Nova Biologica Reperta 7(1): 55-63 (2020)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.7.1.55

یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۷، شماره ۱، صفحات ۵۵ الی ۶۳ (۱۳۹۹)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

معرفی اکتینوباکترهای مولد اگزوپلیمرهای دارای خاصیت ضدمیکربی از خاک‌های ایران

سوگل توانائیان[۱]، جواد حامدی[۲] و ستاره حقیقت[۱]

[۱]گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران؛ [۲]بخش زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
*مسئول مکاتبات: جواد حامدی، jhamedi@ut.ac.ir

چکیده. اگزوپلیمرها پلیمرهای با وزن مولکولی بالا هستند که توسط برخی میکروارگانیسم‌ها به محیط پیرامونی باکتری ترشح می‌شوند و کاربردهای متنوعی در صنایع غذایی، دارویی، بسته‌بندی، کشاورزی و پزشکی دارند. اکتینوباکترها، میکروارگانیسم‌های ارزشمندی در زیست‌فناوری هستند و بسیاری از داروهای تجاری همانند آنتی-بیوتیک‌ها، آنتی‌اکسیدانت‌ها و ترکیبات سرکوبگر ایمنی توسط این باکتری‌ها تولید شده‌اند. اخیرا توانمندی دیگری از این باکتری‌ها از جمله تولید اگزوپلیمر مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به توانمندی‌های بالای اکتینوباکترها در تولید ترکیبات مختلف و افزایش شیوع بیماری‌های عفونی ناشی از عوامل بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک، هدف این پژوهش ارزیابی توانمندی اکتینوباکترهای بومی ایران در تولید اگزوپلیمر با خاصیت ضدمیکربی بوده است. به این منظور نمونه‌های جمع‌آوری شده پس از تیمار و رقیق‌سازی در محیط ISP2 کشت داده شدند. شناسایی اولیه جدایه‌های خالص شده با روش‌های مورفولوژیک انجام شد. سپس توانایی آن‌ها در تولید اگزوپلیمر با کشت در محیط BHI دارای ۵ درصد سوکروز بررسی شد. اگزوپلی‌ساکارید سویه برتر با استفاده از طیف سنجی فرابنفش-مرئی و FT-IR تحت آزمون قرار گرفت. در نهایت جدایه برتر با روش مولکولی شناسایی شد. از ۱۲۰ جدایه به دست آمده، ۳۸ جدایه توانایی تولید اگزوپلیمر را داشتند و ۶ جدایه برتر توانایی تولید اگزوپلیمر در طیف وزنی ۱۰g/L تا ۱۴ داشته و خواص ضدمیکربی علیه *Staphylococcus aureus*، *Bacillus subtilis* و *Aspergillus niger* نشان دادند. بر اساس نتایج طیف سنجی فرابنفش-مرئی چون اگزوپلی‌ساکارید سویه برتر So41 دارای جذب قابل توجهی در طول موج ۱۹۰-۲۳۰nm و فاقد جذب در طول موج‌های ۲۸۰-۲۶۰ بود، این اگزوپلی‌ساکارید فاقد ناخالصی پروتئینی است و براساس نتایج FT-IR دارای گروه‌های عملکردی هیدروکسیل و کربوکسیل است. بر اساس تحلیل ژن 16S rRNA، جدایه برتر ۹۹/۶۸ درصد مشابهت به سویه *Promicromonospora xylanilytica* دارد.

واژه‌های کلیدی. اکتینوباکترهای کمیاب، پرومیکرومونوسپورا، پلی‌ساکارید، فعالیت ضدباکتری، فعالیت ضدقارچ

Introducing antimicrobial exopolymer-producing actinobacteria from soils of Iran

Sogol Tavanaeian[1], Javad Hamedi [2] & Setareh Haghighat[1]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran; [2]Department of Microbial Biotechnology, School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran
Correspondent author: Javad Hamedi, jhamedi@ut.ac.ir

Abstract. Exopolymers (EPS) are high-molecular-weight polymers secreted by some micro-organisms and have several applications in food, pharmaceutical, packaging and agricultural industries, as well as medicine. Actinobacteria are valuable bacteria in biotechnology and many commercial drugs such as antibiotics, antioxidants and immune-suppressant agents are derived from Actinobacteria. Recently, their other capabilities such as exopolymer production have been taken into consideration. Due to the high potential of actinobacteria in producing various compounds and increased prevalence of infections by antibiotic-resistant pathogens, the aim of the present study was to evaluate the potential of isolated Actinobacteria from various locations of Iran to produce EPS with antimicrobial activity. Appropriate dilutions of the samples were, therefore, cultured in ISP2 medium after treatment. The isolates were primarily identified by morphological tests. Then, their ability to produce EPS was investigated in BHI medium with 5% sucrose. The exopolymers of the most efficient strain were analyzed by UV-visible spectroscopy and FT-IR. Finally, the most efficient isolate was molecularly identified. Of the 120 isolates, 38 were able to produce EPS, and six had significant capability of producing EPS (10-14 g/L) and showed antibiotic activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger*. The EPS of the strain So49 had high

Received 27.06.2018/ Revised 13.05.2019/ Accepted 01.06.2019/ Published 04.04.2020
دریافت ۱۳۹۷/۰۴/۰۶/ اصلاح ۱۳۹۸/۰۲/۲۳/ پذیرش ۱۳۹۸/۰۳/۱۱/انتشار ۹۸/۰۱/۱۶

absorbance in 190-230 nm, but did not have absorbance in 260-280 nm. Therefore, it does not have any protein impurity. The EPS has hydroxyl and carboxyl functional groups, according to FT-IR analysis. 16S rRNA gene analysis showed that the most efficient isolate had 99.68% similarity to *Promicromonospora xylanilytica.*

Keywords: antibacterial activity, antifungal activity, polysaccharide, *Promicromonospora,* rare actinobacteria

