مقاله پژوهشی

# بررسی خواص ضد میکروبی متابولیت‌های استخراج شده از سلولزی‌میکروبیوم (*Cellulosimicrobium*)

مرجان صراط نهایی[۱]، سید سعید اشراقی[۲،۱*]، پرویز پاکزاد[۱]، علیرضا زهرائی رمضانی[۳] و مهدی یاسری[٤]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳- گروه بیولوژی و کنترل ناقلین بیماری‌ها، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
٤- گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: سید سعید اشراقی، دکتری تخصصی، saeedeshraghi4@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۹/۲۰ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۲/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۲/۱

**چکیده**

**مقدمه و هدف:** مطالعه حاضر با هدف بررسی خواص ضد میکروبی متابولیت‌های استخراج شده از سلولزی‌میکروبیوم، به منظور درک بهتر پتانسیل آنها به عنوان منبع عوامل ضد میکروبی جدید انجام شد.

**روش کار:** در این مطالعه مشاهده‌ای-تحلیلی، ۵۰ نمونه خاک از مناطق مختلف استان تهران جمع‌آوری شد. بعد از کشت کلنی‌های مشکوک از نظر فنوتیپی و بیوشیمیایی مورد آزمایش قرار گرفته شد. تعیین هویت مولکولی با تکثیر ژن 16S rRNA انجام شد. غربالگری اولیه تولید متابولیت با اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی با روش Cross-Streak Method انجام شد. اثر ضد میکروبی متابولیت استخراج شده با روش انتشار از چاهک و حداقل غلظت مهار رشد مورد سنجش قرار گرفته شد. در نهایت، ترکیب شیمیایی و ماده بالقوه متابولیت از طریق کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و طیف‌سنجی جرمی تعیین شد. در آخر ۵ جدایه سلولزی‌میکروبیوم با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و تأیید هویت مولکولی، شناسایی شد.

**نتایج:** از ۵ جدایه مشکوک به سلولزی‌میکروبیوم، فعالیت ضد باکتری در مرحله غربالگری در یک جدایه به طور قوی مشاهده گردید. سلولزی‌میکروبیوم اثر قوی بر روی اشریشیا کلی و بر روی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین داشت ولی فاقد اثر ضد قارچی بود. ساختار متابولیت مورد نظر با فرمول $C_{14}H_{24}N_2O_7$ از طریق آنالیز کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و طیف سنجی جرمی شناسایی شد.

**نتیجه‌گیری:** یافته‌ها نشان داد که سلولزی‌میکروبیوم می‌تواند منبع امیدوارکننده‌ای برای توسعه عوامل ضد میکروبی جدید باشد.

**واژه‌های کلیدی:** متابولیت‌های استخراج شده، فعالیت ضد باکتریایی، سلولزی‌میکروبیوم، پاتوژن بیمارستانی

## مقدمه

ظهور و گسترش میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به یک تهدید سلامت جهانی تبدیل شده است که منجر به نیاز فوری به توسعه عوامل ضد میکروبی جدید و مؤثر می‌شود (Hutchings *et al.*, 2019). محصولات طبیعی، به ویژه آنهایی که از منابع میکروبی به دست می‌آیند، به دلیل تنوع ساختاری و پتانسیل آنها برای فعالیت‌های بیولوژیکی منحصر به فرد، به عنوان منابع بالقوه ترکیبات ضد میکروبی

جدید توجه روزافزونی را به خود جلب کرده‌اند (Beiranvand *et al.*, 2017; Rezamahalleh *et al.*, 2019; Moghadam Ara *et al.*, 2022).

جنس *سلولزی‌میکروبیوم* (*Cellulosimicrobium*) گروهی از باسیل‌های هوازی گرم مثبت، غیر اسیدفاست، کاتالاز مثبت هستند؛ که به طور گسترده در محیط‌های مختلف از جمله خاک، آب و مواد گیاهی پراکنده هستند (Rowlinson *et al.*, 2006). اهمیت *سلولزی‌میکروبیوم* در تولید مجموعه‌ای از آنزیم‌ها در محیط کشت است که دیواره‌های سلولی گیاه را تخریب می‌کنند و ظرفیت تجزیه زیست توده لیگنوسلولزی را دارند (Ferrer, 2006). مطالعات محدودی به بررسی فعالیت‌های ضد میکروبی گونه‌های *سلولزی‌میکروبیوم* پرداخته‌اند (Park and Shim, 2014)، و طیف کامل ضد میکروبی متابولیت‌های *سلولزی‌میکروبیوم* و مکانیسم‌های عمل آنها تا حد زیادی ناشناخته باقی مانده است. بنابراین، هدف از این مطالعه به دنبال بررسی اثرات ضد میکروبی متابولیت‌های استخراج شده از *سلولزی‌میکروبیوم* بر روی طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری های گرم مثبت و گرم منفی و همچنین قارچ ها بود. به طور کلی، این مطالعه با هدف ارائه یک بررسی جامع از اثرات ضد میکروبی متابولیت‌های استخراج شده از *سلولزی‌میکروبیوم* است. نتایج این مطالعه ممکن است به توسعه عوامل ضد میکروبی جدید و موثر از منابع طبیعی، به ویژه *سلولزی‌میکروبیوم* کمک کند و ممکن است بینشی در مورد مکانیسم‌های عمل این ترکیبات ارائه دهد.

