

Paper Type: Original Article



Production of Streptothricin D by a Rhizospheric *Streptomyces* sp. Isolated from the Medicinal Plant *Mentha longifolia*

Fatemeh Alinejad¹, Gholam Khodakaramian*¹ 

¹Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran;

*(Professor: Corresponding author: khodakaramian@basu.ac.ir).

Citation:

Alinejad, F. & Khodakaramian, G. (2024). Production of streptothricin D by a rhizospheric *Streptomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Mentha longifolia*. *The quarterly scientific journal of applied biology*, Volume 37 (Issue No. 4), PP. 1-10

Received: 2023.10.13

Accepted: 2023.12.26

Abstract

Introduction: The majority of antibiotics that are used today are produced by actinomycetes, especially the genus of *Streptomyces*. Because of the high potential of *Streptomyces* species to produce antimicrobial compounds, these bacteria are still an interesting source for identifying new antimicrobial compounds. Due to the influence of environmental micro factors on microbial communities and their gene expression, including the synthesis of secondary and antimicrobial compounds, it is valuable to isolate *Streptomyces* from unique environments for identifying new compounds. The rhizosphere of wild traditional medicinal plants appears to be a promising environment for the isolation and identification of *Streptomyces*, as well as the discovery of new compounds. In this study, we investigated the antimicrobial activity of *Streptomyces* isolates collected from the rhizosphere of native medicinal plants in Hamedan province against gram-positive and gram-negative bacteria.

Methods: Different isolates of *Streptomyces* were collected from the rhizosphere of medicinal plants in the Averzaman region in Hamedan province, and their antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria was investigated using bioassay tests. Metabolomics analysis of the extracts obtained from the liquid culture of the active isolates was performed using ESI-MS to identify active compounds corresponding to the observed bioactivities.

Results: Based on bioassay tests, the *Streptomyces* sp. 3Z isolated from the rhizosphere of *Mentha longifolia* exhibited strong antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria.

Conclusion: Metabolomics analysis of the active fraction of the crude extract of this isolate confirmed the production of Streptothricin D by this isolate.

Keywords: *Streptomyces*, Antibiotic, Streptothricin, Antibacterial activity, Rhizosphere, Mass spectrometry



تولید استرپتوتریسین D توسط *Streptomyces* sp. جدا شده از ریزوسفر گیاه دارویی *Mentha longifolia*

فاطمه علی‌نژاد^۱، غلام خداکرمیان^{۲*}

^۱ دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

^۲ استاد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

(*نویسنده مسئول: khodakaramian@basu.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۰۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۲۱

چکیده

مقدمه: اکثر آنتی‌بیوتیک‌هایی که امروزه استفاده می‌شوند توسط اکتینومیست‌ها و به ویژه جنس *Streptomyces* سنتز می‌شوند و به دلیل پتانسیل بالای آن‌ها برای تولید ترکیبات ضد میکروبی، این گروه از باکتری‌ها همچنان یک منبع بالقوه برای شناسایی ترکیبات جدید هستند. به دلیل تاثیر ریزفاکتورهای محیطی بر جوامع میکروبی و بیان ژن‌های آن‌ها از جمله ژن‌های سنتزکننده ترکیبات ثانویه و ترکیبات ضد میکروبی، جداسازی *Streptomyces* ها از زیستگاه‌های منحصر به فرد با هدف شناسایی ترکیبات جدید، می‌تواند مفید باشد. به نظر می‌رسد ریزوسفر گیاهان دارویی سنتی می‌تواند یک محیط غنی برای جداسازی و شناسایی *Streptomyces* ها و ترکیبات جدید باشد. در این مطالعه به بررسی فعالیت ضد میکروبی جدایه‌های *Streptomyces* جمع‌آوری شده از ریزوسفر گیاهان دارویی بومی استان همدان علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی پرداخته شد.

روش‌ها: جدایه‌های مختلف *Streptomyces* از ریزوسفر گیاهان دارویی منطقه آوزرمان در استان همدان جمع‌آوری شدند و فعالیت ضد میکروبی آن‌ها علیه چند باکتری گرم مثبت و گرم منفی با استفاده از آزمون‌های زیست‌سنجی انجام شد. آنالیز متابولومیکس عصاره‌های استخراج شده از کشت‌مایع جدایه‌های فعال جهت شناسایی ترکیبات ضد میکروبی با استفاده از روش ESI-MS انجام شد.

یافته‌ها: براساس آزمون‌های زیست‌سنجی جدایه *Streptomyces* sp. 3Z جدا شده از ریزوسفر *Mentha longifolia* فعالیت ضد میکروبی قوی در تقابل با تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داد.

نتیجه‌گیری: آنالیز متابولومیکس فرکشن فعال به‌دست‌آمده از عصاره استخراجی از کشت مایع این جدایه، تولید Streptothricin D توسط این جدایه را تایید کرد.

