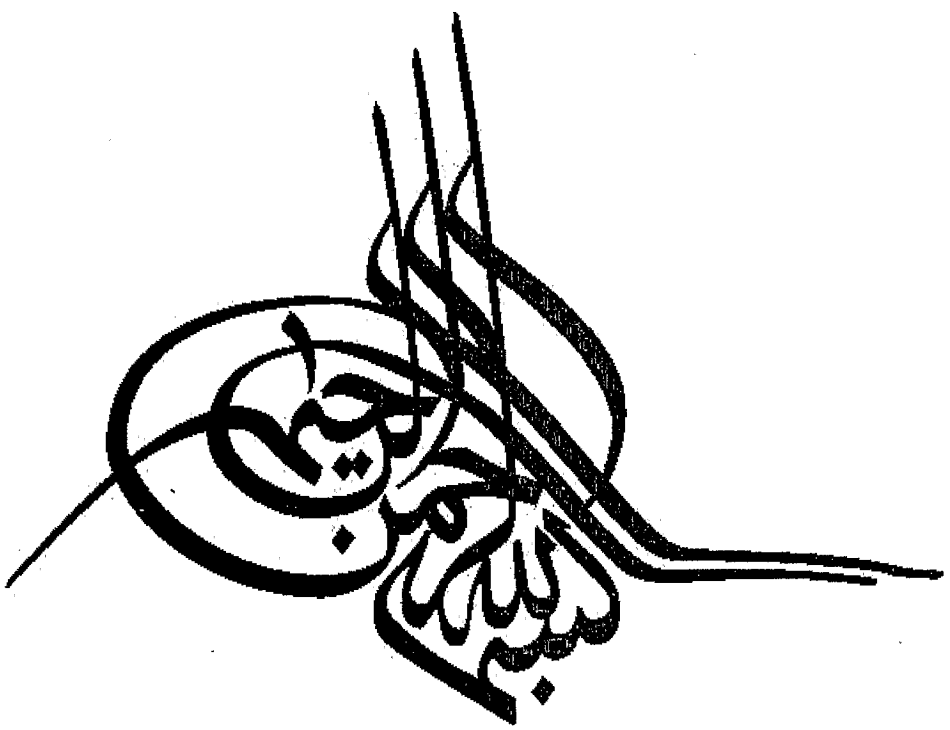

بسم الله الرحمن الرحيم

١٤٢٥٨٥

دانشکده علوم زیستی

دانشگاه شهید بهشتی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی

عنوان:

ایزوله و شناسایی باکتری تولیدکننده ماده ضدمیکروبی از پوست قورباغه درختی معمولی (*Hyla savignyi*)، استخراج و خالص‌سازی ماده ضدمیکروبی آن

دانشجو:

هاوری علائی

اساتید راهنما:

دکتر غلامحسین ابراهیمی‌پور

دکتر سید مرتضی مهرداد

استاد مشاور:

مهندس خسرو ملا جعفری

بهمن ماه ۱۳۸۸

۱۳۸۹/۷/۲۴

۱۴۷۵۷۵

تاریخ .....
شماره .....
پیوست.....

دانشگاه شهید بهشتی

بسمه تعالی

«صورتجلسه دفاع پایان نامه دانشجویان دوره کارشناسی ارشد»

تهران ۱۹۸۳۹۶۳۱۱۳ اوین
تلفن: ۲۹۹۰۱

بازگشت به مجوز دفاع ۲۰۰/۱۰۶۷۴/د مورخ جلسه هیأت داوران ارزیابی پایان نامه آقای هاوری علائی به شماره شناسنامه ۳۶۰ صادره از بانه متولد ۱۳۶۰ دانشجوی دوره کارشناسی ارشد ناپیوسته رشته زیست شناسی- میکروبیولوژی

با عنوان :

ایزوله و شناسایی باکتری تولید کننده ماده ضد میکروبی از پوست قورباغه درختی معمولی (*Hyla savignyi*)، استخراج و خالص سازی ماده ضد میکروبی آن

به راهنمائی:

۱- آقای دکتر غلامحسین ابراهیمی پور
۲- آقای دکتر سید مرتضی مهرداد

طبق دعوت قبلی در تاریخ ۱۳۸۸/۱۱/۱۳ تشکیل گردید و براساس رأی هیأت داوری و با عنایت به ماده ۲۰ آئین نامه کارشناسی ارشد مورخ ۷۵/۱۰/۲۵ پایان نامه مزبور با نمره ۱۹,۷۵ و درجه عالی مورد تصویب قرار گرفت.

۱- استاد راهنما: دکتر غلامحسین ابراهیمی پور

۲- استاد راهنما : آقای دکتر سید مرتضی مهرداد

۳- استاد مشاور: آقای مهندس خسرو ملاجعفری

۴- استاد داور : آقای دکتر جمشید فولادی

۵- استاد داورونماینده تحصیلات تکمیلی : آقای دکتر حسین ریاحی

۱۳۸۹/۷/۲۲

۱۴۲۵۸۵

تقدیم به پدر و مادر صبور و دوست داشتنی ام چرا که این دو وجود پس از پروردگار مایه هستی

ام بوده اند

به برادر گرامی و خواهران مهربانم

به خواهرزاده عزیزم میلان جان که هرچه دارم از گرمی وجود اوست.

استاد گرامی جناب دکتر ابراهیمی پور

به پاس تمامی زحمات و فداکاری های بی دریغ اتان

استاد گرامی جناب دکتر سید مرتضی مهرداد

به پاس تمامی کمک ها و راهنمائی هایتان

استاد گرامی جناب مهندس خسرو ملا جعفری

به پاس همه محبت ها و خوبیهایتان

۱۳۸۹/۷/۲۴

تشکر و قدردانی

خدای را بسی شاکرم که از روی کرم، پدر و مادری فداکار نصیبم ساخته تا در سایه درخت پربار وجودشان بیاسایم و از ریشه آنها شاخ و برگ گیرم و از سایه وجودشان در راه کسب علم ودانش تلاش نمایم. والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم چراکه این دو وجود پس از پروردگار مایه هستی ام بوده اند دستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند.

بر خود لازم میدانم از همه عزیزانی که در به ثمر رسیدن این پژوهش مرا یاری کردند قدردانی نمایم.

از خانواده مهربانم و به خصوص از خواهرزاده عزیزم میلان جان، که هرچه دارم از کرمی وجود آنهاست.