## روش مطالعه

**جداسازی اکتینوباکترها از خاک:** در این مطالعه مشاهده‌ای-تحلیلی، ۵۰ نمونه خاک از ۵ پارک در مناطق مختلف استان تهران (بر اساس منطقه جغرافیایی) با استفاده از بیلچه از عمق ۳ تا ۵ سانتی متری جمع‌آوری شد و درون ظرف مخصوص به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده به مدّت ۷۲-۴۲ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس نمونه‌ها به وسیله هاون خرد و نرم شد. مقدار ۵ گرم از هر نمونه خاک بعد از الک شدن در ارلن با ۴۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل رقیق شد و به مدّت ۳ دقیقه مخلوط شد (رقت $۱۰^{-۱}$). از این رقت ۱ میلی‌لیتر به ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی دیگر اضافه گردید (رقت $۱۰^{-۲}$) و به همین ترتیب تا لوله نهم (رقت $۱۰^{-۵}$) ادامه پیدا کرد. از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط اکتینومایست ایزولاسیون آگار کشت داده شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدّت ۱-۲ هفته انکوبه شد. بعد از این مدّت محیط‌های کشت از نظر حضور کلنی‌های گچی و مشکوک ارزیابی شد. کلنی‌های مشکوک از نظر فنوتیپی و بیوشیمیایی (رنگ آمیزی گرم، رنگ آمیزی پاراشیال اسید فاست، رنگ آمیزی اسید فاست، توانایی رشد در لیزوزیم براث، هیدرولیز کازئین و ...) مورد آزمایش قرار گرفت.

**تعیین هویت مولکولی:** کیت استخراج ژنوم AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit با Cat.No.:K-3032 (AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit Cat. No. K-3032, Bioneer Corporation, Korea) جهت استخراج ژنوم جدایه‌ها استفاده شد. آغازگرهای 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') و 1492R (5'- GGTTACCTTGTTACGACTT -3') برای تکثیر ژن 16S rRNA Primers تهیه شد و محلول استوک آن ساخته شد، محلول کاری برطبق وزن مولکولی، OD و غلظت ارائه شده توسط کمپانی، تهیه شد. توالی آغازگرها و سیکل دمایی واکنش PCR بصورت زیر دنبال شد: ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۲۴۰ ثانیه (۹۴ درجه سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه-۵۴ درجه سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه- ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه) ۳۵ سیکل، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۶۰۰ ثانیه و تکثیر ژن 16S rRNA با پرایمرهای ذکر شده انجام شد (Baio *et al.*, 2013). ترکیب مواد PCR به شرح زیر بود: ۲۵/۵ میکرولیتر (Master mix)، ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۲۱ میکرولیتر آب دیونیزه و ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (غلظت ۱۰ پیکومول) در حجم کلی ۵۰ میکرولیتر. تجزیه و تحلیل محصولات PCR با الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد انجام شد. رنگ آمیزی ژل‌ها به مدّت ۲۰ دقیقه در محلول اتیدیوم و ۳۰ دقیقه در آب مقطر انجام شد. برای بررسی، ژل در دستگاه Transilluminator (Bio Intellectica، کانادا)، اشعه UV با طول موج ۳۲۰ nm قرار داده و عکس از ژل گرفته شد. جهت بررسی اندازه محصولات در یکی از چاهک‌ها مارکر مولکولی لدر ۱۰۰ bp استفاده شد (Baio *et al.*, 2013; Adamian *et al.*, 2021).

**تعیین توالی ژن و ترسیم دندروگرام ژنی:** بعد از خالص سازی برای تمامی نمونه‌های مثبت OD هر یک از نمونه‌ها قرائت شد سپس، ارسال محصول PCR به کمپانی Life BioScience انگلستان جهت تعیین توالی از طریق شرکت سیناکلون با حجم حدود ۲۰ میکرولیتر و غلظت ۳۰ ng/ µl از هر نمونه ارسال شد. توالی سکانس حاصل با نرم افزار Finch TV ورژن 1.4.0 بررسی شد. سپس، سکانس‌ها با یکدیگر Align شد و بخش Consensus برای هر توالی بدست آمد. پس از این بررسی‌ها برای بررسی‌های فیلوژنتیکی تمامی سکانس‌های ثبت شده این ژن را از بانک اطلاعاتی NCBI دانلود و برای بررسی‌های فیلوژنتیکی با نرم افزار Mega 7 با فرمت FAST A ذخیره شده و تمامی سکانس ها وارد نرم افزار گردید. تفاوت تعداد نوکلئوتیدها بین سویه‌ها، تغییرات در سطح آمینواسید، ترسیم درخت (دندروگرام) ژنی و

مشخص کردن تیپ‌های سکانس با استفاده از نرم افزار MEGA 7 انجام شد. برای هر یک از ژن‌ها، توالی‌های نوکلئوتیدی توسط شرکت ارائه دهنده خدمات تعیین توالی به صورت یک فایل کامپیوتری به نام کروماتوگرم ارسال شد. دو انتهای سکانس که کیفیت پیک‌ها پایین بود، حذف گردید و مابقی مورد آنالیز سکانس قرار گرفته شد (Baio *et al.*, 2013; Rhmanian *et al.*, 2022).

**استخراج و بررسی فعالیت متابولیت:** در غربالگری اولیه، جهت بررسی وجود متابولیت ضد میکروبی در جدایه‌های اکتینومایست ابتدا به روش Cross-Streak Method جدایه مورد آزمایش را در نیمی از پلیت محیط نوترینت اگار کشت داده و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ روز انکوبه شد. پس از رشد کلنی عمود بر آن میکروب پاتوژن مورد نظر با کدورت ۰/۵ مک فارلند کشت داده شد و محیط‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه گرماگذاری شد و نتایج به صورت مشاهده عدم رشد در اطراف کلنی اکتینومایست ثبت شد (Torok, 2003).