کلیدواژه‌ها: *Streptomyces*، آنتی‌بیوتیک، Streptothricin، ریزوسفر، طیف سنجی جرمی، فعالیت ضد باکتریایی

مقدمه

اکثر آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در پزشکی، دامپزشکی و کشاورزی توسط اکتینومیست‌ها و عمدتاً جنس *Streptomyces* تولید می‌شوند [1]. اندازه ژنوم این گروه از باکتری‌های گرم مثبت نسبت به سایر باکتری‌ها بزرگتر بوده و حاوی درصد بالایی از GC (حدود ۷۰ درصد) است. اعضای این جنس بین ۲۰-۶۰ خوشه ژنی سنتزکننده متابولیت‌های ثانویه در ژنوم خود دارند که اکثر آن‌ها خاموش بوده و بیان نمی‌شوند. از این رو این گروه از باکتری‌ها هم‌چنان به عنوان یک منبع بالقوه برای شناسایی ترکیبات ضد میکروبی جدید مورد توجه هستند [2]. با این وجود اکثر این خوشه‌های ژنی در شرایط عادی بیان نشده و خاموش هستند و برای القای بیان آن‌ها سیگنال‌های محیطی خاصی مورد نیاز است [3]. علی‌رغم پیشرفت‌های اخیر در ارتباط با ژنومیکس *Streptomyces* و تلاش برای بیان خوشه‌های ژنی خاموش/یا خوشه‌های ژنی با بیان ضعیف، جداسازی جدایه‌های *Streptomyces* از محیط‌های مختلف با هدف شناسایی ترکیبات جدید هم‌چنان مورد توجه است [4]. مطالعات مبتنی بر ژنومیکس *Streptomyces* نشان می‌دهد که گونه‌های یکسان جدا شده از زیستگاه‌های مختلف دارای مجموعه‌های متفاوتی از خوشه‌های ژنی بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه (Biosynthesis) (gene clusters (BGCs)) هستند [5]. تفاوت ژنومی میان سویه‌های نزدیک به هم مربوط به جزایر ژنومی (Genomic Islands (GIs)) روی کروموزوم است که معمولاً حاصل انتقال افقی ژن‌ها هستند و احتمالاً در سازگاری با شرایط محیطی نیز نقش دارند [6].

به دلیل تنوع مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و متابولیکی، باکتری‌های *Streptomyces* در محیط‌های مختلف آبی، خاکی و هم‌چنین در ارتباط با حیوانات و گیاهان وجود دارند [7]، [8]، [9]. به منظور جداسازی *Streptomyces* با هدف شناسایی ترکیبات جدید، به نظر می‌رسد که بررسی زیستگاه‌های منحصربه‌فرد محیطی می‌تواند مفید باشد. در این راستا، ریزوسفر گیاهان دارویی وحشی یکی از منابع غنی و امیدوارکننده برای جداسازی و شناسایی جدایه‌های *Streptomyces* است [10]، [11]. ناحیه ریزوسفر در تماس مستقیم با ریشه گیاه بوده و ترشحات ریشه منبع غنی از قندها، آمینواسیدها و دیگر منابع کربن/نیتروژن جهت رشد جامعه میکروبی در این ناحیه را فراهم می‌کند [12] و گونه‌های *Streptomyces* به دلیل توانایی تولید محدوده وسیعی از ترکیبات ضد میکروبی و توسعه مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی، جزو موفق‌ترین گروه میکروارگانیسم‌ها برای استعمار این نیچ اکولوژیکی ویژه هستند [13].

هدف این مطالعه جداسازی و شناسایی جدایه‌های *Streptomyces* از ریزوسفر گیاهان دارویی در استان همدان به دلیل تنوع گیاهان دارویی در این استان و بررسی پتانسیل این جدایه‌ها جهت تولید ترکیبات ضد میکروبی است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و جداسازی جدایه‌ها

نمونه‌برداری از ریزوسفر گیاهان دارویی پونه، شیرین‌بیان، بومادران و کاسنی از منطقه آوزمان در استان همدان با مختصات جغرافیایی $34^{\circ}47'54''N$, $48^{\circ}30'53''E$ در خرداد ماه انجام شد. از هر گیاه یک عدد به صورت تصادفی انتخاب شد و نمونه‌های خاک ریزوسفر درون کیسه‌های پلاستیکی به طور جداگانه برای جداسازی جدایه‌های *Streptomyces* به آزمایشگاه گروه بیماری‌شناسی گیاهی (دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان) منتقل شدند. نمونه‌های خاک به مدت دو روز در دمای اتاق و در مجاورت هوا خشک شدند. سپس از نمونه‌ها سری رقت تهیه شد و پس از کشت روی تشتک‌های حاوی محیط کشت نشاسته-کازئین-آگار (SCA) و مخمر-مالت-آگار (ISP2)، به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و رشد کلونی‌های باکتری در این مدت مورد بررسی قرار گرفت. تک کلنی‌های *Streptomyces* شناسایی شده بر اساس مورفولوژی بر روی محیط کشت ISP4 (Inorganic Salt Starch Agar) (BD Difco) کشت مجدد شدند و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت روز نگهداری شدند. پس از حصول اطمینان از خلوص جدایه‌ها، سوسپانسیون اسپوری از کشت‌های خالص در گلیسرول ۳۰ درصد تهیه و برای ادامه پژوهش در دمای منفی چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [14]، [15].