از اساتید بزرگوارم دکتر ابراهیمی پور، دکتر ریاحی، دکتر حسینی، دکتر افتخار، دکتر ابطحی، دکتر مهرداد، مهندس فخاری، مهندس خسروملا جعفری، دکتر رجبی، دکتر کیایی، دکتر مینائی و بقیه اساتیدی که در طی این دوران برایم زندگی بودن و انسان بودن را معنا کردند، صمیمانه سپاسگذاری میکنم.

از دوست بسیار عزیزم آقای سلیمان امیری که در طول این پژوهش بنده را با تمام وجود کمک کردند سپاسگذاری میکنم.

از آقای عبدالرزاق مرزبان و خانم اعظم مرادی نیز به خاطر کمک های بی دریغ اشان تشکر میکنم.

همچنین از آقایان نیا سلامیان، محمد دارائی، منصور رستگار، محسن حسینی، اکبر حیدری، نجیبی، وادی زاده و خانمها انسیه جوان، سارا رومانی، مینو طباطبائی، بهناز حیدرچی، فهیمه موسوی، مریم عباسعلی پور و مهتاب جعفرزاده، زهرا آقاجانی، زیبا نجمی، طیبه شریفیان کمال تشکر را دارم.

از هم خوابگاهی های عزیزم آقایان فروین رحیمی، طیب گل عنبری، محسن ابراهیمی، رسول نظری، شاهو حبیبی، دارا دستان، روح الله جعفری، امیر ادمن، فتح الله چمن که اینجانب را کمک کردند سپاسگذاری میکنم.

فصل اول: مقدمه ۱

۱-۲ . گروه های میکروبی تولید کننده آنتی بیوتیکها ۳

۱-۳ . طبقه بندی ترکیبات ضدمیکروبی در قورباغه ها ۵

۱-۴ . سمیت انتخابی آنتی بیوتیکها ۶

۱-۵ . طبقه بندی آنتی بیوتیکها بر اساس مکانیسم عمل ۶

۱-۶ . مقاومت نسبت به عوامل ضد میکروبی ۷

۱-۷ . موارد استفاده از آنتی بیوتیکها ۸

۱-۸ . پپتید های ضد میکروبی ۹

۱-۸-۱ . باکتریوسینها ۱۰

۱-۸-۲ . پپتیدهای خطی ۱۰

۱-۸-۳ . پپتیدهای حلقوی ۱۱

۱-۸-۴ . گلیکوپپتیدها ۱۱

۱-۸-۵ . تیازولوپپتیدها ۱۱

۱-۸-۶ . کروموپپتیدها ۱۱

۸-۱-۷ . گلیکوفسفولیپیدها ۱۱

۱-۸-۸ . لیپوپپتیدها ۱۲

۱-۹ . دوزیستان ۱۲

۱-۹-۱ . *خانواده Hylidae* ۱۴

۱-۹-۲ . جنس *Hyla* ۱۴

۱-۹-۳ . قورباغه *Hyla savignyi* ۱۴

۱-۱۰ . باکتری های جنس *Bacillus* ۱۵

۱-۱۰-۱ . باکتری *Bacillus subtilis* ۱۵

فصل دوم: مواد و روشها ۱۷

۲-۲ . مواد و محیط کشتها ۱۹

۲-۳ . جداسازی باکتری تولید کننده ماه ضد میکروبی ۱۹

۲-۴ . سویه های میکروبی اندیکاتور ۲۱

۲-۵ . سنجش فعالیت ضد میکروبی(تست آنتی بیوگرام یا تست تعیین حساسیت با استفاده از روش دیسک دیفیوژن) ۲۱
۲-۶ . تهیه سوسپانسیون میکروبی ۲۱
۲-۷ . تهیه لوله استاندارد ۰/۵ مک فارلند ۲۲
۲-۸ . استخراج ماده ضد میکروبی ۲۲
۲-۹ . شناسایی باکتری ایزوله شده ۲۲
۲-۹-۱ . روش فیلوژنتیکی ۲۲
۲-۹-۲ . مراحل استخراج *DNA* ژنومی ۲۳
۲-۹-۳ . واکنش زنجیره ای پلی مراز (*PCR*) ۲۴
۲-۹-۴ . مخلوط واکنش *PCR* ۲۶
۲-۱۰ . الکتروفورز ژل آگارز ۲۷
۲-۱۰-۱ . روش تهیه ژل آگارز ۱٪ ۲۷
۲-۱۰-۲ . رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید ۲۸
۲-۱۰-۳ . تخلیص محصول *PCR* با استفاده ازکیت ۲۸
۲-۱۱ . تعیین توالی نوکلئوتیدی (*Sequencing*) قطعه *۱۶S rDNA* ۳۰
۲-۱۱-۱ . بررسی همولوژی *16S rDNA* تعیین توالی شده ۳۰
۲-۱۲ . تست های بیوشیمیایی ۳۰
۲-۱۲-۱ . رنگ آمیزی گرم ۳۱
۲-۱۲-۲ . رنگ آمیزی اسپور ۳۱
۲-۱۲-۳ . آزمایش کاتالاز ۳۲
۲-۱۲-۴ . آزمایش اکسیداز ۳۲
۲-۱۲-۵ . آزمایش حرکت با روش قطره معلق ۳۲
۲-۱۲-۶ . تست متیل رد (*MR*) ۳۲
۲-۱۲-۷ . تست وکس پروسکوئر (*VP*) ۳۳
۲-۱۲-۸ . رشد باکتری در محیط مانیتول سالت فنل رد آگار ۳۳
۲-۱۲-۹ . تست همولیزخون گوسفند ۳۳
۲-۱۲-۱۰ . تست اندول ۳۳
۲-۱۲-۱۱. تست هیدرولیز نشاسته ۳۴