پس از غربالگری اولیه، جدایه‌هایی که دارای اثرات ضد میکروبی بودند، در ارلن حاوی ۲۵۰ میلی لیتر محیط مایع مغذی BHI براث به صورت لوپ پر کشت داده شد و محیط در شیکر انکوباتور با دور rpm ۱۵۰ در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز انکوبه شد. پس از آن ۱۰ درصد از حجم این محیط را به ارلن دیگری که حاوی۲۵۰ میلی لیتر محیط کشت عصاره مخمر-مالت (YEME) است، منتقل شد و ارلن در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز در دور rpm ۲۰۰ قرار داده شد. سپس محیط مایع در دور rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و محلول رویی جدا شد و به نسبت ۱:۱ با اتیل استات در قیف دکانتور مخلوط و ۱ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. پس از تشکیل دو لایه فاز اتیل استاتی را جدا و تحت فشار و حرارت با دستگاه روتاری حلال خارج و ماده بر جا مانده به صورت رسوب نهایی که دارای متابولیت هدف است استخراج شد (Kavitha *et al.*, 2009). جهت تخلیص بهتر متابولیت از دستگاه HPLC با ستون semi-perparative با مشخصات ۲۵۰×۱۰ میلی متر به همراه متانل/آب (۲۰/۸۰) تحت طول موج ۲۲۰-۲۸۰ نانومتر، استفاده شد.

**تعیین اثر ضد میکروبی متابولیت استخراج شده:** اثرات ضد میکروبی عصاره متابولیت استخراج شده با روش انتشار از چاهک بررسی شد. استاندارد ۰/۵ مک فارلند از باکتری‌های مورد استفاده در این مطالعه (*اشریشیا کلی* ATCC*25922*، *پسودوموناس آئروژینوزا* ATCC*27853*، *کلبسیلا پنومونیه* ATCC*700603*، *شیگلا سونئی* RI366، *سالمونلا تایفی‌موریوم* ATCC *14028*، *انتروکوکوس فکالیس* ATCC*51299*، *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC*25923*، *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین ATCC*33591*، *باسیلوس سرئوس* ATCC*11778*، *آسپرژیلوس نایجر* ATCC*1015* ، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* ATCC*1022*)، تهیه و بر روی پلیت‌های مولر-هینتون آگار کشت داده شد. سپس چاهکی به قطر ۶ میلی متر بر روی صفحات آگار پانچ شد و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت روتاری شده کشت *اکتینومایست* را داخل چاهک ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای باکتری‌های پاتوژن و ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدّت ۴۸ ساعت برای قارچ‌ها انکوبه شد (جهت قارچ‌ها از مولر هینتون آگار حاوی ۲ درصد گلوکز استفاده شد). از اثرات مهاری سوپرناتانت جدایه‌ها بر روی قارچ‌های رشته‌ای و تعیین درصد مهار رشد استفاده شد به طوری که بعد از انکوباسیون محیط کشت حاوی قارچ رشته‌ای در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴ روز محلول را روی قیف جداسازی و وزن مرطوب رسوب قارچی را اندازه گیری شد و وزن فویل از آن کسر شد نتیجه وزن مرطوب بدست آمد پس از آن فویل در فور ۸۰ درجه قرار داده شد و پس از ۳ ساعت وزن خشک قارچ اندازه گیری شد. تمام مقادیر را از وزن فویل کسر تا وزن خشک و مرطوب بدست آمد برای نمونه کنترل و نیز دارای رقت سوپرناتانت این کار انجام شد. سپس طبق فرمول ۱ میزان X به عنوان درصد رشد قارچ بدست آمد و پس از آن درصد مهار با کسر درصد رشد از عدد ۱۰۰ بدست آمد (Ramazani *et al.*, 2013; Tanvir *et al.*, 2016).

**فرمول ۱.** وزن خشک کنترل ضربدر X = وزن خشک تیمار ضربدر۱۰۰

هاله عدم رشد در اطراف هر چاهک به میلی متر ثبت شد. قدرت مهاری هر جدایه به صورت ۱+ به عنوان ضعیف، ۲+ متوسط و ۳ + به عنوان قوی در نظر گرفته شد (Ramazani *et al.*, 2013; Tanvir *et al.*, 2016).

**تعیین MIC متابولیت‌های دارای اثر ضد میکروبی:** تعیین MIC به روش میکرودایلوشن انجام شد. کدورت رشد میکروارگانیسم هدف در طول موج مشخص(۶۲۰ نانومتر) تعیین شد. از غلظت ۱۰۲۴ میکروگرم برمیلی لیتر متابولیت تغلیظ شده به عنوان استوک استفاده شد. ۵۰ میکرولیتر از محیط مولر هینتون براث را داخل چاهک‌های میکروپلیت که دارای ۱۲ چاهک است ریخته شد، سپس ۵۰ میکرولیتر از استوک متابولیت را داخل چاهک اول ریخته شد و پس از پی پتینگ با سمپلر از آن وارد چاهک دوم و در نهایت تا چاهک ۱۰ رقت سازی انجام شد. چاهک ۱۱ کنترل عدم رشد و چاهک ۱۲ کنترل رشد در نظر گرفته شد. پس از رقت سازی به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون $10^5$ میکروارگانیسم پاتوژن مورد آزمایش اضافه شد و پلیت‌ها را در دمای اپتیمم رشد هر میکروارگانیسم گرماگذاری شد. پس

از گرماگذاری چاهک‌ها بررسی و آخرین چاهک فاقد رشد (چاهک قبل از چاهک کدورت) به عنوان کمترین غلظت مهار کننده رشد (MIC) در نظر گرفته شد (Ramazani *et al.*, 2013).