مقدمه

پلیمرهای میکربی به پلیمرهای درون سلولی، پلیمرهای ساختاری و پلیمرهای برون سلولی یا اگزوپلیمرها (EPS) تقسیم می‌شوند (Suresh Kumar et al., 2007). اگزوپلیمرها (EPS) پلیمرهای با وزن مولکولی بالا هستند که به دو صورت اگزوپلیمر متصل به سلول (کپسول) و اگزوپلیمر آزاد توسط میکروارگانیسم‌ها به محیط اطراف ترشح می‌شوند (Vijayabaskar et al., 2011). همچنین می‌توان اگزوپلی‌ساکاریدها را براساس ساختار به دو گروه اصلی هوموپلی‌ساکارید و هتروپلی‌ساکارید تقسیم کرد. که در نوع اول فقط یک مونومر وجود دارد و در نوع دوم چندین مونومر سازنده ساختار اگزوپلی‌ساکارید هستند. اگزوپلی‌ساکارید فضای بین باکتری‌ها را پر می‌کند و همراه با پروتئین، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها ترکیب ساختار ماتریکس بیوفیلم را تشکیل می‌دهد و بیوفیلم سلول‌های باکتریایی را از خشکی، حمله فاژ، ترکیبات ضدمیکربی، تنش اسمزی و شکار شدن توسط تک‌یاخته محافظت می‌کند. اگزوپلی‌ساکارید همچنین می‌تواند پروبیوتیک‌ها سبب زنده ماندن باکتری مولد آن در حضور اسید معده و نمک‌های صفراوی شود (Ciszek-Lenda, 2011). میکروارگانیسم‌های تولیدکننده اگزوپلی‌ساکارید در محیط‌های مختلف یافت می‌شوند. محیط‌های دارای نسبت کربن به نیتروژن بالا، مثلاً پساب‌های شکر، کاغذ یا صنایع غذایی محیط‌های مناسبی برای رشد میکروارگانیسم‌های مولد پلی‌ساکارید است (Suresh Kumar et al., 2007).

اگزوپلی‌ساکاریدهای میکربی از اواسط قرن بیستم کاربردهای فراوانی در حوزه درمان یافته‌اند. در ابتدا اگزوپلی‌ساکاریدهای میکربی همانند زانتان یا پولولان به عنوان ترکیبات همراه دارو (excipients) مورد استفاده قرار گرفتند (Moscovici, 2015). از کاربردهای دیگر این اگزوپلی ساکاریدهای میکربی می‌توان به فعالیت‌های افزاینده عملکرد سیستم ایمنی، ضدتوموری، کاهنده فشار خون، کلسترول و ضدانعقاد خون اشاره کرد (Ciszek-Lenda, 2011; Hidalgo-Cantabrana et al., 2014). آلژینات میکربی با فعالیت ضدرفلاکس، پرکننده‌های دندانی یا ماتریکس برای ساخت قرص‌ها (Nwodo et al., 2012; Moscovici, 2015)، هیالورونیک اسید با فعالیت درمان آرتریت و بهبود دهندگی زخم (Kim et al., 2014) و سلولز باکتریایی با کاربرد در پوشش زخم یا داربست‌هایی برای مهندسی بافت از جمله اگزوپلی‌ساکاریدهای میکربی قابل توجه هستند (Lin et al., 2013; Kim et al., 2014). توسعه سیستم‌های رهایش کنترل شده دارو، دریچه ای نوین را برای کاربردهای دارویی برای پلیمرهای میکربی باز کرده است. اگزوپلی ساکاریدهای میکربی و مشتقات آنها حاملین دارویی مطلوب، غیرسمی و قابل تجزیه زیستی هستند. با توجه به موارد فوق اگزوپلی‌ساکاریدهای میکربی می‌توانند نقش قابل توجهی در درمان انواع بیماری‌های متابولیک و سرطان‌ها ایفا کنند (Moscovici, 2015).

با این وجود بخشی از مرگ و میر ایجاد شده به ویژه در کشورهای توسعه نیافته بیماری‌های عفونی در اثر عوامل بیماری-زای مقاوم به دارو رخ می‌دهد (Worthington & Melander, 2013). از این رو کشف ترکیبات غیرسمی و دارای قابلیت تجزیه زیستی که توانایی ضدمیکربی بالایی علیه این پاتوژن‌ها داشته باشند، به شدت حیاتی است (Kumar et al., 2011). بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های تجاری در دسترس، منشا اکتینوباکتریایی دارند (Barka et al., 2016). اکتینوباکترها گروه مهمی از باکتری‌های گرم مثبت با درصد گوانین و سیتوزین بالا در ژنوم خود بوده و بسیاری از آن‌ها قادر به تولید میسیلیوم‌های صاف و یا مواج با قطر حدود یک میکرومتر هستند (Arifuzzaman et al., 2010). اکتینوباکترها توزیع گسترده‌ای در اکوسیستم‌های خاکی و آبی، گیاهان و جانوران دارند. این باکتری‌ها در خاک نقش بسیار مهمی در بازیافت موادزیستی مقاوم به تجزیه مخلوط‌های پیچیده پلیمرها در گیاهان مرده، حیوانات و مواد قارچی ایفا می‌کنند (Goodfellow & Williams, 1983; Stach & Bull 2005). از آنجاکه اکتینوباکترها توانمندی بالایی در تولید ترکیبات درمانی از جمله انواع ترکیبات ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی نشان داده‌اند، احتمال یافتن اکتینوباکتر مولد اگزوپلی ساکاریدهای دارای فعالیت ضدمیکربی می تواند بالا باشد. در جهان توانمندی اکتینوباکترها از نظر تولید اگزوپلی‌ساکارید قبلا تحت بررسی قرار گرفته است (Lee et al., 2010; wu et al., 2010; Manivasagan et al., 2014). با این وجود توانمندی اکتینوباکترهای بومی ایران از نظر توان تولید اگزوپلی‌ساکاریدهای دارای فعالیت میکربی مطالعه نشده است. پژوهش کنونی به منظور ارزیابی توان