۲-۱۲-۱۲ . تست اوره آز ۳۴
۲-۱۲-۱۳ . تست احیا نیترات به نیتریت، دنیتریفیکاسیون و نیتریفیکاسیون ۳۴
۲-۱۲-۱۴ . تست هیدرولیز ژلاتین ۳۵
۲-۱۲-۱۵ . تست *Triple Sugar Iron (TSI)* ۳۵
۲-۱۲-۱۶ . تست *Oxidative Fermentation (OF)* ۳۶
۲-۱۲-۱۷ . تست رشد در شرایط بیهوازی ۳۶
۲-۱۳ . انتخاب منبع کربن جهت بررسی رشد و تولید ماده ضد میکروبی ۳۶
۲-۱۴ . انتخاب دما و *pH* بهینه جهت بررسی رشد باکتری و تولید ماده ضد میکروبی ۳۷
۲-۱۵ . تست قطبی و غیرقطبی بودن ماده ضد میکروبی ۳۷
۲-۱۶ . بررسی اثر دما بر روی فعالیت ماده ضد میکروبی ۳۷
۲-۱۷ . بررسی اثر *pH* بر روی فعالیت ماده ضد میکروبی ۳۷
۲-۱۸ . خالص سازی ماده ضد میکروبی ۳۷
۲-۱۸-۱ . حذف ناخالصیها با حلالهای آلی ۳۷
۲-۱۸-۲ . تست آتش ۳۸
۲-۱۸-۳ . تعیین نقطه ذوب ۳۸
۲-۱۸-۴ . کروماتوگرافی لایه نازک (*TLC*) ۳۸
۲-۱۹. دیالیز مایع روئی حاوی ماده ضد میکروبی با کیسه دیالیز ۳۸
۲- ۲۰ . طیف سنجی جذبی *UV-Visible* ۳۹
۲-۲۱ . رسو ب ماده ضد میکروبی با آمونیوم سولفات ۳۹
فصل سوم: نتایج ۴۱
۳-۲. ارزیابی فعالیت ماده ضد میکروبی ۴۲
۳-۳ . خصوصیات مورفولوژیکی باکتری ایزوله شده ۴۲
۳-۴ . منحنی رشد باکتری با استفاده از محیط کشت نوترینت براث در یک شبانه روز ۴۴
۳-۵ . بررسی زمانی تولید ماده ضد میکروبی توسط باکتری *ISB1* و نتایج تست آنتی بیوگرام (تست تعیین حساسیت) با استفاده از روش دیسک دیفیوژن ۴۵
۳-۶ . شناسایی باکتری ایزوله شده ۴۷

۳-۶-۱ . نتایج حاصل از تست فیلوژنتیکی *16S rDNA* ۴۷
۳-۶-۲ . نتایج حاصل از *PCR* و برنامه دمائی برای تکثیر قطعه *۱۶S rDNA* ۴۷
۳-۷ . نتایج حاصل از تستهای بیوشیمیایی ۵۴
۳-۸ . اثر منابع کربن مختلف بر روی رشد باکتری و نیز هاله عدم رشد ۵۷
۳-۹ . اثر *pH* بر روی رشد باکتری و فعالیت ماده ضد میکروبی تولید شده توسط باکتری *ISB1* ۵۷
۳-۱۰ . اثر دما بر روی رشد باکتری و فعالیت ماده ضد میکروبی تولید شده توسط باکتری *ISB1* ۵۸
۳-۱۱ . استخراج ماده ضدمیکروبی ۵۸
۳-۱۲ . تعیین قطبی و یا غیر قطبی ماده ضد میکروبی ۵۹
۳-۱۳ . نتایج حاصل از خالص سازی ماده ضد میکروبی ۵۹
۳-۱۳-۱. شستشو ماده ضد میکروبی با استفاده از حلالهای مختلف جهت حذف ناخالصیها ی آن ۵۹
۳-۱۳-۲. نتایج تست آتش ۵۹
۳-۱۳-۳. تعیین نقطه ذوب سوپرناتانت حاصل از شستشو با حلالهای آلی کلروفرم و اتیل استات ۵۹
۳-۱۳-۴ . نتایج حاصل از شستشو با شلنگ دیالیز به منظور نمک زدائی از آن ۶۰
۳-۱۳-۵ . بررسی نتایج *IR* ۶۱
۳-۱۳-۶ . نتایج طیف اسپکتروفوتومتری ماورای بنفش (*UV-Spectrum*) ۶۱
۳-۱۳-۷. نتایج حاصل از کروماتوگرافی لایه نازک (*TLC*) ۶۲
۳-۱۴. نتایج رسوب با آمونیوم سولفات ۶۳
فصل چهارم: بحث ۶۴
نتیجه گیری کلی ۷۰
پیشنهادات ۷۱
Abstract ۷۲
منابع ۷۳

فهرست اشکال، نمودار و جداول

شکل ۱ مکانیسم های تاثیر آنتی بیوتیک بر روی اجزا مختلف باکتری ۷
شکل۲ تصویر قورباغه *Hyla savignyi* ۲۱
شکل۳ موقعیت جغرافیائی استان چهارمحال و بختیاری- شهرستان لردگان ۲۱
شکل ۴ ایجاد هاله عدم رشد توسط ماده ضد میکروبی تولید شده از باکتری ایزوله شده با روشهای دیسک دیفیوژن روی کشت چمنی باسیلوس سوبتیلیس، کاندیدا آلبیکنس، اشریشیاکلی، آسپرژیلوس نایجر بر روی محیط مولر هینتون براث در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت ۴۳
شکل ۵ (الف) الکتروفورز با ژل آگارز ۱٪ محصول PCR ژن ۱۶ S rDNA در سمت راست تصویر و مارکر kb ۱ در سمت چپ تصویر، (ب) نمایی از مارکر kb ۱ شرکت فرمنتاز بکار گرفته شده در این الکتروفورز ۴۸
شکل ۶ طیف جذبی ماده ضد میکروبی با UV-Spectrum در طول موج بین ۱۹۰ تا ۱۱۰۰ نانومتر قبل از عمل دیالیز ۶۰
شکل ۷ طیف جذب ماده ضد میکروبی با UV-Spectrum در طول موج بین ۱۹۰ تا ۱۱۰۰ نانومتر بعد از عمل دیالیز ۶۰
شکل ۸ طیف مادون قرمز از ماده ضد میکروبی تولید شده توسط باکتری ISB۱ ..... ۶۱
شکل ۹ طیف جذبی ماورابنفش از ماده ضد میکروبی تولید شده توسط باکتری ISB۱ ..... ۶۲
شکل۱۰ کروماتوگرافی لایه نازک(TLC) ۶۲