**سنجش فعالیت باکتریوسیدال متابولیت در حضور سرم تازه:** اثرات باکتریوسیدال هر متابولیت با استفاده از غلظت تعیین شده در روش میکرودایلوشن در سرم تازه خرگوش مورد آزمایش قرار داده شد. به عنوان کنترل از جنتامایسین استفاده شد. در محیط LB حاوی ۲۰ درصد سرم تازه خرگوش و غلظت ۶۴ میکروگرم / میلی لیتر متابولیت و جنتامایسین به میزان $۱۰^{۶}$ سلول بر میلی لیتر از باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* تلقیح شد و به مدت ۵ ساعت در شیکر انکوباتور ۳۷ درجه قرار شد. سپس جذب سلول‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری انجام شد و منحنی رشد باکتری در حضور جنتامایسین و متابولیت استخراج شده ترسیم شد. لوله کنترل فاقد متابولیت و جنتامایسین ولی دارای باکتری نیز مورد آزمایش قرار داده شد (Aoki *et al.*, 1976).

**سنجش پایداری متابولیت استخراج شده:** جهت این آزمایش از دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و نیز از پروتئیناز K (۵۰ میلی گرم برمیلی لیتر) استفاده شد. متابولیت استخراج شده را به مدت ۳۰ دقیقه تحت تاثیر این دو قرار داده و سپس اثر ضد میکروبی آن با اندازه گیری هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها بر روی پاتوژن مورد نظر که در غربالگری اثر ضد میکروبی متابولیت مشاهده شده بود اندازه گیری شد (Rana and Salam, 2014).

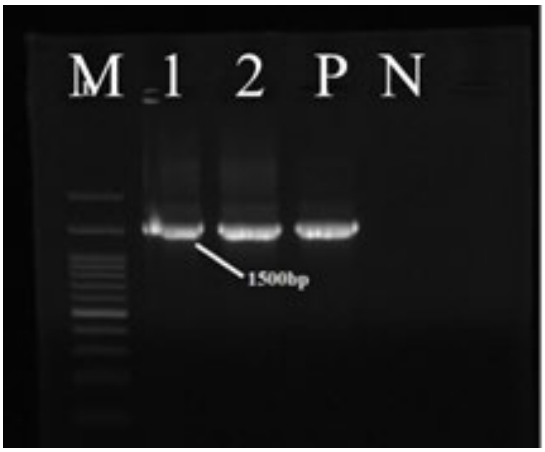
**تعیین ترکیب متابولیت ضد میکروبی استخراج شده:** پس از جداسازی میکروارگانیسم‌ها و کشت خالص و مشاهده اولیه اثرات ضد میکروبی آنها و استخراج متابولیت هدف، رسوب متابولیت را جهت تعیین حضور ترکیب آلی و سپس جهت تعیین ساختار و فرمول تقریبی شیمیایی متابولیت طبق شرایط انجام آزمایش از دستگاه Mass Spectra استفاده شد (Torok, 2003).

## نتایج

**اکتینومایست‌های جداسازی شده از کشت اولیه:** جمع آوری کلنی‌های مشکوک به اکتینومایست جدا شده از نمونه های خاک انجام گرفت. در فاصله زمانی فروردین ۱۳۹۷ تا پایان اسفند ماه ۱۳۹۸، تعداد ۵۰ نمونه خاک از مناطق مختلف استان تهران جمع‌آوری شد. کلنی‌های سفید گچی روی محیط سابورودکستروز آگار و با رنگ آمیزی گرم کوکوباسیل‌های گرم مثبت، با اشکال شاخه شاخه جداسازی و نگهداری شدند. با آزمایش‌های مرسوم بیوشیمیایی همچون احیاء نیترات، هیدرولیز اوره، هیدرولیز گزانتین، هیدرولیز تایروزین، مصرف کربوهیدرات‌ها، مصرف سیترات و ... گونه‌های *اکتینومایست* مشخص گردید. در نهایت، ۵ جدایه *سلولزی‌میکروبیوم* بدست آمد.

**نتایج حاصل از PCR تعیین جنس و گونه:** بر اساس واکنش 16S RNA PCR و الکتروفورز محصول واکنش و مشاهده قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی و ارسال محصول واکنش جهت توالی‌یابی و نتایج توالی‌یابی نمونه‌ها و همردیف سازی توالی‌ها و بررسی آنها در سایت NCBI و با استفاده از نرم افزار Mega 7 در نهایت ۵ جدایه *سلولزی میکروبیوم* از یک گونه شاخص بدست آمد (شکل ۱).

**نتایج غربالگری و شناسایی جدایه‌های مولد متابولیت فعال زیستی:** از ۵ جدایه مشکوک به *سلولزی‌میکروبیوم* مختلف ازنمونه خاک فعالیت ضد باکتری در مرحله غربالگری در یک جدایه *سلولزی‌میکروبیوم* به طور قوی مشاهده گردید. این جدایه اثرات موثری بر روی باکتری‌های پاتوژن‌های مورد مطالعه داشت ولی هیچ نوع اثری بر روی قارچ‌های رشته‌ای نداشت و در روش Cross-Streak باعث مهار رشد پاتوژن‌های باکتریایی مورد مطالعه شد.