غربالگری اولیه جدایه‌ها بر اساس توانایی آن‌ها در تولید ترکیبات ضد میکروبی

فعالیت ضد میکروبی جدایه‌های *Streptomyces* در تقابل با باکتری‌های گرم مثبت (*Staphylococcus aureus* ATCC 25423) و *Bacillus subtilis* (گرم منفی) (*Erwinia amylovora*) (دریافت شده از گروه بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده) به روش کشت متقاطع و با استفاده از محیط کشت سیب زمینی-دکستروز-آگار (PDA) (۲۰۰ گرم عصاره سیب‌زمینی، ۲۰ گرم دکستروز، ۲۰ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) انجام شد. تشتک‌های حاوی کشت خطی جدایه‌های *Streptomyces* در وسط، به مدت هفت روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [16] و پس از رشد جدایه‌ها، تشتک‌ها با باکتری‌های بیماری‌زای ذکر شده (با زاویه ۹۰ درجه نسبت به کشت اولیه جدایه‌های *Streptomyces*) تلقیح شدند و مجدد به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در نهایت توانایی جدایه‌ها در ممانعت از رشد باکتری‌های بیماری‌زا جداگانه بررسی شد و در جدایه‌هایی که بیشترین هاله بازدارندگی از رشد را داشتند و دارای تفاوت مورفولوژیکی روی محیط کشت‌های SCA، ISP2 و ISP4 بودند، انتخاب شدند تا توانایی تولید متابولیت‌های ضد میکروبی توسط این جدایه‌ها در محیط مایع نیز بررسی شود [16].

غربالگری ثانویه جدایه‌ها بر اساس توانایی آن‌ها در تولید ترکیبات ضد میکروبی

جهت غربالگری ثانویه جدایه‌های منتخب و بررسی توانایی آن‌ها در تولید ترکیبات ضد میکروبی در محیط کشت مایع، از کشت تازه‌ی جدایه‌های منتخب روی محیط کشت ISP4، سوسپانسیون اسپوری در آب تهیه شد و یک میلی‌لیتر از آن به ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت بذری (حاوی ۰/۵ گرم نشاسته، ۰/۵ گرم گلوکز، ۰/۱ گرم پیتون، ۰/۵ گرم NaCl، ۰/۲ گرم $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ، ۰/۱ گرم $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۱ گرم K_2HPO_4 و ۰/۲ گرم CaCO_3 در یک لیتر آب مقطر) درون ارلن مایرهای ۱۰۰ میلی‌لیتری اضافه و به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر با ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پنج میلی‌لیتر از محیط کشت بذری به ارلن‌های نیم‌لیتری حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت BPM3 (حاوی ۱۰ گرم نشاسته، ۲ گرم $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ، ۱ گرم K_2HPO_4 ، ۱ گرم $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۱ گرم NaCl، ۲ گرم CaCO_3 ، ۶/۴ میلی‌گرم $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ، ۱/۱ میلی‌گرم $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۷/۹ میلی‌گرم $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ و ۱/۵ میلی‌گرم $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ در یک لیتر آب مقطر) اضافه و به مدت هفت روز روی شیکر با ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از هفت روز میسلیم‌ها و اسپوره‌های باکتری با استفاده از سانتریفیوژ (دوران ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه)، کاغذ صافی (واتمن شماره یک) و سپس با میکروفیلترهای سرنگی (با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرومتر) از کشت مایع حذف شدند. برای استخراج متابولیت‌های باکتری از محیط کشت مایع بدون باکتری، ترکیب متانول/کلروفرم (۱:۱) به محیط کشت به نسبت (۲:۱) درون ارلن‌مایرهای یک لیتری اضافه شد، و پس از هم‌زدن به مدت یک ساعت روی شیکر با ۱۵۰ دور در دقیقه، مخلوط محیط کشت و حلال‌های استخراج با استفاده از لوله فالکون‌های ۵۰ سی‌سی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (۸۰۰۰ دور در دقیقه) شدند تا حالت دوفاز تشکیل شده و دو فاز آبی و آلی کاملاً از هم جدا شدند. فاز آلی (فاز پایینی مخلوط) و فاز آبی (فاز بالایی مخلوط) پس از جداسازی با استفاده از میکروتیوب، جداگانه توسط روتاری خشک شدند و عصاره‌های خام استخراج شده در میکروتیوب‌ها جمع‌آوری و در فریز با دمای ۱۸- سلسیوس نگهداری شدند و در آنالیزهای بعدی این عصاره‌های خام مستقیماً استفاده شدند [17]، [18].

فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های استخراج‌شده علیه *B. subtilis* و *Stenotrophomonas maltophilia* با روش انتشار دیسک مورد ارزیابی قرار گرفت. دلیل انتخاب این دو باکتری به دلیل مقاومت آن‌ها نسبت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها بود. بدین منظور نصف عصاره خام به دست آمده در ۵۰ میکرولیتر متانول حل شد و ۱۵ میکرولیتر از عصاره متانولی روی دیسک‌های کاغذی استریل (قطر شش میلی‌متر) منتقل شد و پس از خشک‌شدن، دیسک‌های کاغذی روی تشتک‌های محیط کشت نوترینت‌آگار تلقیح شده با سوبه‌های بیماری‌زای ذکر شده (1.5×10^8 CFU/mL) به روش کشت چمنی، قرار داده شد. تشتک‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و پس از ۲۴ ساعت میزان هاله بازدارنده رشد در اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد [19].