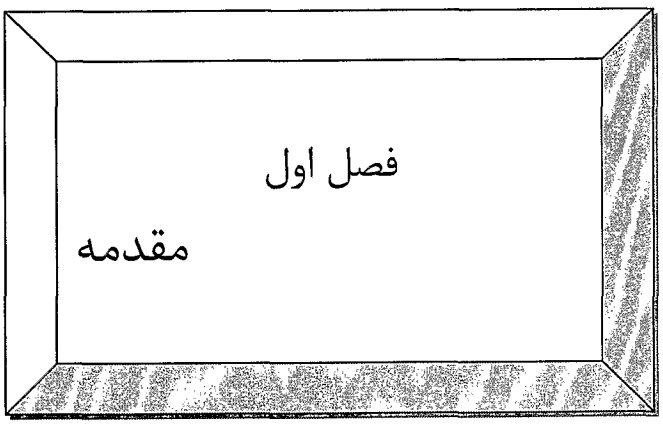
نمودار ۱ منحنی رشد باکتری(هر نقطه میانگین سه OD مربوط به سه ارلن مختلف در یک زمان مشخص را نشان میدهد) ٤٥
نمودار ۲ افزایش تولید ماده ضد میکروبی یا هاله عدم رشد با افزایش OD(بیوماس سلولی) بر روی میکروارگانیسم های اندیکاتور الف) باسیلوس سوبتیلیس ب) اشریشیاکلی ج) کاندیدا آلبیکنس ٤٦
نمودار ۳ ارزیابی فعالیت ماده ضد میکروبی در pH های مختلف ۵۷
نمودار ۴ ارزیابی فعالیت ماده ضد میکروبی در دماهای مختلف ۵۸

جدول ۱ مکان اثر آنتی بیوتیک بر روی اجزا مختلف سلول باکتری ٦
جدول ۲ کاربرد آنتی بیوتیکها ۹
جدول ۳ مخلوط واکنش زنجیره ای پلیمراز ۲٦
جدول ٤ اثر ماده ضد میکروبی تولید شده توسط باکتری ISB1 بر روی میکروارگانیسمهای اندیکاتور با استفاده از روش دیسک دیفیوژن بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار در دمای 30°C به مدت ۲۴ ساعت ٤٤
جدول ٥ شباهت فیلوژنتیکی باکتری ISB1 با باکتری های جنس باسیلوس ٤٨
جدول ٦ توالی قطعه16 S rDNA ٤٩
جدول ۷ باکتری های مشابه با باکتری ما از طریق تعیین توالی ۱۶SrDNA ۵۰
جدول ۸ مقایسه گونه های باکتریهای جنس باسیلوس با باکتری های ایزوله شده بر اساس تست های بیوشیمیائی و مورفولوژیکی ۵۵
جدول ۹ تست های بیوشیمیائی و مورفولوژیکی باکتری ایزوله شده در این پژوهش (ISB 1) ۵۵
جدول ۱۰ استخراج ماده ضدمیکروبی باکتری ISB1 با حلالها ۵۸
جدول ۱۱ آنتی بیوتیک های تولیدی توسط باکتری های جنس باسیلوس ٦٦

چکیده:

کاربرد وسیع آنتی‌بیوتیکها و مواد ضد میکروبی باعث مشکل جدی ظهور و افزایش شمار میکروارگانیسم های مقاوم به آنتی بیوتیک های رایج شده است. در این پایان نامه جهت یافتن آنتی بیوتیک جدید برای مقابله با میکروارگانیسم های پاتوژن و مقاوم به آنتی بیوتیک های رایج جداسازی و شناسائی باکتری تولید کننده ماده ضد میکروبی از پوست قورباغه درختی معمولی(Hyla savignyi)، استخراج و خالص سازی آن انجام گرفت. جهت این کار از پوست قورباغه درختی جمع آوری شده از برکه های شهرستان لردگان نمونه برداری انجام شد. آنالیز فیلوژنتیکی *16S rDNA* در سطح ۱۰۰٪ با یکی از سویه های *Bacillus subtilis* و در سطح ۹۹٪ با باکتریهای *Bacillus lichniformis*، *Bacillus malacitensis*، *Bacillus mojavensis*، *Bacillus axarquiensis* شباهت نشان داد. این باکتری هوازی اجباری، میله ای شکل با کلنی های لزج شیری، متحرک، گرم مثبت، و اکسیداز منفی میباشد که شباهت بیشتری را با باسیلوس سوبتیلیس نشان می دهد. باکتری تولید کننده ماده ضد میکروبی در شرایط هوازی و شیکر انکوباتور با دمای $30\,^{\circ}C$ و دور $120\ rpm$ و $pH=7$ و منبع کربن سدیم استات دارای بیشترین فعالیت ضد میکروبی است. فعالیت ضد میکروبی این باکتری در اواخر فاز لگاریتمی و اوایل فاز سکون به حداکثر مقدار خود میرسد. جهت استخراج و خالص سازی نسبی و نیز تعیین قطبیت ماده ضد میکروبی در محیط کشت سنتتیک، از حلال های آلی کلروفرم و سپس اتیل استات استفاده شد. به طوری که ابتدا بیوماس سلولی با سانتریفیوژ رسوب داده و مایع روئی آن چندین بار با حلال های آلی بصورت جداگانه شستشو داده شد و در نهایت از فاز آبی و فاز آلی تست آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن انجام شد. نتایج نشان داد مشاهده هاله عدم رشد در فاز آبی نشان‌دهنده قطبی بودن آن می‌باشد. ماده ضدمیکروبی تولید شده توسط باکتری وسیع‌الطیف می‌باشد. به طوری که این ماده میتواند باعث مهار رشد باکتریهای گرم مثبت *Bacillus* subtilis ATCC 465، *Staphylococcus aureus* ATCC 25923، گرم منفی *Esherichia coli* ATCC25922، قارچ *Aspergillus niger* و نیز مخمر *Candida albicans* ATCC 10231 شود. این ماده در طیف وسیعی از تغییرات دمایی ۴۰ تا $100\,^{\circ}C$ به مدت ۲ ساعت پایدار است، اما در دمای $121\,^{\circ}C$ به مدت ۱۵ دقیقه فعالیت آن از بین میرود. تغییرات pH باعث ازبین رفتن فعالیت ماده ضد میکروبی میشود و تنها در ۸ - $pH=7$ دارای فعالیت ضد میکروبی میباشد. بهترین نسبت حلال جهت بالا رفتن ماده از ورقه TLC نسبت ۳ به ۷ از حلالهای اتیل استات به متانول بود. و بر روی ورقه TLC تنها یک باند زیر نور UV با طول موج ۲۹۴ نانومتر مشاهده گردید. نقطه ذوب آن تقریبا ۲۰۰ تا $220\,^{o}C$ و در رنگ آمیزی ورقه TLC با ماده نین هیدرین لکه ارغوانی مشاهده گشت که حاکی از وجود آمینواسید در ماده تست شده میباشد. انجام روش الکتروفورز عمودی($SDS\text{-}PAGE$) و مشاهده باند مربوط، این مطلب را تایید کرد. مشخصات و شناسائی ماده ضد میکروبی در دست بررسی است.