اکتینوباکترهای موجود در ایران از نظر تولید اگزوپلی‌ساکارید که فعالیت ضدمیکربی داشته باشند، انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های تحت بررسی از مناطق مختلف شامل خاک‌های جنگلی، کویری و رسوبات دریایی از خلیج فارس در ظروف استریل جمع‌آوری (سال ۱۳۹۶-۱۳۹۵) و در کوتاه‌ترین زمان به آزمایشگاه منتقل شدند. برای جداسازی اکتینوباکترها از تیمارهای مختلف و روش رقیق‌سازی متوالی استفاده شد. پس از رقیق کردن نمونه‌ها، ۱۰۰µL از رقت‌های 10^{-1} و 10^{-2} در محیط کشت ویژه اکتینوباکترها (ISP2)که شامل مالت (۱۰ گرم)، عصاره مخمر (۴ گرم)، گلوکز (۴ گرم)، کلسیم کربنات (۲ گرم)، آگار (۱۵ گرم) در یک لیتر آب دو بار تقطیر در pH ۷/۲±۲ است، کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور گرماگذاری شدند. کلنی‌های برجسته و خشک به عنوان کلنی‌های اکتینوباکتر در نظر گرفته شده و پس از جداسازی بر روی محیط ISP2 آگارکشت داده شدند و با گرماگذاری به مدت ۱۰-۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد خالص و نگهداری شدند (Al-Dhabi et al., 2016).

تعیین ایزومر دی آمینو پایملیک اسید (DAP)

کلنی‌های اکتینوباکتر ظاهر شده در پلیت ISP2 به محیط ISP2 مایع تلقیح شدند و فلاسک‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و شتاب ۱۸۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند. زیتوده باکتری توسط سانتریفیوژ جداسازی شد. حدود ۲۰mg از وزن خشک سلولی با هاون کوبیده و در داخل لوله‌های درپیچ‌دار ریخته شد و به آن هیدروکلریک اسید (۶N) اضافه شده و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت قرار داده شد. زیتوده هیدرولیز شده با استفاده از کاغذ واتمن صاف شد و با کروماتوگرافی لایه نازک با سیستم حلالی آب مقطر – هیدروکلریک اسید- پیریدین- متانول (۸۰:۲۶:۴:۱۰) تفکیک شد. برای مشاهده لکه‌ها از محلول ۰/۱ درصد نین‌هیدرین در استون استفاده شد. نمونه‌های دارای ایزومر-*meso* DAP به عنوان اکتینوباکتر نادر در نظر گرفته شدند و برای مطالعات فراتر انتخاب شدند.

غربالگری اکتینوباکترهای مولد اگزوپلیمر

جدایه‌های حاصل به منظور بررسی توانایی تولید اگزوپلیمر بر روی محیط BHI آگار+ ۵ درصد سوکروز کشت داده شدند و به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. جدایه‌های لزج و دارای قوام کره‌ای با کلنی‌های درشت بر روی محیط BHI آگار حاوی ۵ درصد سوکروز بیش‌تر تحت بررسی قرار گرفتند. این جدایه‌ها در فلاسک‌های ارلن مایر حاوی ۱۰mL میلی‌لیتر محیط BHI مایع + ۵ درصد سوکروز تلقیح شدند. فلاسک‌ها به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند (Khalil et al., 2018).

استخراج اگزوپلیمر

بعد از پایان دوره گرماگذاری، محتوای فلاسک‌ها به مدت ۵ دقیقه در شتاب ۸۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس سه برابر کل محتوای فلاسک‌ها، اتانول سرد به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از گذشت این زمان، محتوای ارلن‌ها در به مدت ۱۰ دقیقه با شتاب g ۱۰۰۰۰سانتریفیوژ شد و پس از حذف حلال، وزن اگزوپلیمر تولید شده توسط هر سویه محاسبه شد (Khalil et al., 2018).

بررسی توانایی فعالیت ضدمیکربی در پلیمر اکتینوباکتریایی

به منظور بررسی اثر ضدباکتریایی اگزوپلی‌ساکاریدهای اکتینوباکتریایی، کشت تازه از سویه‌های میکربی حساس شامل *Escherichia coli* ATCC 8739 و *Staphylococcus aureus* DSMZ 23622 با غلظت معادل ۰/۵ مک‌فارلند تهیه شد و به منظور اطمینان از یکسان بودن کدورت آن‌ها با کدورت ۰/۵ مک فارلند میزان جذب آن‌ها با اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. حدود ۱۰۰ µL از سویه‌های حساس روی محیط مولرهینتون آگار قرار داده شد و با سواب استریل به صورت یکنواخت در سرتاسر پلیت گسترانیده شد. سپس روی هر پلیت چاهک‌هایی با قطر ۱ سانتی‌متر ایجاد شد. ۱۰۰µL از اگزوپلی‌ساکارید حل‌شده در آب (۱۰mg/mL)، درون هر چاهک ایجاد شده تلقیح شد. سپس به منظور انتشار اگزوپلی ساکارید محلول ریخته شده در چاهک در پلیت مذکور، پلیت‌ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس گرماگذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از اتمام مدت گرماگذاری میزان هاله عدم رشد توسط کولیس اندازه‌گیری شد (Jorgensen, 1993).

به منظور بررسی اثر ضدقارچی اگزوپلی‌ساکاریدهای تولید شده توسط جدایه‌های اکتینوباکتریایی بر روی *Aspergillus niger* PTCC 5018 ابتدا غلظت مورد نظر از اگزوپلی‌ساکاریدهای مورد نظر در آب دو بار تقطیر استریل تهیه شد. سپس چاهک‌هایی در پلیت سابرودکستروز آگار ایجاد شد و میزان ۲۰۰ میکرولیتر از محلول اگزوپلی‌ساکاریدی مورد نظر (۱۰mg/mL) در چاهک‌های مذکور ریخته شد. در ادامه یک قطعه از محیط کشتی که بر روی آن سویه *A. niger* PTCC 5018 رشد کرده بود (۱×۱ cm) بر روی محیط در کنار چاهک‌ها قرار داده شد و در نهایت پس از اتمام مدت زمان گرماگذاری (۲۴-۴۸ ساعت) میزان رشد قارچ کشت داده شده در کنار چاهک‌های دارای اگزوپلی‌ساکارید با رشد

قارچ کشت داده شده در کنار چاهک دارای آب دو بار تقطیر استریل (شاهد) مقایسه شد.