شناسایی جدایه های زیست فعال بر اساس توالی 16s rRNA

شناسایی مولکولی جدایه ها با استفاده از توالی 16s rRNA و واکنش زنجیرهای پلی مرز (PCR) انجام شد. DNA ژنومی از کشت تازه جدایه ها روی محیط کشت ISP4 با استفاده از بافر لیز قلیایی استخراج شد و تکثیر توالی 16 rRNA با آغازگرهای 5'-pA(3'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG و 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA) انجام شد [20]. تکثیر ژنوم توسط ژل آگارز ۱ درصد و بافر Tris-Borate-EDTA تایید شد و با استفاده از کیت Mix2Seq خالص سازی و در EUROFINs تعیین توالی شد. توالی های به دست آمده با توالی های مرتبط در ژن بانک مقایسه شدند و با توجه به میزان تشابه و تطابق این توالی ها با توالی های مرجع، شناسایی جدایه ها انجام شد.

خالص سازی و شناسایی ترکیبات ضد میکروبی

باقیمانده عصاره فعال استخراجی در ۱۰۰ میکرولیتر استونیتریل پنج درصد در آمونیوم فرمات (۱۰ میلی مولار) حل شد و ۵۰ میکرولیتر از آن جهت خالص سازی ترکیبات فعال فرکشن گیری شد. جداسازی با استفاده از ستون Spheri-5 RP-C18 (220 mm x 2.1 mm) سیستم AKTA Ettan LC مجهز به آشکارساز UV و جمع کننده فرکشن (Cytiva) FRAC-950 انجام شد. آمونیوم فرمات (۱۰ میلی مولار) و استونیتریل به ترتیب به عنوان فازهای متحرک A و B استفاده شدند. برنامه شستشوی گرادینت از ۵-۱۰۰ درصد حلال B در ۳۰ دقیقه، ۱۰۰ درصد حلال B به مدت ۱۰ دقیقه، ۵ درصد حلال B به مدت ۱۰ دقیقه، با سرعت جریان ۰/۱ میلی لیتر در دقیقه استفاده شد. فرکشن ها طبق پیک های کروماتوگرام جمع آوری و با روتاری خشک شدند. نیمی از هر فرکشن خشک شده در متانول حل شد و فعالیت ضد میکروبی همه فرکشن های جمع آوری شده جهت شناسایی فرکشن های زیست فعال با روش انتشار دیسک بررسی شد. برای شناسایی فرکشن های زیست فعال، ۱۵ میکرولیتر از فرکشن های حل شده در متانول، روی دیسک های کاغذی استریل به قطر شش میلی متر انتقال داده شد و پس از خشک شدن، دیسک ها روی تشتک های محیط کشت نوترینت-آگار و تلقیح شده با باکتری های *B. subtilis* و *Stenotrophomonas maltophilia* به روش کشت چمنی قرار داده شد. تشتک ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و پس از ۲۴ ساعت میزان هاله بازدارنده از رشد در اطراف دیسک ها اندازه گیری شد.

شناسایی ترکیبات ضد میکروبی موجود در فرکشن های زیست فعال

آنالیز طیف سنجی جرمی فرکشن های زیست فعال جهت شناسایی ترکیبات ضد میکروبی، با استفاده از روش ESI-MS (Electrospray ionization mass spectrometry) انجام شد. آنالیز با استفاده از دستگاه Waters Synapt G1 Mass Spectrometer ساخت کشور آمریکا مجهز به یک رابط الکترواسپری و در حالت یون مثبت انجام شد. هشت میکرولیتر از فرکشن های فعال حل شده در استونیتریل ۵۰ درصد حاوی ۰/۱ درصد اسیدفرمیک به پلیت ۹۶ چاهکی انتقال داده و در منبع (Advion) Triverse Nanomate بارگذاری شد. پنج میکرولیتر از نمونه با سرعت جریان پنج میکرو لیتر در دقیقه و ۱/۶ kV به داخل Synapt G1 mass spectrometer الکترواسپری شد. طیف های جرمی MS بین ۱۰۰-۲۰۰۰ m/z به مدت پنج دقیقه اسکن شدند و یون های پیش ساز تولید شده توسط منبع یونش الکترواسپری برای آنالیز MS/MS انتخاب شدند. برای آنالیز MS/MS، Collision Energy برای دستیابی به طیف های جرمی مناسب، بهینه سازی شد.

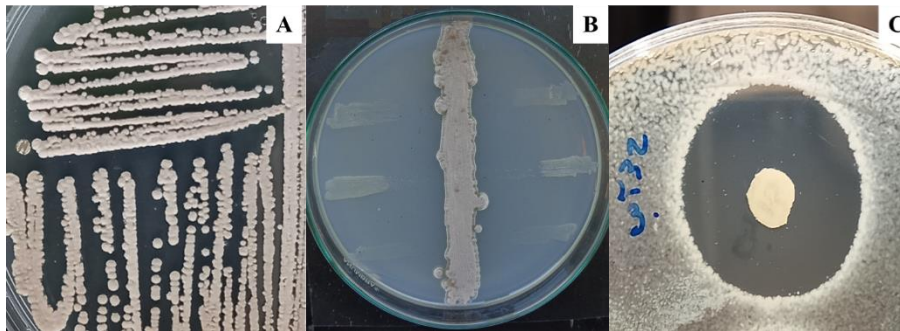
نتایج و بحث

جداسازی جدایه های *Streptomyces* و بررسی فعالیت ضد میکروبی آن ها

در مجموع بر اساس مورفولوژی هفت جدایه متفاوت *Streptomyces* از ریزوسفر گیاهان پونه، شیرین بیان، بومادران و کاسنی جمع آوری شده از منطقه آوزرمان در استان همدان، جداسازی و خالص سازی شدند.