واژه های کلیدی: آنتی بیوتیک، قورباغه *(Hyla savignyi)*، فعالیت ضد میکروبی، آنالیز فیلوژنتیکی، خالص سازی.


فصل اول
مقدمه

۱-۱ . تاریخچه و مقدمه

مواد شیمیائی مثل کینیدین برای درمان مالاریا و امتین برای درمان آمیبیاز از قرن هفدهم برای درمان بیماریهای عفونی مورد استفاده قرار گرفته اند. با این حال دانش شیمی درمانی توسط پل ارلیخ[۱] در دهه نخست قرن بیستم آغاز شد. آزمایشها و تجربیات ارلیخ منجر به کشف ترکیبات آرسفنامین[۲] شد که نخستین پیروزی عمده در شیمی درمانی به شمار می رفت. دوره فعلی شیمی درمانی ضد میکروبی از سال ۱۹۳۵ همزمان با کشف سولفونامید ها[۳] آغاز شد. در سال ۱۹۴۰ نشان داده شد که پنی سیلین را که در سال ۱۹۲۹ کشف شده بود میتوان به صورت یک ماده درمانی موثر به کار برد. چینی ها نیز بیش از ۲۵۰۰ سال پیش به اثرات درمانی گرد سویا بر روی کورکها و سایر عفونتهای مشابه پی برده اند. در دوران باستان یونانی ها، رومی ها و مصری ها از کپک ها جهت درمان بیماری ها استفاده می کردند. مصری ها از پنی سیلیوم ها استفاده می کردند که هنوز در مناطق ویژه ای از هیمالیا نظیر Bhutan از این قارچ استفاده می کنند. درمان بیماری های عفونی برای قرن ها توسط انسان های دوران قدیم با تکیه بر تجربه و مشاهداتشان از عصاره گیاهان جهت درمان بیماریها استفاده میکردند (۶). شیخ الرئیس ابو علی سینا نیز به اثرات درمانی بسیاری از گیاهان و نیز داروهای معدنی و داروهای حیوانی در کتاب قانون در طب اشاره میکند به عنوان مثال میتوان به اثرات درمانی گیاه اکلیل به عنوان مسکن درد، صمغ درخت اقاقیا که مخلوط آن با زرده تخم مرغ در مداوای دمل و جوش، موسیر(بلبوس) برای مداوای ورم چشم و مخلوط آن با عسل جهت تسکین درد، دارچین برای درمان سرفه و نیز به عنوان حشره کش، رازیانه خوردن آن با آب سرد جهت درمان التهاب معده و نیز علاج تب های مزمن اشاره کرد (۱۰). طی دوره ۲۵ ساله بعدی، تحقیقات در مورد عوامل شیمی درمانی عمدتا متمرکز بر موادی از منشا میکروبی موسوم به آنتی بیوتیک بود. به دنبال جداسازی، تغلیظ، تخلیص و تولید انبوه پنی سیلین، استرپتومایسین، تتراسایکلین ها، کلرامفنیکل و بسیاری از عوامل دیگر ارائه شدند. این مواد ابتدا از عصاره صاف شده محیط هائی بدست می آمد که کپک های مربوطه در آن محیط ها رشد داده شده بودند. بعدها ترکیبات دیگر به صورت نیمه سنتزی تولید شدند و در سالهای اخیر تغییرات بیوسنتتیک مولکولها، روش عمده ای در ارائه داروهای ضد میکروبی جدید بوده است. مهمترین اصلی که درمان ضد میکروبی بر پایه آن استوار است مفهوم سمیت انتخابی است. سمیت انتخابی به معنای مهار انتخابی رشد میکروارگانیسم، بدون آسیب به سلول میزبان است. دست یابی به سمیت انتخابی با در نظر گرفتن تفاوتهای موجود در متابولیسم و ساختمان میکروارگانیسم و سلولهای انسان میسر میگردد (۱ و ۵).

۱- Paul Ehrlich ۲- Arsphenamines

آنتی بیوتیکها طیف گسترده ای از مواد حاصل از متابولیسم ثانویه با وزن مولکولی پایین هستند که معمولا از میکروارگانیسم هائی همچون باکتریها (استرپتومایسس ها، باسیلوس ها)، قارچها (کپکهای پنی سلیوم و سفالوسپوریوم) و اکتینومیست ها بدست می آید و سبب جلوگیری از رشد و یا تخریب میکروارگانیسم های خاص دیگر میشود (۴۱). اولین استفاده از آنتی بیوتیک را ۲۵۰۰ سال پیش، مردمان چین قدیم با توجه به اثرات درمانی گرد سویا بر روی کورکها استفاده کردند که البته در فرهنگ های قدیمی دیگر همچون یونان و مصر و اعراب قرون وسطی نیز از گیاهان وکپکها برای درمان عفونتها وبیماریها استفاده میشد (۶). معروفترین نمونه در این خصوص وقتی بود که الکساندر فلمینگ در سال ۱۹۲۹ مشاهده کرد رشد استافیلوکوک بر روی پلیت به دلیل آلوده شدن محیط کشت به پنی سلیوم نوتاتوم[۱۳] متوقف شد (۴). اصطلاح آنتی بیوتیک توسط سلمن واکسمن[۱] در سال ۱۳۴۲ برای توصیف ماده ای که توسط میکروارگانیسم ها تولید میشود وخاصیت آنتاگونیستی بر روی رشد میکروارگانیسم های دیگر دارد، میباشد. تولید آنتی بیوتیک(پنی سیلین) در سال ۱۹۳۹ اولین بار توسط فلوری[۲] و چاین[۳] انجام شد و اهمیت فوق العاده آنها سبب شد که جستجوهای وسیعی در پزشکی بر روی کشف و تولید آنتی بیوتیک ها انجام شود. همچنین به دلیل شیوع میکروارگانیسم های مقاوم به آنتی بیوتیکهای رایج تلاش برای کشف آنتی بیوتیکهای جدید شدت گرفته است .