**شکل ۱.** الکتروفورز محصول PCR قطعه 16S rRNA، قطعه مورد نظر ۱۵۰۰جفت باز می‌باشد. در تصویر M، مارکر، P، کنترل مثبت و N، کنترل منفی و اعداد ۱-۲ ایزوله‌های مجهول

**نتایج تعیین اثرات ضد میکروبی به روش انتشار چاهک:** در روش بررسی اثرات ضد میکروبی سوپرناتانت کشت به یکی از روش‌های انتشار به نام چاهک فعالیت ضد میکروبی بر علیه پاتوژن‌های مطرح بیمارستانی با اندازه‌گیری هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها بدست آمد. معیار قضاوت کمی هاله عدم رشد به ترتیب چاهک‌های فاقد اثر صفر، چاهک‌های دارای هاله عدم رشد بین ۶ تا ۱۰ میلیمتر فعالیت ضعیف ۱+، هاله ۱۰ تا ۱۵ میلی‌متر فعالیت متوسط ۲ +، هاله

بیشتر از ۱۵ میلی‌متر فعالیت قوی ۳+ در نظر گرفته شد. در این روش *سلولزی‌میکروبیوم* اثرات ضد میکروبی مناسبی را بر علیه پاتوژن‌های بیمارستانی مورد مطالعه نشان دادند؛ که در این میان، اثر قوی بر روی *اشریشیا کلی* نشان دادند. همچنین این جدایه دارای اثر ضد میکروبی قوی بر روی MRSA بود ولی فاقد اثر ضد قارچی بر روی *کاندیدا آلبیکنس*، *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* بودند و همچنین اثری روی *انتروکوکوس فکالیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نداشتند (جدول ۱).

**نتایج تعیین MIC متابولیت استخراج شده:** فعالیت‌های ضد باکتریایی ترکیبات فعال زیستی جدایه *سلولزی‌میکروبیوم* از نظر MIC در جدول ۲ نشان داده شده است. اثرات ضد میکربی متابولیت *سلولزی‌میکروبیوم* در مورد سویه *استافیلوکوکوس* مقاوم به متی‌سیلین دیده شد متابولیت *سلولزی‌میکروبیوم* اثرات ضد باکتریایی قوی از خود بروز داد. این متابولیت فقط بر روی *انتروکوکوس فکالیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بی اثر بود.

**جدول ۱.** فعالیت ضد میکروبی فاز سوپرناتانت کشت بر علیه پاتوژن‌های مطرح بیمارستانی

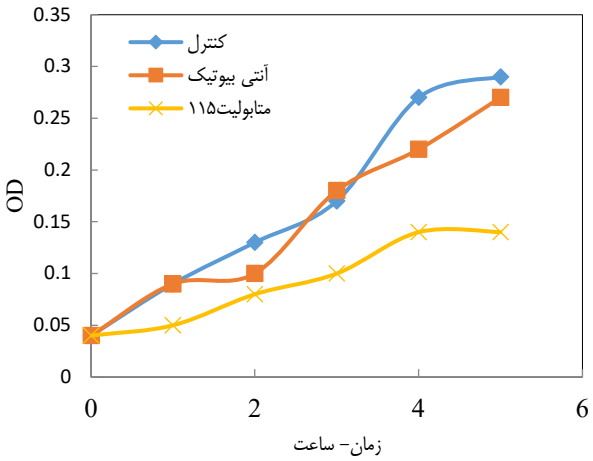
| جدایه *سلولزی‌میکروبیوم** | جدایه‌های تست پاتوژن |
|---|---|
| +۳ | *E.coli ATCC25922* |
| +۳ | *P. aeruginosa ATCC27853* |
| +۲ | *K. pneumoniae ATCC700603* |
| +۱ | *S. sonnei RI366* |
| +۲ | *S. typhimurium ATCC 14028* |
| ۰ | *E. fecalis(VRE) ATCC51299* |
| ۰ | *S. aureus ATCC25923* |
| +۳ | *MRSA ATCC33591* |
| +۲ | *B. cereus ATCC11778* |
| ۰ | *C. albicans ATCC10231* |
| ۰ | *A. niger ATCC1015* |
| ۰ | *A. fumigatus ATCC1022* |

* بدون اثر صفر، هاله بین ۶ تا ۱۰ میلیمتر فعالیت ضعیف ۱+، هاله ۱۰ تا ۱۵ میلیمتر فعالیت متوسط ۲+، هاله بیشتر از ۱۵ میلیمتر فعالیت قوی ۳+ در نظر گرفته شد.

**جدول ۲.** کمترین غلظت مهارکنندگی فاز سوپرناتانت کشت خشک شده جدایه *سلولزی میکروبیوم* بر علیه جدایه‌های پاتوژن مورد مطالعه (بر حسب µg/ml±SD)

| جدایه *سلولزی میکروبیوم* | جدایه‌های پاتوژن تست |
|---|---|
| ۶±۳/۴۶۴ | *E.coli ATCC25922* |
| ۵/۳۳±۲/۳۰۹ | *P. aeruginosa ATCC27853* |
| ۶/۶۷±۲/۰۲۶ | *K. pneumoniae ATCC700603* |
| ۸±۰ | *S. sonnei RI366* |
| ۱/۶۷±۰/۵۷۷ | *S.* Typhimurium *ATCC* 14028 |
| - | *E. fecalis(VRE) ATCC51299* |
| – | *S. aureus ATCC25923* |
| ۶۴±۰ | *MRSA ATCC33591* |

**نتایج سنجش فعالیت باکتریوسیدال متابولیت در حضور سرم:** فعالیت باکتریوسیدال جنتامایسین و متابولیت استخراج شده از *سلولزی‌میکروبیوم* در حضور سرم تازه خرگوش طبق نمودار ۱ مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بررسی نشان داد جنتامایسین در این شرایط اثر کاهشی نشان می‌دهد و لذا فعالیت متابولیت *سلولزی‌میکروبیوم* در حضور سرم در مدت زمان ۵ ساعت کاهشی نشان نداد و باعث مهار *سودوموناس آئروژینوزا* در این مدت شدند.