در بررسی اولیه فعالیت ضد میکروبی جدایه ها با استفاده از روش کشت متقاطع، جدایه 3Z (شکل ۱- A) جدا شده از ریزوسفر گیاه پونه (با اسم علمی *Mentha longifolia* (L.)) بیشترین فعالیت بازدارندگی را در تقابل با سویه های بیماریزای گرم مثبت و گرم منفی انتخابی نشان داد و اندازه هاله بازدارندگی از رشد بین یک تا سه سانتی متر بود (شکل ۱- B). محیط کشت BPM3 برای بررسی توانایی جدایه 3Z برای تولید ترکیبات ضد میکروبی در محیط مایع استفاده شد. از مخلوط حلال های متانول/کلروفرم برای استخراج ترکیبات آلی از کشت هفت روزه این جدایه استفاده شد. فاز آلی و آبی از هم جدا و هر کدام جداگانه در روتاری خشک شدند.

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های خام به دست آمده روی باکتری‌های *S. maltophilia* و *B. subtilis* و روش انتشار دیسک نشان داد که عصاره استخراج شده از فاز آبی فعالیت بازدارندگی خیلی قوی تری نسبت به فاز آلی نشان داد و هاله بازدارندگی از رشد در اطراف دیسک کاغذی برای هر دو گونه بیماریزا بیشتر از یک سانتی‌متر بود (شکل ۱- C).



شکل ۱- مورفولوژی جدایه *Streptomyces sp. 3Z* روی محیط کشت ISP4 (A)؛ فعالیت ضد میکروبی جدایه *Streptomyces sp. 3Z* در تقابل با سویه‌های بیماریزای گرم مثبت (*Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* ATCC 25423) و گرم منفی (*Escherichia coli* ATCC 25923، *Pectobacterium atrosepticum*، *Agrobacterium vitis* و *Erwinia amylovora*) روی محیط کشت جامد (B)؛ فعالیت ضد میکروبی عصاره خام استخراج شده از فاز آبی کشت مایع جدایه *Streptomyces sp. 3Z* علیه *Bacillus subtilis* (C)

Figure 1- *Streptomyces sp. 3Z* morphology on ISP4 medium (A); *Streptomyces sp. 3Z* antibacterial activity against Gram-positive (*Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* ATCC 25423) and Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC 25923, *Pectobacterium atrosepticum*, *Agrobacterium vitis* and *Erwinia amylovora*) pathogenic bacteria (B); *Streptomyces sp. 3Z* crude extract antibacterial activity against *Bacillus subtilis* (C)

شناسایی جدایه‌ها

بر اساس بلاست توالی نوکلئوتیدی 16s rRNA، نزدیک‌ترین گونه به جدایه 3Z با ۹۹.۶۰ درصد تشابه توالی به *Streptomyces enissocaesilis* بود. این توالی با شماره دسترسی OR501904 در GenBank ثبت شد (جدول ۱).

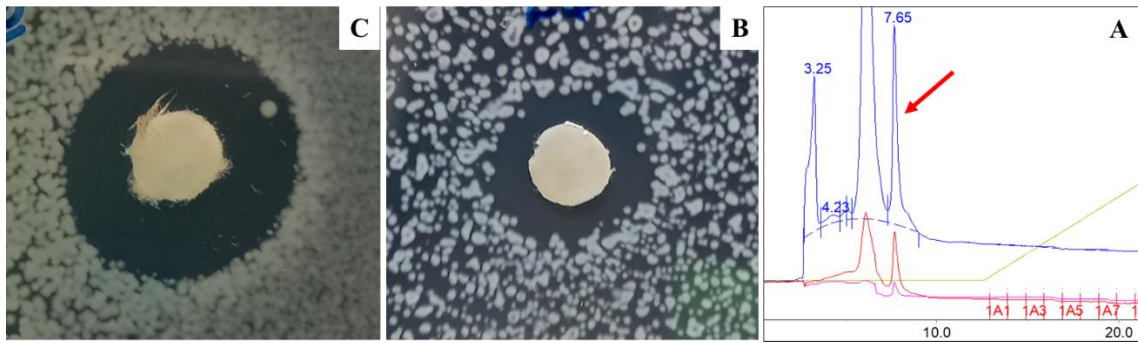
جدول ۱- نتایج BLAST توالی ژن 16s rRNA جدایه 3Z در NCBI

Table 1- BLAST results of 16S rRNA gene sequence of isolate 3Z in NCBI			
GeneBank ID No.	Overlap percentage	Similarity percentage	Species name
OR501904	99 %	99.6 %	<i>Streptomyces enissocaesilis</i>

خالص‌سازی و شناسایی ترکیبات زیست‌فعال

از آنجایی که عصاره استخراجی از فاز آبی فعالیت بازدارندگی قوی تری نسبت به فاز آلی داشت، شست‌وشوی گرادپانت با استفاده از RP-HPLC و ستون C18 جهت جداسازی و خالص‌سازی ترکیبات ضد میکروبی موجود در عصاره استخراجی از فاز آبی استفاده شد. پس از شست‌وشوی گرادپانت، در مجموع ۱۷ فرکشن جمع‌آوری شد و بر اساس تست زیست‌سنجی در نهایت فرکشن اول (جمع‌آوری شده در دقیقه ۷-۸.۲) به عنوان فرکشن فعال و مسئول فعالیت ضد میکروبی جدایه 3Z شناسایی شد (شکل ۲- A).

