین به روش کروماتوگرافی لایه نازک
۴۵ شناسایی اریترومایسین به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا
۴۶ تعیین بازده سویه های مولد اریترومایسین

۴۷	تهیه محلول‌های استاندارد اریترومايسين
۴۸	تهیه رقت های مایع فرمانتاسیون
۴۸	استخراج اریترومايسين از مایع فرمانتاسیون
۴۹	تشکیل کمپلکس رنگی اریترومايسين با برموفنل بلو
۴۹	اندازه گیری میزان جذب کمپلکس رنگی اریترومايسين - برموفنل بلو
۴۹	شناسایی سویه مولد اریترومايسين
۵۰	روش شیمیوتاکزونومی
۵۰	طرز تهیه بیوماس برای روش شیمیوتاکزونومی
۵۰	ترکیب محیط کشت Sauton broth ¹ pH = ۷
۵۱	استخراج اسیدهای آمینه دیواره سلول
۵۱	کروماتوگرافی اسیدهای آمینه دیواره
۵۲	استخراج قند های دیواره
۵۳	بررسی مورفولوژیک سویه های مولد اریترومايسين
۵۳	تهیه نمونه برای بررسی با میکروسکوپ نوری
۵۴	تهیه نمونه برای بررسی با میکروسکوپ الکترونی SEM
۵۴	تشخیص جنس <i>Saccharopolyspora</i> به روش PCR
۵۵	توالی پرایمر اختصاصی جنس <i>Saccharopolyspora</i>
۵۵	PCR با پرایمر تشخیصی جنس <i>Saccharopolyspora</i>
۵۶	الکتروفورز محصول PCR
۵۷	نتایج
۵۷	انتخاب محیط کشت و تیمار مناسب
۵۸	روش سنجش بیولوژیکی
۵۹	اریترومايسين تولید شده توسط سویه ها
۶۰	روش RP-HPLC
۶۲	روش TLC
۶۲	بازده تولید سویه
۶۲	شناسایی سویه های مولد اریترومايسين
۶۲	اسیدهای آمینه دیواره سلولی

۶۳	بررسی قندهای دیواره سلولی باکتری
۶۴	مشاهده شکل ظاهری کلنی‌ها در روی محیط آگاردار
۶۴	بررسی با میکروسکوپ نوری
۶۵	بررسی با میکروسکوپ الکترونی SEM
۶۷	تشخیص مولکولی جنس <i>Saccharopolyspora</i> با PCR
۹۰	بحث
۹۸	پیوست:
۱۰۳	References:
۱۰۸	Abstract:



وزارت فرهنگ و ارشاد اسلامی ایران
توسط سازمان اسناد و کتابخانه ملی

بیش از ۶۰ سال از معرفی توانایی اکتینومایست‌ها در تولید متابولیت‌های ثانویه همانند پیگمان‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و پروتئین‌های برون سلولی می‌گذرد. اکتینومایست‌ها مولد بیش از ۲/۳ آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی شناخته شده بوده و همواره اصلی‌ترین منبع جستجوی ترکیبات جدید آنتی‌بیوتیکی بوده‌اند. از حدود ۶۰۰۰ آنتی‌بیوتیک تولیدشده توسط آنها، ۷۵٪ از سویه‌های جنس *Streptomyces* استخراج شده است. اولین بار تولید تجاری آنتی‌بیوتیک‌های حاصل از اکتینومایست‌ها، در اواخر سال ۱۹۴۶ و اوایل سال ۱۹۴۷ توسط Dohm, Merck و Sharp انجام شد. آنان آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین را در محیط کشت به میزان زیاد تولید نموده‌اند [۱].

آنتی‌بیوتیک‌ها بیش از سایر داروها در درمان بیماری‌های عفونی، تجویز شده و نیز به میزان وسیع در صنعت، دامپروری و صنایع غذایی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. آنتی‌بیوتیک‌های ماکرولیدی ضدباکتریایی یکی از موثرترین گروه آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های باکتریایی بوده و حائز رتبه دوم از نظر مقدار مصرف در صنعت تولید آنتی‌بیوتیک می‌باشند [۲]. اریترومایسین^۱ مهمترین آنتی‌بیوتیک در میان ماکرولیدها^۲ و پرمصرف‌ترین آنتی‌بیوتیک در ایالات متحده آمریکا بوده و میزان فروش سالیانه آن در سال ۲۰۰۰، ۳۵۰۰ میلیون دلار می‌باشد [۳]. علاوه بر استفاده مستقیم از این آنتی‌بیوتیک، مشتقات شیمیایی دیگر آن مانند آزیترومایسین^۳، کلاریترومایسین^۴ و رکسیترومایسین^۱ نیز در سبدهای دارویی معتبر جهان وارد شده است. مشتقات شیمیایی جدید اریترومایسین قادر به نفوذ بهتری در مایع بین

¹ Erythromycin

² Macrolides

³ Azithromycin

⁴ Clarithromycin

سلولی و بافت بوده و با سایر داروها کمتر تداخل دارویی ایجاد می‌کنند. این ترکیبات در مقابل طیف وسیعی از عفونت‌های باکتریایی مانند عفونت‌های : *Haemophilus*, *Chlamydia*, *Legionella* و برخی از *Mycobacterium* های غشایی از *Mycobacterium tuberculosis* قابل استفاده اند و دوز مصرفی این مشتقات کمتر از دوز اریترومايسين است. [۲].