بررسی ویژگی‌های ساختاری اگزوپلی‌ساکارید سویه منتخب

به منظور انجام تحلیل‌های طیف سنجی فرابنفش-مرئی و تبدیل فوریه فروسرخ نمونه اگزوپلی‌ساکارید (۱۰mg) استخراج-شده از سویه منتخب در ۵ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر حل شد.

طیف سنجی فرابنفش-مرئی

طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی به‌طور گسترده‌ای برای تحلیل گروه‌های کروموفور اتم‌ها استفاده می‌شود که به‌وسیله انتقالات الکترونی به شدت جذب کننده توصیف می‌شود. در صورت وجود ناخالصی پروتئینی در اگزوپلی‌ساکارید تحت بررسی، در طول موج ۲۸۰ nm جذب مشاهده می‌شود. به این منظور، جذب اگزوپلی‌ساکارید سویه منتخب در طیف ۱۹۰-۹۰۰ nm مورد خوانش قرار گرفت (Castellane et al., 2015).

تحلیل گروه‌های عملکردی

طیف فروسرخ به دست آمده از پلی‌ساکارید خالص طیف جامعی از انواع گروههای عاملی و دیگر مشخصات یک پلی-ساکارید است. برای بررسی خصوصیات ساختاری اگزو پلی-ساکارید استخراج شده از سویه منتخب از روش تبدیل فوریه فروسرخ استفاده شد که گروه‌های عملکردی را مشخص می‌کند. طیف فروسرخ اگزوپلی‌ساکارید سویه منتخب در ناحیه cm^{-1} ۶۰۰-۴۰۰۰ با استفاده از سیستم FT-IR ثبت شد (Kanamarlapudi & Muddada, 2017).

شناسایی مولکولی و تعیین ترادف ژن 16SrRNA

به منظور استخراج DNA، جدایه‌های مورد نظر در فلاسک‌های ارلن مایر ۱۰۰mL حاوی ۱۰mL محیط BHI با pH ۷ ± ۰/۲ تلقیح و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸-۷۲ ساعت گرماگذاری شد. پس از اطمینان از عدم آلودگی و کامل بودن رشد میسلیومی باکتری، زیتوده تهیه شد. مراحل بعدی استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت پویا ژن آزما، ایران) طبق دستورالعمل انجام شد. به منظور بررسی موفق بودن عمل استخراج DNA، الکتروفورز با ژل آگارز ۰/۸ درصد به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. در صورت مشاهده قطعات با حدود ۱۵۰۰ جفت باز در ژل به کمک در دستگاه ژل داک، DNA استخراج شده با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و با استفاده از دو پرایمر F9 و R1541 برای تکثیر ژن 16S rRNA تکثیر شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش و دمای اتصال مربوط به آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است: بررسی محصول PCR، با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد صورت گرفت. ژن تکثیر شده و مشاهده شده روی ژل آگارز برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند (Kumar et al., 2010).

نتایج

از ۱۰۰ نمونه بررسی شده ۱۲۰ جدایه با کلنی و ظاهر شبیه به اکتینوباکترها جدا شدند که از این میان ۷۶ جدایه دارای ایزومر مزو در تست DAP بودند. همان‌گونه که در شکل ۱ نشان داده شده است، در روی کاغذهای TLC، اسید آمینه‌های موجود (به جز دی آمینوپایمیلیک اسید) در محلول هیدرولیز شده حاصل به رنگ بنفش و ارغوانی نمایان شده و جلوتر از لکه‌های DAP حرکت کرده اند. ولی مولکول‌های دی آمینوپایمیلیک اسید (لکه‌های با رنگ سبز مایل به خاکستری) به دلیل قطبیت زیاد Rf پایینی داشته‌اند. ایزومر فرم L در مقایسه با ایزومر *meso*، Rf کمتری داشته است.

بررسی توان تولید اگزوپلی‌ساکارید

در بین ۷۶ جدایه به دست آمده، ۳۸ جدایه توانایی تولید اگزوپلیمر داشتند. در شکل ۲ پلیت مربوط به برخی از سویه‌های مولد اگزوپلیمر بر روی محیط BHI آگار با ۵ درصد سوکروز نشان داده شده است. از ۳۸ جدایه اخیر، ۶ جدایه توانایی تولید اگزوپلیمر بیش‌تری داشتند. این مقدار حدود ۱۰ g/L تا ۱۴ g/L بود (جدول ۲).

ارزیابی فعالیت ضدمیکربی اگزوپلیمرها

نتیجه ارزیابی فعالیت ضدمیکربی و ضدقارچی اگزوپلیمرهای اکتیوباکتریایی به روش ایجاد چاهک نشان داد که از بین ۳۷ اگزوپلیمر، تعداد ۴ و ۳ و ۵ اگزوپلیمر به ترتیب علیه *S. aureus*، *E. coli* و *A. niger* فعالیت ضدمیکربی نشان دادند. از جدایه‌های با توان تولید اگزوپلی‌ساکارید بیش‌تر، جدایه‌های So11، So34 بیش‌ترین هاله عدم‌رشد (۱۹ mm و ۱۸ mm) علیه *E. coli* نشان دادند و جدایه So41 بیش‌ترین هاله عدم‌رشد (۱۵ mm) علیه *A. niger* نشان داد.