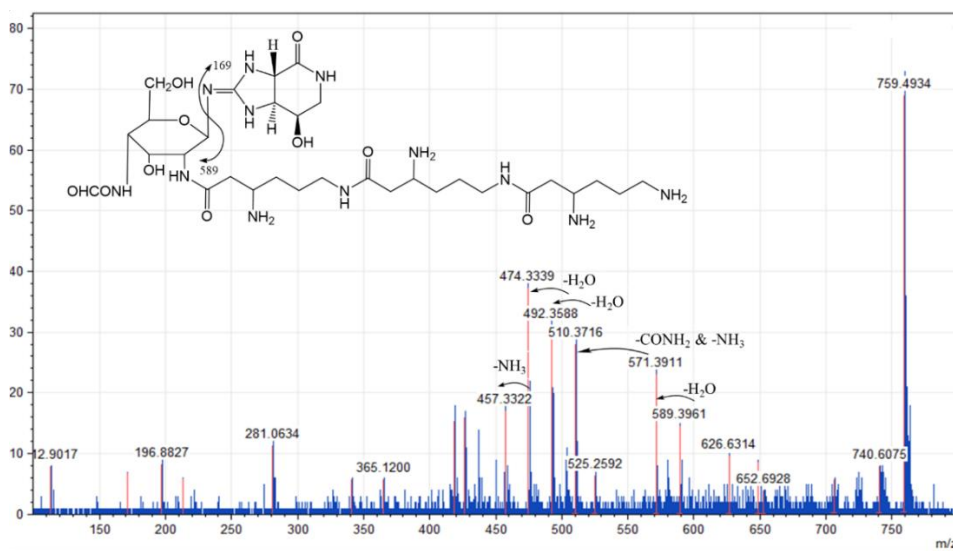
بر اساس نتایج آزمون زیست‌سنجی این فرکشن مانع از رشد *S. maltophilia* و *B. subtilis* شد و قطر هاله باز دارندگی از رشد در اطراف دیسک‌های کاغذی به ترتیب ۹ و ۱۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد (شکل ۲- B و C).



شکل ۲- کروماتوگرام HPLC مربوط به عصاره استخراجی از کشت استرین 3Z *Streptomyces* sp. در محیط کشت مایع BPM3 و پیک/فرکشن زیست فعال شناسایی شده (A)؛ فعالیت ضد میکروبی فرکشن زیست فعال شناسایی شده در تقابل با باکتری های (B) *Stenotrophomonas maltophilia*؛ و (C) *B. subtilis*

Figure 2- HPLC chromatogram of crude extracts of *Streptomyces* sp. 3Z in BPM3 medium and its active peak/fraction (shown by red arrow) (A); Antimicrobial activity of the *Streptomyces* sp. 3Z bioactive fraction against *Stenotrophomonas maltophilia* (B); and *Bacillus subtilis* (C)

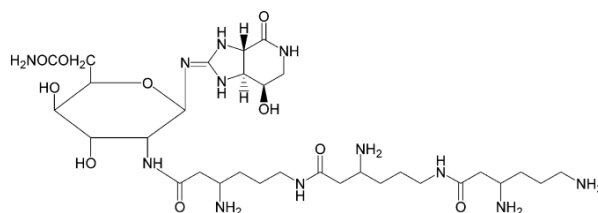
شناسایی ترکیبات موجود در فرکشن فعال با استفاده از Waters Synapt G1 Mass Spectrometer و ESI-MS انجام شد. بر اساس آنالیز طیف سنجی جرمی فرکشن فعال، $759.4934 \text{ m/z} [M + H]^+$ به عنوان پیک اصلی و غالب شناسایی شد و برای آنالیز MS/MS انتخاب شد. اسپکتروم حاصل از آنالیز MS/MS یون پیش ساز 759.4934 m/z با دیتابیس ترکیبات *Streptomyces* (Streptome DB)، کتابخانه اسپکتروم GNPS و اطلاعات منتشر شده در مقالات مقایسه شد. بر اساس این اطلاعات، مشخص شد که این جرم مولکولی مربوط به Streptothricin نوع D است که مسئول فعالیت ضد میکروبی عصاره استخراجی است [21]، [22]، [23]. بر اساس آنالیز طیف سنجی جرمی، پیک 589 m/z در اسپکتروم حاصل از آنالیز MS/MS مربوط به شکسته شدن پیوند کربن ۷-نیتروژن و جدا شدن Streptolidine Lactam (با جرم مولکولی 169 m/z) از ساختار آنتی بیوتیک است. دیگر پیک های موجود در اسپکتروم مربوط به جدا شدن گروه carbamoyl، NH_3 و H_2O از ساختار ترکیب است (شکل ۳) [21].