با وجود اینکه بازده تولید سویه‌های میکربی صنعتی مولد آنتی‌بیوتیک به علت پژوهش‌های مستمر انجام شده در سالهای طولانی قابل مقایسه با سویه‌های وحشی نمی‌باشد ولی این سویه‌ها به علت داشتن صفاتی مانند توانایی تحمل غلظت‌های بیشتر آنتی‌بیوتیک تولیدی، مقاومت بیشتر به باکتریوفازها، داشتن پروموتورهای قویتر در یک یا چند ژن موثر در مسیر بیوسنتزی، در روش‌های جهش‌زایی، پروتوپلاست فیوژن و نوترکیبی ژنتیکی - که به منظور افزایش تولید به کار می‌رود- سویه‌های والد محسوب می‌شوند. مثلاً در سال ۱۹۷۵، Lapchin Skain موفق به انتخاب یک سویه وحشی مقاوم فاز از یک گونه جدید مولد آنتی‌بیوتیک ریفامایسین^۲ شد و سپس به روش جهش‌زایی، سویه مقاومتری را نیز بدست آورد [۴]. در سال ۱۹۷۸، Lanskaia و همکارانش با استفاده از ماده انتخابی سدیم نوویوسین در محیط کشت باکتری وحشی *Actinomyces levoris* LI 0868 موفق به انتخاب سویه‌های مولد مقادیر زیاد آنتی‌بیوتیک لووریستاتین^۳ شدند [۵]. در سال ۱۹۸۲ Aizawa در شرکت ToyoJozo در ژاپن به منظور ایجاد سویه صنعتی *Streptoverticillium kitasatoensis* (سویه مولد آنتی‌بیوتیک لوکومايسين^۴)، از سیستم جهش‌زایی و انتخاب استفاده نمود که در نهایت موفق به انتخاب سویه‌های واجد فعالیت

^۱ Roxithromycin

^۲ Rifamycin

^۳ Levoristatin

^۴ Leucomycin

آنتی‌بیوتیکی ۲۰۰ برابر بیشتر از سویه وحشی اولیه شد. نکته جالب توجه این بود که افزایش تولید لوکومایسین در سویه فوق با افزایش مقاومت آن به مقادیر بالای لوکومایسین تولید شده همراه بود [۲]. سال ۱۹۸۳، Kulin و همکارانش با استفاده از روش پروتوپلاست فیوژن به انتخاب سویه‌های *Streptomyces griseus* مولد مقادیر بیشتر گریسین پرداختند [۶]. در سال ۱۹۸۹، Skauturd به روش پروتوپلاست فیوژن، سویه‌های مولد مقدار بیشتر سفالوسپورین را جدا نمود [۷]. در سال ۱۹۹۲ Stutzman و همکارانش با وارد کردن ژن‌های $dnrR_1$ و $dnrR_2$ متعلق به بخشی از ژنوم باکتری *Streptomyces peuceticus* - سویه مولد دانوروبیوسین^۱ - به سویه وحشی، تولید متابولیت ثانویه و مقاومت به آن را همزمان افزایش دادند [۸]. در سال ۱۹۹۸، Rowe و همکارانش به منظور افزایش بیان آنتی‌بیوتیک، یک حامل جدید را وارد سویه وحشی مولد اریترومایسین *Saccharopolyspora erythraea* نمودند. در نتیجه تولید اریترومایسین نسبت به سویه وحشی چندین برابر شده است [۹]. در سال ۱۹۹۹، Lee و همکارانش با جهش رای-۱ در سویه وحشی *Streptomyces fradiae* 2702 و بهینه نمودن شرایط محیط کشت باعث افزایش تولید آنتی‌بیوتیک تا حد ۱۴ برابر شدند [۱۰].

با توجه به مثالهای بالا، شرکت‌های معتبر دارویی همواره جداسازی سویه‌ها از منابع طبیعی را در سرفصل پژوهش‌های خود قرار داده‌اند. به گونه‌ای که در موارد متعددی سویه‌های جدید میکروبی جدا شده، خود حاصل پژوهش‌های کاربردی فوق بوده است. به عنوان مثال در سال ۱۹۷۵ Lacey و Goodfellow در راستای همین تحقیقات اولین بار موفق به یافتن گونه *Saccharopolyspora hirsuta* شدند [۱۲] و شرکت الی لیلی در سال ۱۹۹۰ در راستای تحقیقات فوق موفق به یافتن گونه جدیدی از جنس *Saccharopolyspora* به نام

¹ Daunorubicin