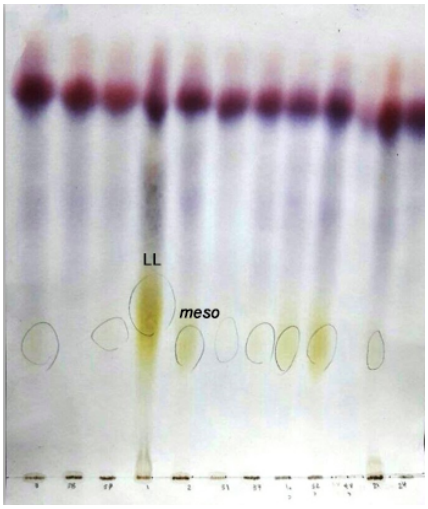
تحلیل ساختاری اگزو پلی‌ساکارید سویه منتخب

طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی به‌طور گسترده‌ای برای تحلیل گروه-های کروموفور اتم‌ها استفاده می‌شود که با انتقالات الکترونی به شدت جذب کننده توصیف می‌شود. طیف جذبی فرابنفش-مرئی اگزوپلی‌ساکارید در مطالعه حاضر در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که مقادیر بالایی از جذب در محدوده فرابنفش وجود دارد. به ویژه بیش‌ترین جذب از ۱۹۰ نانومتر تا ۲۳۰ نانومتر است. محدوده طول موج ۲۳۰-۱۸۰ نانومتر اغلب از انتقالات $n-\sigma^*$ و یا $\pi-\pi^*$ ناشی می‌شود که در بسیاری از گروه‌های عملکردی همانند آمین‌ها، کربوکسیل‌ها، کربونیل‌ها و استرها مشاهده می‌شود. در طیف ۲۸۰-۲۶۰ جذب پرتو دیده نشده است. این جذب به انتقال الکترون $\pi-\pi^*$ در ترکیبات آروماتیک و و پلی‌آروماتیک

جدول ۱- پرایمرهای به کار رفته برای تکثیر ژن 16SrRNA .

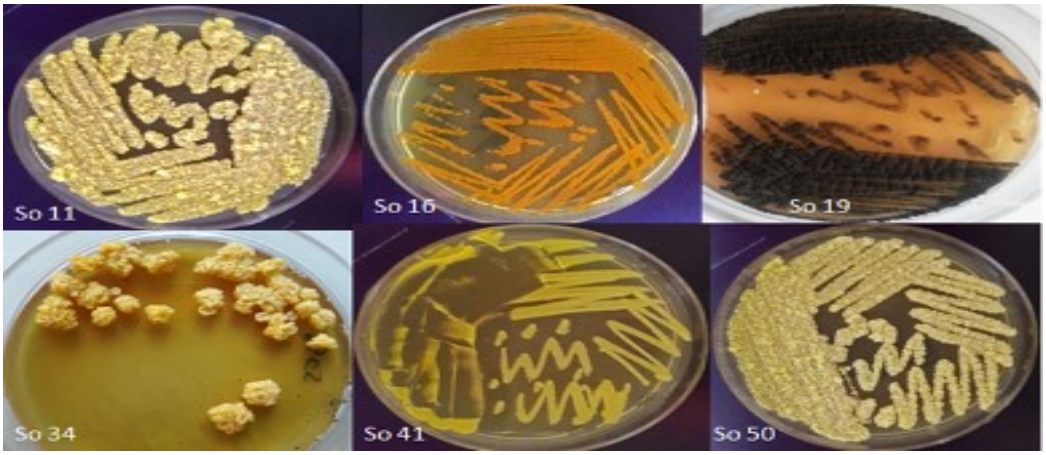
Table 1. The primers used for amplification of 16SrRNA gene.

Primer name	Sequences	Tm (°C)
9F	5'- AAG AGT TTG ATC ATG GCT CAG -3'	60
1541R	5'- AGG AGG TGA TCC ACC CGC A -3'	60



شکل ۱- پلیتTLC برای تحلیل تشخیص نوع ایزومردی‌آمینوپایمیلیک اسید در جدایه‌های اکتینوباکتر. ایزومر نوع L سبک تر از ایزومر نوع *meso* است. دیگر اسیدهای امینه به رنگ بنفش در بالای پلیت دیده می شوند.

Fig. 1. TLC plate for detection of diaminopimelic acid isomer in the actinobacterial isolates. *L* type isomer is lighter than *meso* type isomer. Other amino acids are observed with the purple color on the top of TLC plate.



شکل ۲- کلنی جدایه‌های اکتینوباکتر تولید کننده اگزوپلیمر بر روی پلیت BHI آگار+٪۵ سوکروز

Fig. 2. Colonies of exopolymer-producing actinobacterial isolates on BHI plate+5% sucrose

جدول ۲- میزان تولید اگزوپلیمر در جدایه‌های اکتینوباکتر برتر در محیط BHI + ٪۵ سوکروز

Table 1. Exopolymer-production in more efficient actinobacterial isolates in BHI + 5% sucrose

شماره سویه	میزان اگزوپلی‌ساکارید تولید شده (g/L)
So11	۱۳/۳
So16	۱۱/۴
So19	۱۰/۱
So34	۱۲/۵
So41	۱۴/۰
So50	۱۱/۷

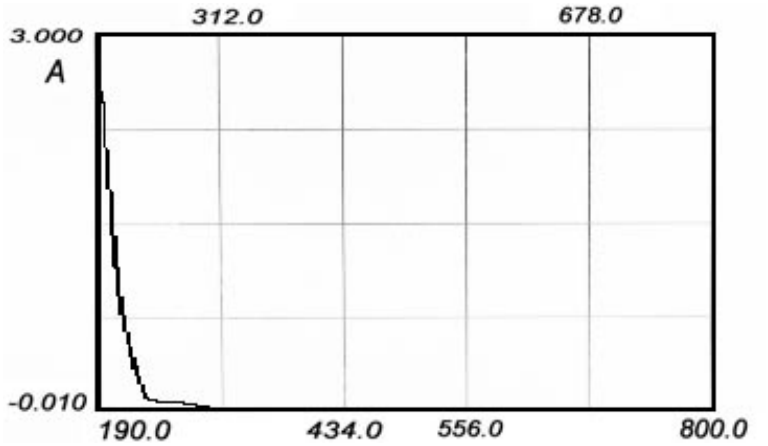
مربوط می‌شود که غالباً در مولکول‌های کانجوگه شامل پروتئین‌ها دیده می‌شود. بنابراین می توان نتیجه گرفت که اگزوپلی‌ساکارید تحت بررسی فاقد ناخالصی پروتئینی است (Bikova & Treimanis, 2004; Jia et al., 2007).