شکل ۳- آنالیز ESI-MS/MS آنتی بیوتیک (759 m/z) Streptothricin D و ساختار شیمیایی آن
Figure 3- ESI-MS/MS of Streptothricin D ($759 \text{ m/z} [M + H]^+$) with molecular structure

آنتی‌بیوتیک‌های گروه Streptothricin جزو اولین گروه از آنتی‌بیوتیک‌های شناخته شده در اکتینومیست‌ها هستند که به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. این آنتی‌بیوتیک‌ها دارای طیف ضد میکروبی گسترده‌ای هستند و به دلیل ممانعت از سنتز پروتئین‌ها و سمیت سلولی کاربرد محدودی دارند [23]، [24]. ساختار این آنتی‌بیوتیک‌ها از Carbamoyl-Streptolidine Lactam، D-Gulosamine و یک زنجیره β -lysine تشکیل شده‌است و بسته به نوع آنتی‌بیوتیک (A، B، C، D، E، F و X) تعداد واحدهای β -lysine می‌تواند بین یک تا هفت واحد باشد که نوع D آن با فرمول شیمیایی $C_{31}H_{58}N_{12}O_{10}$ دارای زنجیره β -lysine سه واحدی است [25].

اخیرا Ji و همکاران (۲۰۰۷) [22] ایزومر جدیدی از streptothricin D را بنام 12-Carbamoylstreptothricin D با استفاده از آنالیزهای IR، HR-MS و NMR از کشت مایع استریل *Streptomyces qinlingensis* sp. nov گزارش کرده‌اند که دارای جرم مولکولی $[M + H]^+$ ۷۵۹ m/z بوده و از لحاظ ساختاری با Streptothricin D متفاوت است. در ساختار این آنتی‌بیوتیک گروه Carbamoyl به جای کربن-۱۰ به کربن-۱۲ متصل شده است (شکل ۴) [21]، [22]. با توجه به جرم مولکولی یکسان و فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، نمی‌توان مشخص کرد که Streptothricin D تولید شده توسط استرین 3Z از کدام نوع است.



شکل ۴- ساختار شیمیایی 12-Carbamoylstreptothricin D [22]
Figure 4- Chemical structure of 12-Carbamoylstreptothricin D [22]

علاوه بر آنتی‌بیوتیک‌های کلاسیک Streptothricin و ایزومرهای آن (دارای گروه Carbamoyl در کربن-۱۲)، دو گروه دیگر از این آنتی‌بیوتیک‌ها نیز گزارش شده‌اند که شامل Streptothricin acid و 12-Carbamoylstreptothricin acid هستند. این دو گروه، فرم هیدرولیز شده آنتی‌بیوتیک‌های Streptothricin هستند که حاصل شکسته شدن پیوند آمیدی در Streptolidine lactam هستند و دارای فعالیت ضد میکروبی نیز هستند [26]. استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در صنایع پزشکی، غذایی و کشاورزی سبب بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی شده است و با وجود موفقیت در کشف آنتی‌بیوتیک‌ها و پیشرفت در روند تولید آن‌ها، امروزه شناسایی ترکیبات ضد میکروبی جدید یک ضرورت است [27]، [28]. با وجود اینکه گونه‌های *Streptomyces* همچنان برای جداسازی ترکیبات دارویی مورد توجه هستند اما یکی از محدودیت‌ها، بازکشف ترکیباتی است که قبلاً شناسایی و گزارش شده‌اند. از این رو امروزه خیلی از مطالعات روی ژنومیکس این باکتری‌ها و مهندسی ژنتیک با هدف فعال‌سازی خوشه‌های ژنی خاموش متمرکز است [29].

نتیجه‌گیری

گونه‌های *Streptomyces* از موفق‌ترین میکروارگانیسم‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک هستند. در این مطالعه پتانسیل جدایه‌های *Streptomyces* جداسازی شده از ریزوسفر چهار گیاه دارویی در استان همدان مورد مطالعه قرار گرفت و با استفاده از آنالیز طیف سنجی جرمی، تولید Streptothricin D توسط یک جدایه موثر در بازدارندگی جدایه‌های بیماری‌زا تایید شد اما نوع ساختار آن به خوبی مشخص نشد و نیاز به مطالعات بیشتری در این خصوص است. با توجه به پتانسیل بالای ژنومی این باکتری‌ها برای تولید ترکیبات ضد میکروبی، مطالعات ژنومیکس می‌تواند به القا و بیان بهتر خوشه‌های ژنی مسئول سنتز متابولیت‌های ثانویه در این باکتری‌ها کمک کند.

اعلام تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از دانشگاه بوعلی سینا- همدان بدلیل حمایت مالی تشکر و قدردانی بعمل می‌آید.