۱-۲ . گروه های میکروبی تولید کننده آنتی بیوتیکها

قارچ ها یکی از منابع تولید موادضد میکروبی هستند به عنوان مثال قارچهایی نظیر فیکومیستها[۴]، آسکومیستها[۵] (نظیر خانواده آسپرژیلاسه آ[۶] (مانند جنسهای پنی سیلیوم و آسپرژیلوس)، بازیدیومیستها[۷]و مونیلیالس[۸] تولید آنتی بیوتیک میکنند. در قارچها، فقط آنتی بیوتیکهای تولید شده توسط آسپرژیلاسه آ و مونیلیالس، از نظر قابلیت استفاده حائز اهمیت هستند. ترکیبات ایزوله شده از بازیدیومیستها هیچ کاربرد عملی ندارند. تنها ۱۰ آنتی بیوتیک قارچی شناخته شده بطور تجاری تولید میشوند و از آنتی بیوتیکهای تولید شده توسط قارچها که از نظر پزشکی مهم هستند میتوان به پنی سیلینها، سفالوسپورینها، گریزیوفلوین[۹] و فوسیدیک اسید[۱۰] اشاره کرد (۴).

جلبکها نیز منبع خوبی برای جداسازی آنتی بیوتیک های مختلف می باشد. یک استفاده تجاری از جلبک ها، استخراج ترکیباتی مانند آنتی بیوتیک ها و دیگر ترکیبات فعال بیولوژیکی از آنها است که از لحاظ فارماکوپی توجه کمی به آنها شده است. عصاره

۱- Selman Waxman ۲- Florey ۳- Chain ٤- Phycomycetes ٥- Ascomycetes

٦- Aspergillaceae ۷- Basidiomycetes ۸- Moniliales ۹- Griseofulvin ۱۰- Fusidic acid

۱۱- *Diatoms* ۱۲- *Dinoflagellates* ۱۳- *Penicillium notatum*

سلولی و عصاره محیط کشت جلبک های تک سلولی نظیر *Chlorella vulgaris* و *Chlamydomonas pyrenoidosa* دارای فعالیت ضد باکتریایی بر علیه باکتری های گرم منفی و گرم مثبت هستند. همینطور عصاره های بدست آمده از جلبک های سبز، دیاتومه ها[11] و دینوفلاژلاها [12] دارای خاصیت ضد قارچی است. جلبک های ریزی نظیر *Prymnesium parvum* و گونه *Ochromonas* و همینطور تعدادی از سیانوباکترها (جلبک های سبز-آبی) تولید توکسین هایی می کنند که دارای کاربردهای فارماکوپی قوی می باشند. سویه های گوناگونی از سیانوباکترها تولید متابولیت های داخل و خارج سلولی می کنند که دارای فعالیت های ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد جلبکی و ضد ویروسی هستند. همچنین جلبکهای ریزی نظیر *Chrococcus*، *Oscillatoria*، *Synechocystis aquatilis*، *Anabaena* و *Chlorella vulgaris* بر روی *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli*، و انواع باسیلوسها اثر ضد میکروبی دارند (۵۰).

از گروه های دیگر تولید کننده آنتی بیوتیک یا مواد ضد میکروبی، میتوان به گیاهان اشاره کرد. به عنوان مثال اسانسهای گیاهی دارای خاصیت ضدعفونی‌کنندگی می‌باشند و در گذشته از این خاصیت برای نگهداری و جلوگیری از کپک‌زدن و خراب‌شدن مواد غذایی استفاده می‌کردند (۷). تیونین‌ها[1] اولین پپتیدهای ضدمیکروبی می‌باشند که از گیاهان جدا شده‌اند (۳۸). آنها خاصیت سمی بر روی باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی، قارچها، مخمرها و انواع سلولهای پستانداران دارند (۲۲). دفنسینهای[2] گیاهی از نظر ساختاری شبیه دفنسینهای حشرات و پستانداران هستند اما به جای فعالیت ضدباکتری، خاصیت ضدقارچی دارند (۶۸). از ترکیبات دیگر می‌توان ترکیبات فورانوکومارینی[3] و آنژسین[4] را نام برد (۲۲ و ۶۸).

در باکتریها، گروه های طبقه بندی شده علمی زیادی وجود دارند، که آنتی بیوتیک تولید میکنند. بیشترین تنوع در ساختمان وشمار آنتی بیوتیکها در استرپتومایستها، بخصوص در جنس استرپتومایسس یافت میشود که حدود ۶۰٪ از آنتی بیوتیک های شناخته شده نظیر اریترومایسین، تتراسیکلین، استرپتومایسین، کلرامفنیکل، نئومایسین، نیستاتین، آمفوتریسین*B*، کاناماپسین، سیکلوهگزیمید ها و بسیاری دیگر را تولید می نمایند (۴، ۱۸و ۶۶).

گروه مهمی از ترکیبات آنتی بیوتیکی، پپتیدی هستند، که بوسیله باکتری های جنس باسیلوس تولید میشوند. علاوه بر این، ارگانیسمهای دیگری مانند اسفنجها، مرجانها، جلبکها، گیاهان و حیوانات کوچکتر نیز قادر به تولید آنتی بیوتیک میباشند (۳۶).

۱- Thionins ۲- Defensins ۳- Furanocoumarin ٤- Angisin ٥- Amphipathic

٦- Caerins ۷- Brevinins-1&2 ۸- Ranaeturins-1&2 ۹- Esculentins-1&2 ۱۰- Temporins

۱-۳ . طبقه‌بندی ترکیبات ضدمیکروبی در قورباغه‌ها

آنتی بیوتیکهای جدا شده دارای فعالیت ضد میکروبی متفاوتی هستند که شامل :

۱) پپتیدهای خطی تشکیل‌دهنده مارپیچ α با خاصیت آمفی‌پاتیک[۵] مانند ماگاینین‌ها از قورباغه چنگال‌دار آفریقایی *Xenopus laevis* و کرین‌ها[۹] از قورباغه استرالیایی *Litoria Splendida* .

۲) پپتیدهای دارای پیوند دی‌سولفید (شامل ۶ گروه متفاوت در پوست رانید به نامهای بروینین[۱۰]های ۱و۲، راناتورین[۱۱]های۱و۲ واسکولنتین های۱و۲) پپتیدهای هیدروفوبیک با سیستین آزاد (شامل تمپورین‌ها در *Rana temporaria*) (۱۶).