بررسی طیف فروسرخ نیز یکی از روش‌های اطمینان از خلوص پلی‌ساکارید به دست آمده است. در طیف فروسرخ باید تنها قله-های مربوط به پیوندها و گروه‌های عاملی مربوط به پلی‌ساکارید وجود داشته باشند. نتایج مربوط به تحلیل FT-IR در شکل ۴ نشان داده شده است. تحلیل FT-IR طیف متنوع پیک‌های جذبی را از طیف ۱۰۴۵ تا ۳۲۸۳ نشان داد.

روش تبدیل فوریه فروسرخ معمولاً در پلی‌ساکاریدها برای بررسی نوع پیوندهای گلیکوزیدی، نوع مونوساکاریدها و گروه‌های عاملی مورد استفاده قرار می‌گیرد. تحلیل FT-IR نشان داد که اگزوپلی‌ساکارید تحت بررسی به علت دارا بودن پیک جذبی گسترده در اطراف $3272cm^{-1}$ دارای تعداد زیادی گروه‌های هیدروکسیل است، بنابراین، می‌توان حدس زد که پلیمر خالص-شده پلی‌ساکارید است. باندهای مشاهده شده در $2929\ cm^{-1}$، $1620cm^{-1}$، $1407\ cm^{-1}$، $1239\ cm^{-1}$، $1047\ cm^{-1}$ به ترتیب مربوط به پیوندهای C-H، پیوندهای آمیدی (NHCO) و گروه کربوکسیل (C=O)، (C-O)، (C-O-C) است (Suart, 2004).

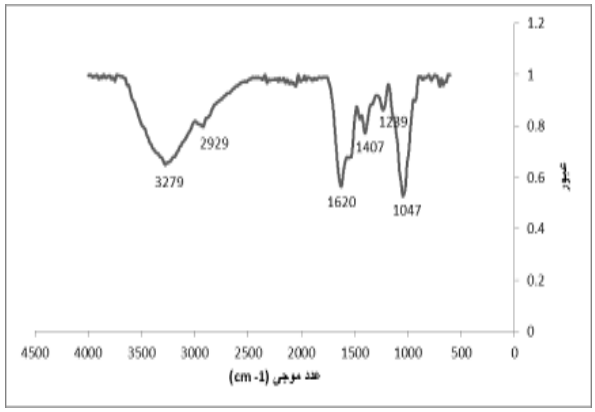
ویژگی‌های سویه منتخب

جدایه So41 با بیش‌ترین تولید اگزوپلیمر و اثر ضدقارچی، جدایه برتر اکتینوباکتریایی در این پژوهش بوده است. این جدایه دارای کلنی زرد رنگ لزج بوده که نتیجه توالی‌خوانی ژن S ۱۶rRNA و بررسی آن با توالی‌های سویه‌های خویشاوند در سامانه EZ-taxon (http://www.ezbiocloud.net/taxonomy)، نشان داد که ۹۹/۶۸ درصد مشابه با سویه *Promicromonospora xylanilytica* است (شکل ۵).



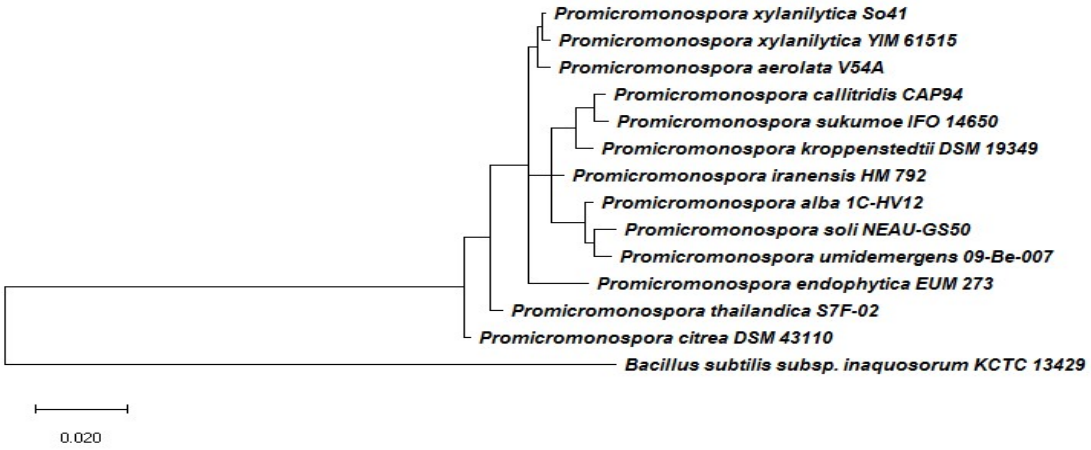
شکل ۳- طیف فرابنفش-مرئی اگزوپلی‌ساکارید تولید شده توسط سویه اکتینوباکتر منتخب (So41).

Fig. 3. UV-visible spectrum of exopolysaccharides produced by the selected actinobacterial strain (So41).



شکل۴- طیف FT-IR اگزوپلی‌ساکارید حاصل از اکتینوباکتر سویه So41

Fig. 4. FT-IR spectrum of exopolysaccharide obtained from the actinobacterium strain So41.



شکل ۵- درخت فیلوژنی سویه so41 بر اساس روش بیش‌ترین احتمال.

Fig. 5. Phylogenetic tree of strain so41 and its neighbors by maximum likelihood method

بحث

امروزه اگزوپلیمرهایی که فعالیت تثبیت‌کنندگی و قوام دهندگی دارند به صورت تجاری توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک تولید می‌شوند. همچنین امولسان تولید شده توسط *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 تجاری شده است. هم‌چنین اگزوپلی‌ساکارید چسبناک دیگری از باکتری *Sphingomonas paucimobilis* با نام ژلان به بازار عرضه شده، که باعث تثبیت و تاثیر بیش‌تر امولسیون‌ها به نسبت صمغ‌های تجاری حاصل از گیاهان مانند صمغ عربی، کارایا و تراگاکانت و صمغ باکتریایی زانتان می‌شود (Suresh Kumar et al., 2007).