**نمودار ۱.** سنجش اثرات سوپرناتانت کشت *سلولزی‌میکروبیوم* منتخب در مقایسه با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین بر رشد *سودوموناس آئروژینوزا*

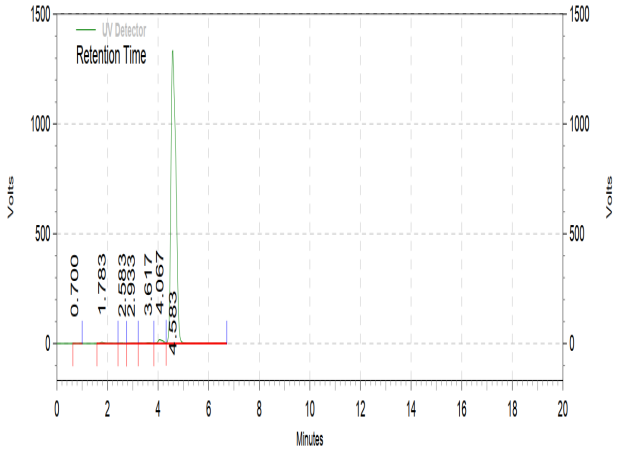
**نتایج سنجش پایداری متابولیت:** از نظر پایداری در حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد و در مجاورت پروتئیناز K ، این متابولیت فعالیت ضد میکروبی خود را حفظ کرد و تغییرات مشهودی در هاله عدم رشد بر علیه میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش طبق جدول ۳ مشاهده نگردید.

**جدول ۳.** فعالیت ضد میکروبی فاز سوپرناتانت کشت بر علیه پاتوژن‌های منتخب تیمار شده با حرارت و پروتئیناز K

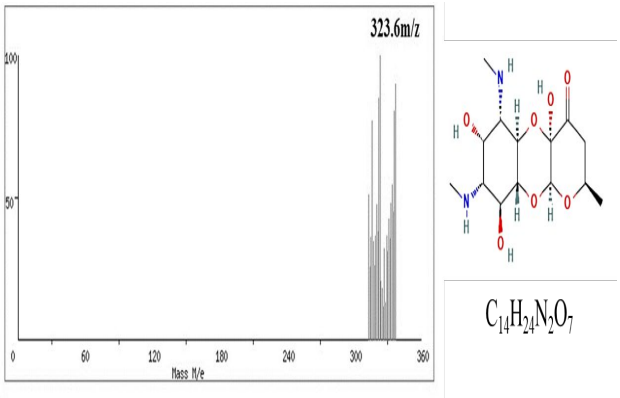
| سوپرناتانت جدایه *سلولزی‌میکروبیوم** | جدایه‌های پاتوژن تست |
|---|---|
| +۳ | *E.coli ATCC25922* |
| ۰ | *S. aureus ATCC25923* |
| ۰ | *A. niger ATCC1015* |

* بدون اثر صفر، هاله بین ۶ تا ۱۰ میلیمتر فعالیت ضعیف ۱+، هاله ۱۰ تا ۱۵ میلیمتر فعالیت متوسط۲+، هاله بیشتر از ۱۵ میلیمتر فعالیت قوی ۳+ در نظر گرفته شد

**نتایج شناسایی تقریبی متابولیت فعال زیستی:** سوپرناتانت جدایه *سلولزی‌میکروبیوم* همان طور که درکروماتوگرافی مایع (HPLC) مشاهده می‌گردد در طول موج ۲۵۴ نانومتر اجزای نمونه عصاره اتیل استاتی با شویش فاز متحرک (متانول:آب به نسبت ۸۰:۲۰) از ستون C18 خارج شدند که به غیراز پیک حلاّل اتیل استات (۲/۹۶ دقیقه با فراوانی ۵۴/۵ درصد) متابولیت فعال زیستی در زمان بازداری ۴/۵۸۳ دقیقه با فراوانی۲۴/۳ درصد جداسازی شد (شکل ۲). جهت شناسایی وزن مولکولی و پیش گویی ساختار تقریبی مولکولی به دستگاه طیف سنج جرمی تزریق گردید. طبق تصویر ۳، آخرین سیگنال بدست آمده m/z ۳۲۳/۶ می‌باشد که از نظر تشابه وزن مولکولی ترکیبات به ترکیب$C_{14}H_{24}N_2O_7$ شباهت نشان داد. طبق شکل‌های ۲ و ۳ با آنالیز فیلوژنی و بررسی‌های مولکولی جدایه *سلولزی‌میکروبیوم*، *Cellulosimicrobium* sp. Strain 71-1 بود.

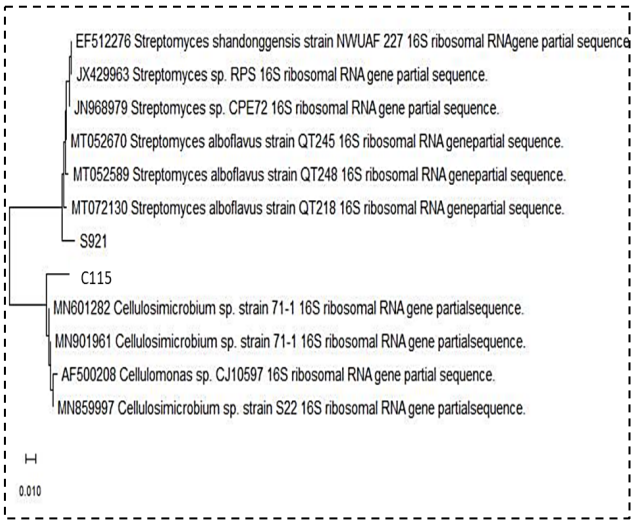



**شکل ۲.** آنالیز کروماتوگرافی HPLC سوپرناتانت جدایه *سلولزی‌میکروبیوم*




**شکل ۳.** آنالیز طیف سنجی جرمی سوپرناتانت جدایه *سلولزی‌میکروبیوم*. سیگنال مورد مشاهده در محدوده m/z ۳۲۳/۶ می‌باشد. فرمول بسته تقریبی متابولیت ($C_{14}H_{24}N_2O_7$) می‌باشد.