این پپتید های دارای خاصیت ضد میکروبی بر اساس ژن های عامل بوجود آورنده به دو دسته تقسیم میشوند که شامل:

۱-پپتید های بوجود آمده از ژن *Rana* (خانواده *Ranida*، زیر خانواده *Raninae*):

پیوند دی‌سولفیدی حفظ شده‌ای در قطعه هپتاپپتیدی در انتهای C-ترمینال دارند. پپتیدهای خانواده‌هایی با این باقیمانده(قسمت) شامل گاگواین‌ها[۱] (۳۷-۲۴ باقیمانده آمینواسیدی)، بروینین‌های (۲۴-۱۷ باقیمانده آمینواسیدی) و (۳۴-۳۰ باقیمانده آمینواسیدی)، راناتورین‌های ۱ (۲۵ باقیمانده آمینواسیدی) و ۲ (۳۳ باقیماندآمینواسیدی) رانالکسین‌ها[۲] (۲۰ رزیدو)، اسکولنتین‌های[۳] ۱ (۴۶ باقیمانده آمینواسیدی) و ۲ (۳۷ باقیمانده آمینواسیدی) و روگوزین‌ها[۴] (۳۷-۳۳ باقیمانده آمینواسیدی) که از گونه‌های رانا اروپایی، آسیایی و آمریکای شمالی ایزوله شده‌اند (۷۴). زیر خانواده پپتیدی دیگر از پپتیدهای بسیار کوچک به نام تمپورین‌ها[۵] (۱۳-۱۰باقیمانده آمینواسیدی) که فاقد حلقه C –ترمینال می‌باشند از رانا آمریکای شمالی و اروپایی ایزوله شده‌اند (۷۴).

۲- پپتیدهای خطی بوجود آمده از ژن *Hyla* (خانواده *Hylidae*، زیر خانواده *phylomedusinnae*)

دارای مارپیچ α با خاصیت آمفی‌پاتیک می‌باشند. شامل درماسپتین‌هایB[۶] (۳۴-۲۴ باقیمانده آمینواسیدی) و درماسپتینS، فیلوکسین[۷] (۱۹ باقیمانده آمینواسیدی) و درماتوکسین[۸] (۳۲ باقیمانده آمینواسیدی) که از هیلا آمریکای جنوبی و نواحی گرمسیری آمریکای شمالی ایزوله شدند (۷۵).

۱- Gaegueins ۲- Ranalexins ۳- Esculentins-1&2 ٤- Rugosins ٥- Temporins

٦- Dermaseptins ۷- Phylloxins ۸- dermatoxins ۹- Caerins ۱۰- Brevinins-1&2

۱۱- Ranaeturins-1&2

۱-۴ . سمیت انتخابی آنتی بیوتیکها

بطورکلی یک داروی ضد میکروبی ایده آل، سمیت انتخابی دارد. یعنی دارو برای میکروب مضر است ولی به سلول میزبان آسیب نمی رساند، غالبا سمیت انتخابی دارو مطلق نیست بلکه نسبی است. به این معنا که غلظتی از دارو که سلول میزبان میتواند تحمل کند اما در عین حال به میکروارگانیسم عفونی آسیب میرساند. آنتی‌بیوتیک‌ها و عوامل ضدمیکروبی مفید و مطلوب باید ۱- طیف وسیعی از فعالیت بر علیه گونه‌های مختلف ارگانیسم‌های پاتوژن ۲- بدون عوارض جانبی ناخواسته و غیرسمی ۳- در مصرف‌کننده حساسیت‌زا نباشند۴- تولید آنها به سهولت انجام شود و نیز دارای ثبات شیمیایی یا به عبارت دیگر نیمه عمر زیاد باشند (۱ و۸).

۱-۵ . طبقه بندی آنتی بیوتیکها بر اساس مکانیسم عمل

آنتی بیوتیکها بر اساس مکانیسم عمل و اینکه کدام قسمت از باکتری را مورد هدف قرار می دهد به ۵ گروه متفاوت طبقه بندی میشوند(جدول ۱)، که در شکل۱ نیز به طور شماتیک نشان داده شده است.

جدول ۱ مکان اثر آنتی بیوتیک بر روی اجزا مختلف سلول باکتری (۷۲).

آنتی بیوتیکهای موثر دیواره سلولی	آنتی بیوتیکهای بتا لاکتام[۱]، وانکومایسین[۲]، باسیتراسین[۳]، پلی میکسین[۴]، ایزو نیازید[۵]، سیکلوسرین[۶]
آنتی بیوتیکهای موثر بر سنتز غشاء سلولی	آمفوتریسین[۷]، کلیستین[۸]، ایمیدازول[۹]، نیازول[۱۰]، پلی ان ها[۱۱]، پلی میکسین
آنتی بیوتیکهای موثر بر سنتز پروتئین	پوروماسین[۱۲]، لینکومایسین[۱۳]، کلیندامایسین[۱۴]، کلرامفنیکل[۱۵]، استرپتومایسین[۱۶]، جنتامایسین[۱۷]
آنتی بیوتیکهای موثر بر مسیرهای متابولیسمی	تری متو پریم[۱۸]، سولفونامیدها[۱۹]
آنتی بیوتیکهای موثر بر سنتز نوکلئیک اسید (*DNA and RNA*)	نالیدیکسیک اسید[۲۰]، اکتینومایسین[۲۱]، اتیدیوم بروماید[۲۲]، بلومایسین[۲۳]، میتومایسین*C*[۲۴]، اکتینومایسینD[۲۵]، ریفامایسین[۲۶]