منابع

- [1] Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.P., Clément, C., Ouhdouch, Y. & Wezeld, G.P.V. (2015). Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. *American Society for Microbiology*, 80 (1), 1–43.
- [2] Challis, G.L. (2008). Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. *Microbiology*, 154 (6), 1555–1569.
- [3] Okada, B.K. & Seyedsayamdost, M.R. (2017). Antibiotic dialogues: Induction of silent biosynthetic gene clusters by exogenous small molecules. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(1), 19–33.
- [4] Atanasov, A.G., Zotchev, S.B. & Dirsch, V.M. (2021). International Natural Product Sciences Taskforce, Supuran CT. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20 (3), 200–216.
- [5] Ian, E., Malko, D.B., Sekurova, O.N., Bredholt, H., Ruckert, C., Borisova, M.E., Albersmeier, A., Kalinowski, J., Gelfand, M.S. & Zotchev, S.B. (2014). Genomics of sponge-associated *Streptomyces* spp. closely related to *Streptomyces albus* J1074: insights into marine adaptation and secondary metabolite biosynthesis potential. *PLOS ONE*, 9 (5), e96719.
- [6] Penn, K., Jenkins, C., Nett, M., Udway, D.W., Gontang, E.A., McGlinchey, R.P., Foster, B., Lapidus, A., Podell, S., Allen, E.E., Moore, B.S. & Jensen, P.R. (2009). Genomic islands link secondary metabolism to functional adaptation in marine *Actinobacteria*. *ISME Journal*, 3 (10), 1193–1203.
- [7] Wang, Y., Yang, D. & Yu, Z. (2023). New lactones produced by *Streptomyces* sp. SN5431 and their antifungal activity against *Bipolaris maydis*. *Microorganisms*, 11 (3), 616.
- [8] Farda, B., Djebaili, R., Vaccarelli, I., Del Gallo, M. & Pellegrini, M. (2022). *Actinomycetes* from caves: an overview of their diversity, biotechnological properties, and insights for their use in soil environments. *Microorganisms*, 10 (2), 453.
- [9] Goodfellow, M. & Williams, S.T. (1983). Ecology of *actinomycetes*. *Annual Review of Microbiology*, 37, 189–216.
- [10] Bekiesch, P., Zehl, M., Domingo-Contreras, E., Martín, J., Pérez-Victoria, I., Reyes, F., Kaplan, A., Rückert, C., Busche, T., Kalinowski, J. & Zotchev, B.Z. (2020). Viennamycins: Lipopeptides produced by a *Streptomyces* sp. *Journal of Natural Products*, 83 (8), 2381–2389.
- [11] Oberhofer, M., Hess, J., Leutgeb, M., Gössnitzer, F., Rattei, T., Wawrosch, C. & Zotchev, B.Z. (2019). Exploring *Actinobacteria* associated with rhizosphere and endosphere of the Nnative alpine medicinal plant *Leontopodium nivale* subspecies *alpinum*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2531.
- [12] Dennis, P.G., Miller, A.J. & Hirsch, P.R. (2010). Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiology Ecology* 72 (3), 313–327.
- [13] Schlatter, D., Fubuh, A., Xiao, K., Hernandez, D., Hobbie, S. & Kinkel, L. (2009). Resource amendments influence density and competitive phenotypes of *Streptomyces* in Soil. *Microbial Ecology*, 57 (3), 413–420.
- [14] Seong, C.N., Choi, J.H. & Baik, K.S. (2001). An improved selective isolation of rare *Actinomycetes* from forest soil. *Journal of Microbiology*, 39 (1), 17–23.
- [15] Shirling, E.B. & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16 (3), 313–340.
- [16] Lemos, M.L., Toranzo, A.E. & Barja, J.L. (1385) Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds. *Microbial Ecology*, 11 (2), 149–163.
- [17] Kibret, M., Guerrero-Garzón, J.F., Urban, E., Zehl, M., Wronski, V.K., Rückert, C., Busche, T., Kalinowski, J., Rollinger, J.M., Abate, D. & Zotchev, S.B. (2018). *Streptomyces* spp. from Ethiopia producing antimicrobial compounds: Characterization via bioassays, genome analyses, and mass spectrometry. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1270.
- [18] Rajeswari, P., Jose, P.A., Amiya, R. & Jebakumar, S.R.D. (2015). Characterization of saltern based *Streptomyces* sp. and statistical media optimization for its improved antibacterial activity. *Frontiers in Microbiology*, 5, 753.
- [19] Bauer, A., Kirby, W.M., Sherris, J. & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45 (4), 493–496.
- [20] Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M. & Bottger, E.C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 17 (19), 7843–7853.
- [21] Ji, Z., Wei, S., Zhang, J., Wu, W. & Wang, M. (2008). Identification of streptothricin class antibiotics in the early stage of antibiotics screening by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Antibiotics*, 61 (11), 660–667.
- [22] Ji, Z., Wang, M., Zhang, J., Wei, S. & Wu, W. (2007). Two new members of streptothricin class antibiotics from *Streptomyces qinlingensis* sp. Nov. *Journal of Antibiotics*, 60 (12), 739–744.

- [23] Van Tamelen, E.E., Dyer, J.R., Whaley, H.A., Carter, H.E. & Whitfield, G.B. (1961). Constitution of the streptolisin-streptothricin group of *Streptomyces* antibiotics. *Journal of the American Chemical Society*, 83 (20), 4295–4296.
- [24] Haupt, I., Jonak, J., Rychlik, I. & Thrum, H. (1980). Action of streptothricin F on ribosomal functions. *Journal of Antibiotics*, 33 (6), 636–641.
- [25] Kusumoto, S., Kambayashi, Y., Imaoka, S., Shima, K. & Shiba, T. (1982). Total chemical structure of streptothricin. *Journal of Antibiotics*, 35 (7), 925–927.
- [26] Hamano, Y., Matsuura, N., Kitamura, M. & Takagi, H. (2006). A novel enzyme conferring streptothricin resistance alters the toxicity of streptothricin D from broad-spectrum to bacteria-specific. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (25), 16842–16848.
- [27] De Lima Procópio, R.E., da Silva, I.R., Martins, M.K., de Azevedo, J.L. & de Araújo, J.M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16 (5), 466–471.
- [28] Aminov, R.I. (2009). The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology*, 11 (12), 2970–2988.
- [29] Rutledge, P.J. & Challis, G.L. (2015). Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nature Reviews Microbiology*, 13 (8), 509–523.