شکل ۴ بررسی ارتباط فیلوژنی جدایه منتخب سلولزی میکروبیوم مولد متابولیت ضد میکروبی با استفاده از توالی ژن ۱۶S rRNA و همردیف‌سازی با نرم افزار Mega 7 و رسم درختچه فیلوژنی به روش Neighbor-joining را نشان می‌دهد.




**شکل ٤.** بررسی ارتباط فیلوژنی جدایه منتخب سلولزی میکروبیوم (C115 اشاره به سلولزی میکروبیوم دارد) با استفاده از توالی ژن 16S rRNA و همردیف سازی با نرم افزار Mega 7 و رسم درختچه فیلوژنی به روش Neighbor-joining

## بحث

در مطالعه حاضر تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی HPLC ساختار متابولیت مورد نظر را با فرمول $C_{14}H_{24}N_2O_7$ نشان داد. تا آنجا که می‌دانیم، این مطالعه برای اولین بار متابولیتی با اثر ضد باکتریایی را شناسایی نموده است. $C_{14}H_{24}N_2O_7$ ترکیبی است که به اسم اسپکتینومایسین شناخته می‌شود که برای اولین بار در سال ۱۹۶۲ از

*استرپتومایسس اسپکتابیلیس* جدا شد (Holloway, 1982). اسپکتینومایسین آنتی‌بیوتیکی با طیف وسیع است که معمولاً باکتریواستاتیک است، اما ممکن است علیه برخی از عوامل بیماری‌زا، به ویژه *نایسریا گونوره*، باکتری کش باشد (Ward, 1977). در مطالعه Yeon Park و همکاران اثر ضد قارچی *سلولزی‌میکروبیوم* گزاش شده است. احتمال وجود ترکیبات دی‌پپتیدی دیکتوپی‌پرازین در *سلولزی‌میکروبیوم* نشان داده شده است؛ که فعالیت‌های آنتی‌بیوتیکی، ضد توموری، ضد ویروسی و تنظیم رشد در این دی‌پپتید گزارش داده شده است (Rhee, 2004; Park and Shim, 2014).

در این مطالعه، متابولیت‌های استخراج شده از *سلولزی‌میکروبیوم* از نظر پتانسیل آنها به عنوان منبعی از عوامل ضد میکروبی جدید مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که یکی از پنج ایزوله فعالیت ضد باکتریایی قوی علیه *اشریشیا کلی* و MRSA از خود نشان داد. این امر به ویژه قابل توجه است، زیرا MRSA یک نگرانی بهداشت عمومی مهم است و اغلب به چندین آنتی بیوتیک مقاوم است (Carvalho *et al.*, 2010; Algammal *et al.*, 2020). اگرچه ایزوله هیچ اثر ضد قارچی از خود نشان نداد، فعالیت ضد باکتریایی قابل توجه آن نشان می‌دهد که این ایزوله پتانسیل آن را دارد که به عنوان منبع ارزشمندی از عوامل ضد میکروبی جدید عمل کند.

شناسایی ترکیبات فعال زیستی از میکروارگانیسم‌ها، مانند *سلولزی‌میکروبیوم*، پتانسیل ارائه داروهای جدید برای درمان بیماری‌های عفونی را دارد. استفاده از این ترکیبات ممکن است به مبارزه با افزایش پاتوژن‌های مقاوم به دارو که گزینه های درمانی فعلی محدودی دارند، کمک کند. بنابراین، مطالعات بیشتری برای بررسی پتانسیل متابولیت های *سلولزی‌میکروبیوم* برای توسعه عوامل ضد میکروبی جدید و موثر مورد نیاز است. علاوه بر این، تحقیقات بیشتری برای شناسایی سایر ترکیبات زیست فعال از این میکروارگانیسم برای کشف عوامل درمانی جدید مورد نیاز است.

## نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش نشان داد که *سلولزی‌میکروبیوم* اثر قوی بر روی *اشریشیا کلی* و بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین دارد ولی فاقد اثر ضد قارچی است. ساختار متابولیت مورد نظر با فرمول $C_{14}H_{24}N_2O_7$ از طریق آنالیز کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و طیف سنجی جرمی شناسایی شد. این یافته‌ها نشان داد که *سلولزی‌میکروبیوم* می‌تواند منبع امیدوارکننده‌ای برای توسعه عوامل ضد میکروبی جدید باشد.

## تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاری دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران در پیشبرد این پژوهش کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

## مراجع

Adamian, M., Hekmat, A. and Hajebrahimi, Z. 2021. The impacts of simulated microgravity on the cell viability and claudin-1 and claudin-3 expression of mcf-7 breast cancer cells. Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran, 32(2): 105-114.

Algammal, A.M., Hetta, H.F., Elkelish, A., Alkhalifah, D.H.H., Hozzein, W.N., Batiha, G.E.-S., El Nahhas, N. and Mabrok, M.A. 2020 . Methicillin-resistant staphylococcus aureus (mrsa): One health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. Infection and Drug Resistance: 3255-3265.

Aoki, H., Sakai, H.-I., Kohsaka ,M., Konomi, T., Hosoda, J., Kubochi, Y., Iguchi, E. And Imanaka, H. 1976. Nocardicin a, a new monocyclic β-lactam antibiotic i. Discovery, isolation and characterization. The Journal of antibiotics, 29(5): 492-500.

Baio, P.V.P., Ramos, J.N., Santos, L.S.d ,.Soriano, M.F., Ladeira, E.M., Souza, M.C., Camello, T.C.F., Ribeiro, M.G., Hirata Junior, R. and Vieira, V.V. 2013. Molecular identification of nocardia isolates from clinical samples and an overview of human nocardiosis in brazil. PLoS neglected tropical diseases, 7(12): e2573.