علاوه بر امولسان، اگزوپلی‌ساکارید تولید شده توسط باکتری‌های دریایی، به شکل امولسیون‌های پایدار با تعدادی هیدروکربن گزارش شده است که کارآمدتر از امولسیفایرهای موجود در بازار است. از کاربردهای دیگر اگزوپلی‌ساکاریدها می‌توان به حذف فلزات سنگین اشاره کرد. سلول‌های متصل به پلی‌ساکارید تولید شده توسط باکتری دریایی *Zooglea sp.* باعث جذب یون‌های فلزی مانند کروم، سرب و آهن در محلول می‌شود. جذب فلزات سنگین توسط *Enterobacter cloaceae* گزارش شده است (Iyer et al., 2004).

علاوه بر این، اگزوپلی‌ساکاریدها منبع خوبی از مونوساکاریدها هستند، برخی از هوموپلی‌ساکاریدهای خارج سلولی باکتریایی مواد اولیه برای به دست آوردن اجزای مونوساکارید غیر معمول، اما ارزشمند، مانند ال- فوکوز، ال-رامنوز، ال-آلتروز و د-مانوز هستند. زیرا سنتز شیمیایی یا استخراج آن‌ها دشوار، گران و اغلب کم است. گونه‌های *Clavibacter*، کلاوان که غنی از دی-فوکوز است را تولید می‌کنند. کلاوان، پلی‌ساکارید حاوی L-فوکوز، در جلوگیری از تشکیل کلنی توسط سلول‌های تومور ریه، در کنترل شکل‌گیری گویچه‌های سفید خون، در درمان آرتریت روماتوئید، در سنتز آنتی‌ژن‌ها برای تولید آنتی‌بادی نقش دارد. به دلیل کاربردهای متنوع اگزوپلیمرها، پژوهش‌های مختلفی روی آن‌ها انجام شده است و به همین دلیل یافتن اگزوپلیمرهای باکتریایی می‌تواند بسیار امیدوارکننده باشد. در مورد اکتینوباکترها یک گونه اکتینوباکتر دریایی به نام *Streptomyces violaceous* به دست آمد که قادر به تولید پلی‌ساکارید خارج سلولی با قابلیت آنتی‌اکسیدانی و شلات‌کنندگی فلزات بوده است (Manivasagan et al., 2014). همچنین توان تولید اگزوپلی-ساکارید با خاصیت ضدمیکربی در یک بیفیدوباکتریوم پروبیوتیک گزارش شده است (Wu et al., 2010).

ولی گزارش‌های دیگری از توانمندی این باکتری‌ها منتشر نشده است. اگزوپلی‌ساکارید استخراج شده از استارترهای ماست نیز فعالیت ضدمیکربی علیه *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Streptococcus* sp.، *Proteus* spp و *Candida albicans* (۱۵-۲۷) نشان داده است (Ghalem, 2017). در مطالعه‌ای دیگر از ۲۲ سویه اسیدلاکتیک، شامل هشت سویه *Lactobacillus kefiranofaciens*، دو سویه *Lactobacillus kefiri*، هفت سویه *Lactococcus lactis* و پنج سویه *Leuconostocs mesenteroides* از کفیر جداسازی شدند و با توالی یابی 16S rRNA شناسایی شدند. در این میان سویه *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 بیش‌ترین میزان اگزوپلی‌ساکارید (۲/۲ گرم در لیتر در محیط MRS تغییر یافته دارای ۶۰ گرم گلوکز در لیتر) را تولید کرده است. این اگزوپلی‌ساکارید فعالیت ضدمیکربی علیه *Listeria monocytogenes* و *Salmonella enteritidis* نشان داده است. در مقایسه با پژوهش حاضر میزان

تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط اکتینوباکترهای تحت بررسی بیش‌تر است و این امر می‌تواند مزیت مهمی در تولید ترکیبات ضدمیکربی از اگزوپلی‌ساکاریدهای تولید شده توسط اکتینوباکترها باشد (Jeong et al., 2017).

طیف FT-IR اگزوپلی‌ساکارید *Promicromonospora* sp. So41 حضور ساختار پلیمری از کربوهیدرات را آشکار ساخت. یک کشیدگی وسیع در طیف ۳۲۷۹ cm^{-1} نشان‌دهنده گروه‌های هیدروکسیل کربوهیدرات‌ها است. حضور پیک جذبی در طیف ۲۹۲۹ cm^{-1} پیوند C-H نشان دهنده حضور گروه‌های متیل و متیلن است. همچنین باند جذبی در طیف ۱۶۲۰ cm^{-1} نشان‌دهنده حضور پیوند C=O در گروه‌های کربوکسیل است. پیک جذبی در طول موج ۱۰۴۵ نیز نشان‌دهنده حضور C-O-C پیوند گلیکوزیدی است. بر اساس داده‌های به دست آمده از تحلیل طیف FT-IR می‌توان پیش‌بینی کرد که اگزوپلی‌ساکارید سویه دارای گروه‌های عملکردی هیدروکسیل، آلدئید، کتونی و گلیکوزیدی باشد (Suart, 2004).

با وجود پژوهش‌های بسیار در زمینه اگزوپلی‌ساکاریدهای میکربی، پژوهش‌های کمی در زمینه بررسی فعالیت‌های زیستی اگزوپلی‌ساکاریدهای به‌دست آمده از اکتینوباکترها انجام شده است، با توجه به پتانسیل بالای اکتینوباکترها در تولید انواع آنتی بیوتیک‌ها احتمال یافتن اگزوپلی‌ساکارید دارای خاصیت میکربی از این باکتری‌ها بسیار بالا است. این پژوهش برای اولین بار توانسته توانمندی اکتینوباکترها را در تولید اگزوپلی‌ساکارید با خاصیت ضدمیکربی نشان دهد. پژوهش‌های بیش‌تری در دست انجام است تا ساختار اگزوپلیمر و نیز صفات رئولوژیک آن را روشن کند.

سپاسگزاری

از زحمات خانم لیلا پرویزی و خانم فهمیه محمدنیا در اجرای این مطالعه سپاسگزاریم.