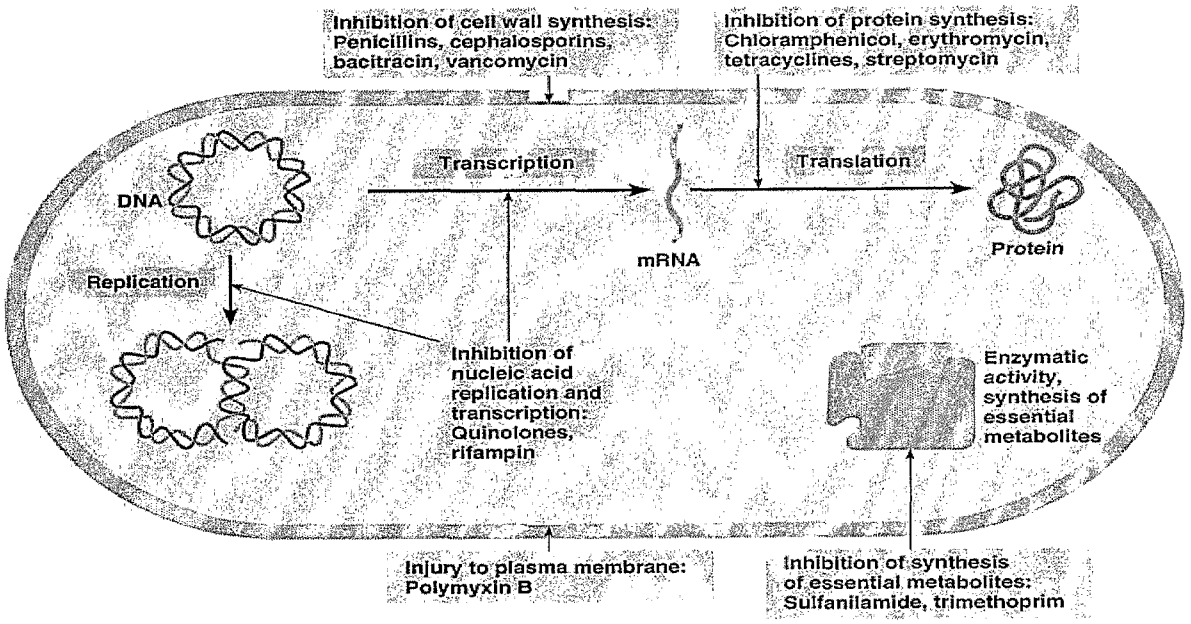
۱- ß-lactam ۲- Vancomycin ۳- Bacitracin ۴- Polimixin ۵- Isoniazid ۶- Cycloserin

۷- Amphptericin-B ۸- Colicitin ۹- Imidazole ۱۰- Niazole ۱۱- Polyen ۱۲- Puromycin

۱۳- Lincomycin ۱۴- klindamycin ۱۵- Chloramphenicol ۱۶- Streptomycin ۱۷ - Gentamicin

۱۸- Trimethoprim ۱۹- Sulfonamide ۲۰- Nalidixic acid ۲۱- Actinomycin ۲۲- Ethidiumbromide

۲۳- Bleomycin ۲۴- Mitomycin c ۲۵- Actinomycin D ۲۶- Rifampicine



شکل ۱ مکانیسم های تاثیر آنتی بیوتیک بر روی اجزا مختلف باکتری

۱-۶ . مقاومت نسبت به عوامل ضد میکروبی

باکتری ها از طریق چهار مکانیسم اصلی نسبت به عوامل ضد میکروبی مقاومت نشان میدهند(۳)، که عبارتند از :

۱- تغییر جایگاه هدف دارو که سبب کاهش و یا از بین رفتن تمایل دارو برای اتصال به جایگاه های هدف میشود (تغییر گیرنده دارو)

۲- تخریب و یا غیر فعال کردن دارو

۳- ناتراوا شدن نسبت به ورود آنتی بیوتیک به درون باکتری(کاهش ورود آنتی بیوتیک)

۴- میانبر متابولیکی که در آن سلول از یک راه متابولیکی دیگر به جای راه متابولیکی که توسط دارو مهار شده استفاده میکند.(توسعه راههای متابولیکی مقاوم)

قبل از سال ۱۹۶۰ ، در حدود ۵٪ آنتی بیوتیکها که تازه استخراج شده بودند از نظر پزشکی مفید بودند. در سالهای بعد، آنتی بیوتیکهای جدید که به بازار عرضه شدند، از ۲/۶٪ در فاصله سالهای ۱۹۶۱ تا ۱۹۶۵ به ۱٪ در سال ۱۹۶۶ تا ۱۹۷۱ کاهش یافت. این کاهش اصولا به خاطر افزایش شدید هزینه توسعه و آزمایشات پزشکی بود، به طوری که سازندگان، تنها آن دسته از

ترکیباتی را که بوضوح پیشرفت درمانی امید بخشی را نشان میدادند، تولید می نمودند. دلایل تداوم تحقیقات در زمینه تولید و کشف آنتی بیوتیک های جدید را میتوان به شرح زیر بیان نمود.

در بسیاری از موارد، خصوصیات یک آنتی بیوتیک طبیعی برای کاربرد درمانی، مطلوب نیست. در این خصوص اصلاحات زیر مورد نیاز است: کاهش عوارض جانبی، محدوده ضد میکروبی وسیعتر، انتخابی عمل کردن در مقابل عوامل بیماریزا و نیز افزایش فعالیت ضد میکروبی آن. در ضمن در بسیاری از رشته های علوم پزشکی و یا غیر پزشکی آنتی بیوتیک مناسب در دسترس نیست (۸). استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها با افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی همراه می باشد. آنتی‌بیوتیک‌ها در پزشکی ، دامپزشکی و در پرورش حیوانات به عنوان افزایش دهنده های رشد به کار می‌روند، که خود منجر به افزایش پیدایش مقاومت در بین باکتریها می‌شود. افزایش و گسترش باکتری‌های بیماریزای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، درمان مؤثر بیماری‌های عفونی را تهدید می کند. فاکتورهای مقاومت اغلب با شاخص های ژنتیکی متحرک مانند ترانسپوزون ها[1] همراه می‌باشند و بدین وسیله به باکتری‌های دیگر منتقل می شوند (۵۹). مطالعات متعدد نشان داده است که در طی دهه گذشته عفونت های بیمارستانی که به وسیله باکتری های مقاوم ایجاد می شوند بسیار رایج شده است و مرگ و میر در این عفونت ها در حال افزایش است که اغلب با مقاومت دارویی همراه می باشد (۶۱). چنانچه مقاومت نسبت به یک آنتی بیوتیک زیاد شود، ممکن است به طور همزمان در مقابل انواع دیگری که همان طرز عمل یا مکانیسم جذب را دارند، توسعه یابد. از طرفی دیگر مصرف بی رویه آنتی بیوتیکها، سبب افزایش بیشتر مقاومت میشود، با این وجود در صورت مصرف محتاطانه، باز هم مقاومت ولو با سرعت کمتر بوجود میاید. در حال حاضر تنها راه حل برای بر طرف کردن مشکل مقاومت، کشف آنتی بیوتیک های جدید می‌باشد(۳ ، ۵ و ۸).

۱-۷ . موارد استفاده آنتی بیوتیکها

آنتی بیوتیکها کاربرد های زیادی دارند که بیشتر به عنوان عوامل شیمی درمانی از آنها استفاده میشود. اما از آنتی بیوتیکها در موارد زیر نیز استفاده میشود که در جدول ۲ آمده است.

۱-Transposone