Beiranvand, M., Amin, M., Hashemi-Shahraki, A., Romani, B., Yaghoubi, S. and Sadeghi, P. 2017. Antimicrobial activity of endophytic bacterial populations isolated from medical plants of iran. Iranian journal of microbiology, 9.۱۱ :(۱)

Carvalho, K.S., Mamizuka, E.M. and Gontijo Filho, P.P. 2010. Methicillin/oxacillin-resistant staphylococcus aureus as a hospital and public health threat in brazil. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 14(1): 71-76.

Ferrer, P. 2006. Revisiting the cellulosimicrobium cellulans yeast-lytic β-1, 3-glucanases toolbox: A review. Microbial cell factories, 5(1): 1-8.

Holloway, W.J. 1982. Spectinomycin. The Medical Clinics of North America, 66(1): 169-173.

Hutchings, M.I., Truman, A.W. and Wilkinson, B. 2019. Antibiotics: Past, present and future. Current opinion in microbiology, 51: 72-80.

Kavitha, A., Prabhakar, P., Vijayalakshmi, M. and Venkateswarlu, Y. 2009. Production of

bioactive metabolites by nocardia levis mk-vl_113. Letters in applied microbiology, 49(4): 484-490.

Moghadam Ara, S.S., Pahlevani, M., Hpr, M.S. and Fatahian, S. 2022. Investigating the protective & restorative effects of medicinal plants on pancreatic beta cells. Cell and Tissue, 3.(۱)

Park, S.Y. and Shim, S.H. 2014. Characterization of metabolites from cultures of cellulosimicrobium cellulans. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 57: 481-484.

Ramazani, A., Moradi, S., Sorouri, R., Javani, S. and Garshasbi, M. 2013. Screening for antibacterial activity of streptomyces species isolated from zanjan province, iran. Int J Pharm Chem Biol Sci, 3(2): 342-349.

Rana, S. and Salam, M. 2014. Antimicrobial potential of actinomycetes isolated from soil samples of punjab. India. J Microbiol Exp, 1(2): 00010.

Rezamahalleh, H.M., Khodakaramian, G. and Hassanzadeh, N. 2019. Diversity of endophytic and epiphytic bacteria from sugarcane in khuzestan, iran. Brazilian Archives of Biology and Technology, 62.

Rhee, K.-H. 2004. Cyclic dipeptides exhibit synergistic, broad spectrum antimicrobial effects and have anti-mutagenic properties. International journal of antimicrobial agents, 24(5): 423-427.

Rhmanian, N., Hekmat, A. and Hajebrahimi, Z. 2022. Effect of simulated microgravity condition on cells proliferation and myostatin gene expression in differentiated skeletal muscle cells (c2c12). Space Science and Technology, 15(2): 85-97.

Rowlinson, M.-C., Bruckner, D.A., Hinnebusch, C., Nielsen, K. and Deville, J.G. 2006. Clearance of cellulosimicrobium cellulans bacteremia in a child without central venous catheter removal. Journal of Clinical Microbiology, 44(7): 2650-2654.

Tanvir, R., Sajid, I., Hasnain ,S., Kulik, A. and Grond, S. 2016. Rare actinomycetes nocardia caishijiensis and pseudonocardia carboxydivorans as endophytes, their bioactivity and metabolites evaluation. Microbiological research, 185: 22-35.

Torok, T. 2003. Extraction of pcr-amplifiable genomic DNA from bacillus anthracis spores. Lawrence Berkeley National Laboratory.

Ward, M. 1977. The bactericidal action of spectinomycin on neisseria gonorrhoeae. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 3(4): 323-329.

Research in Karyotic Cell &Tissue, Volume 3, Issue 1, 2022 Pages 15-22

Article

# Investigating the Antimicrobial Properties of Metabolites Extracted from *Cellulosimicrobium*

**Marjan Seratnahae [1,*], Seyyed Saeed Eshraghi [1,2], Parviz Pakzad[1], Alireza ZahraeiRamazaniand[3] and Mehdi Yaseri [4]**

[1] Department of Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

[2] Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran.

[3.] Department of Biology and Vector Control of Diseases, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[4] Department of Epidemiology and Biostatistics, Tehran University of Medical Sciences

*Correspondence to Seyyed Saeed Eshraghi, Ph.D., saeedeshraghi4@gmail.com

Received 11st December 2021 Revised 11st March 2022 Accepted 21st April 2022

## Abstracts

**Introduction and aim:** This study aimed to investigate the antimicrobial properties of metabolites extracted from cellulose microbiomes to better understand their potential as a source of new antimicrobial agents.

**Methods:** In this observational-analytical study, 50 soil samples were collected from different regions of Tehran province. After culturing, suspicious colonies were phenotypically and biochemically tested, and molecular identification was performed by amplifying the 16S rRNA gene. Primary screening of metabolite production with antibacterial and antifungal effects was done using the Cross-Streak Method. The antimicrobial effect of the extracted metabolite was measured using the well diffusion method and the minimum concentration of growth inhibition. Finally, the chemical composition and potential metabolite substance were determined through high-performance liquid chromatography and mass spectrometry.

**Results**: Five *Cellulosimicrobium* isolates were identified using biochemical methods and molecular identity verification. Among the five isolates suspected to be *Cellulosimicrobium*, strong antibacterial activity was observed in one isolate during the screening stage. *Cellulosimicrobium* had a strong effect on *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, but no antifungal effect was observed. The structure of the desired metabolite with the formula $C_{14}H_{24}N_2O_7$ was identified through HPLC and Mass chromatography analysis.

**Conclusion**: These findings suggest that *Cellulosimicrobium* is a promising source for the discovery and development of new antimicrobial agents.

***Keywords:*** Metabolites Extracted; antibacterial activity; Cellulosimicrobium; Hospital Pathogens