REFERENCES

Al-Dhabi, N.A., Esmail, G.A., Duraipandiyan, V., Arasu M.V. & Salem-Bekhit, M. M. 2016. Isolation, identification and screening of antimicrobial thermophilic *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-1 isolated from Tharban hot spring, Saudi Arabia. Extremophiles 20: 79-90.

Arifuzzaman, M., Khatun, M. & Rahman. H. 2010. Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. African J. Biotechnol. 9: 4615-4619.

Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.P., Clément, C., Ouhdouch, Y. & van Wezel, G.P. 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 80: 1-43.

Bikova, T. & Treimanis. A. 2004. UV-absorbance of oxidized xylan and monocarboxyl cellulose in alkaline solutions. Carbohydr. Polym. 55: 315-322.

Castellane, T.C.L., Otoboni A.M.M.B. & Lemos. E.G.d.M. 2015. Characterization of exopolysaccharides produced by rhizobia species. Rev. Bras. Cienc. Solo. 39: 1566-1575.

Ciszek-Lenda, M. 2011. Biological functions of exopolysaccharides from probiotic bacteria. Centr. Eur. J. Immunol. 36: 51-55.

Ghalem, B. R. 2017. Antioxidant and antimicrobial activities of exopolysaccharides from yoghurt starter. – Am. J. Chem. Biochem. Eng. 2: 35-39.

Goodfellow, M. & Williams, S. 1983. Ecology of actinomycetes. Annu. Rev. Microbiol. 37: 189-216.

Hidalgo-Cantabrana, C., Sánchez, B. Milani, C., Ventura, M., Margolles A. & Ruas-Madiedo. P. 2014. Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium* spp. J. Appl. Environ. Microbiol. 80: 9-18.

Iyer, A., Mody K. & Jha, B. 2004. Accumulation of hexavalent chromium by an exopolysaccharide producing marine *Enterobacter cloaceae*. Mar. Pollut. Bull. 49: 974-977.

Jia, S., Yu, H. Lin Y. & Dai Y. 2007. Characterization of extracellular polysaccharides from *Nostoc flagelliforme* cells in liquid suspension culture. Biotechnol Bioprocess Eng. 12: 271-275.

Jeong, D., Kim, D.H., Kang, I.B., Kim, H., Song, K.Y., Kim, H.S. & Seo K.H. 2017. Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 isolated from kefir. Food Control 78: 436-442.

Jorgensen, J. 1993. Antimicrobial susceptibility testing of bacteria that grow aerobically. Infect. Dis. Clin. North. Am. 7: 393-409.

Kanamarlapudi, S.L.R.K. & Muddada, S. 2017. Characterization of exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* CC30. Biomed. Res. Int. 2017: 1-11.

Khalil, E.S., Abd Manap, M.Y., Mustafa, S., Alhelli, A. M. & Shokryazdan., P. 2018. Probiotic properties of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus* strains isolated from Tempoyak. Molecules 23: 398.

Kim, Y., Hong, J.W., Chung, Y.S., Kim, S.W., Cho, Y.W., Kim, J.H., Kim, B.J. & Lee., E.J. 2014. Efficacy and safety of sustained-release recombinant human growth hormone in Korean adults with growth hormone deficiency. Yonsei Med. J. 55: 1042-1048.

Kumar, M.A., Anandapandian, K.T.K. & Parthiban, K. 2011. Production and characterization of exopolysaccharides (EPS) from biofilm forming marine bacterium. Braz. Arch. Biol. Technol. 54: 259-265.

Kumar, V., Bharti, A., Gusain, O. & Bisht, G. S. 2010. An improved method for isolation of genomic DNA from filamentous actinomycetes. J. Sci. Engg. Tech. Mgt. 2: 10-13.

Lee, H.R., Kim, K.K. & Whang, K.S. 2010. Isolation and phylogenetic characteristics of exopolysaccharide producing bacteria in a rhizosphere soil of Medicinal Herbs. Kor. J. Microbiol. 46: 278-285.

Lin, S.P., Calvar, I.L., Catchmark, J.M., Liu, J.R., Demirci A. & Cheng, K.C. 2013. Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. Cellulose 20: 219-2219.

Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K. & Kim, S.K. 2014. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. Microbiol. Res. 169: 262-278.

Moscovici, M. 2015. Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. Front Microbiol. 6: 1012.

Nwodo, U.U., Green, E. & Okoh, A.I. 2012. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. Int. J. Mol. Sci. 13: 14002-14015.

Stach, E. & Bull, A.T. 2005. Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. Antonie van Leeuwenhoek 87: 3-9.

Suart, B. 2004. Infrared spectroscopy: Fundamental and applications. John Wiley & Sons, pp: 137-166.

Suresh Kumar, A., Mody, K. & Jha, B. 2007. Bacterial exopolysaccharides–a perception. J. Basic. Microbiol. 47: 103-117.

Vijayabaskar, P., Babinastarlin, S., Shankar, T., Sivakumar, T. & Anandapandian, K. 2011. Quantification and characterization of exopolysaccharides from *Bacillus subtilis* (MTCC 121). Adv. Biol. Res. 5: 71-76.

Worthington, R.J. & Melander, C. 2013. Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. Trends Biotechnol. 31: 177-184.

Wu, M.H., Pan, T.M., Wu, Y.J., Chang, S.J., Chang, M.S. & Hu., C.Y. 2010. Exopolysaccharide activities from probiotic bifidobacterium: Immunomodulatory effects (on J774A. 1 macrophages) and antimicrobial properties. Int. J. Food. Microbiol. 144: 104-110.

*****

How to cite this article:

Tavanaeian, S., Hamedi, J. & Haghighat, S. 2020. Introducing antimicrobial-exopolymer producing actinobacteria from soils of Iran. Nova Biologica Reperta 7: 55-63. (In Persian).

توانایی‌ان، س.، حامدی، ج و حقیقت، س. ۱۳۹۹. معرفی اکتینوباکترهای مولد اگزوپلیمرهای دارای خاصیت ضدمیکربی از خاک‌های ایران. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۷: ۶۳-۵۵.