جدا سازی مواد آنتی باکتریال از استرپتومیسس های بومی ایران

• **فرزانه سلامی**، سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران پژوهشکده بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: دی ماه ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش: خرداد ماه ۱۳۸۳

چکیده

به منظور غربالگری آنتی بیوتیک از ۲۳۰ استرپتومیسس جدا شده از قسمت‌های مختلف خاک ایران برای تعیین قدرت ضدمیکروبی، آزمایش تعیین حساسیت آنتی بیوتیک انتخاب گردید که روش انتخابی ما روش انتشار در پلیت بوده است که در این روش هاله ممانعت رشد به طریق انتشار خارجی آنتی بیوتیکی از یک منبع مثل چال هائی که در لایه آگار ایجاد کردیم به یک سطحی از محیط آگار در پلیت‌ها وارد می‌گردد. البته پلیت آگار باید قبلاً به وسیله میکروب های *Bacillus cereus* (ATCC : ۱۱۷۷۸)، *Micrococcus luteus* (ATCC : ۹۳۴۱)، *Staphylococcus aureus* (ATCC : ۲۹۷۳۷)، *Saccharomyces cervisia* (ATCC : ۹۷۶۳) *Escherichia coli* (ATCC:۱۰۵۳۶) تلقیح شده باشد. اندازه هاله منطقه ممانعت رشد اطراف هر چاله بیش از یک سانتیمتر به عنوان فعالیت آنتی بیوتیکی قابل قبول ثبت شد که نتیجه غربالگری آنتی بیوتیک برای این ۲۳۰ استرپتومیسس، فعالیت آنتی بیوتیکی فرآورده‌های ۱۶ استرپتومیسس بود که از میان این ۱۶ سویه، سویه‌هائی که با کدهای ۷۱، ۵b، ۱b، ۴b، ۸۲، ۷g مشخص شده اند فعالیت آنتی بیوتیکی قابل توجه‌تری نسبت به سویه‌های دیگر نشان دادند و برای جداسازی آنتی بیوتیک‌ها انتخاب گردیدند و در نهایت سویه ۷۱ که فعالیت بیشتری نسبت به بقیه نشان داد برای جداسازی و شناسائی آنتی بیوتیک انتخاب گردید.

کلمات کلیدی:خاک، استرپتومیسس، انتی بیوتیک

Pajoubesh & Sazandegi No 64 pp: 41-47

Isolation and determination of streptomyces that produce antibiotic from soil

By: F. Salami, Iranian Research organization of Science of Technology(I.R.O.S.T). Biotechnology Department Tehran, Iran.

In this research screening for determinating,the power of antimicrobial for 230 streptomyces that was isolated from various soil samples of Iran were studied. The method of diffusion assay was used in the present investigation. The samples were introduced in holes of the petri dishes containing nutrient agar. The agar was seeded with *Bacillus cereus* (ATCC: 11778), *Staphylococcus* aureus (ATCC:29737), *Micrococcus leuteus* (ATCC:9341), *Saccharomyces cervisiae* (ATCC:9763), *Escherichia coli* (ATCC:10536) . The diameter of the zone of no growth was measured.Among 230 screened streptomyces from different soil samples, 16 strains produced antibacterial substance and showed antagonistic activity against Gram-positive and Gram- negative bacteria. Six of the strains which had maximum antibiotic activity were obtined from strains coded 71, 7g, 82, 4b, 1b, 5b. This strains showed higher inhibition zones on agar diffusion assay which was more than 1.5 cm. The yield of antibiotic production of the strain 71 was higher. This strain was selected for purification and determinating antimicrobial characteristics.

Key word: Soil, Streptomyces,Antibiotic

مقدمه

اکتینومیست ها، پروکاریوت هائی هستند که قدرت تولید متابولیت‌های مختلفی را دارا هستند. آنها مواد مختلفی را که برای سلامت انسان ضروری هستند تولید می‌کنند مثل آنتی بیوتیک‌ها، آنزیم ها و غیره.

تحقیقات نشان داده که مهمترین منبع برای تولید آنتی بیوتیک‌ها آکتینومیست ها بوده اند. در دهه‌های ۶۰ تا ۷۰ قرن بیستم ۸۰- ۷۵ ٪ آنتی بیوتیک‌های کشف شده از اکتینومیست ها به خصوص گونه‌های استرپتومیسس ها بوده اند.(۳، ۸)

در حال حاضر ۱۴۰ – ۱۳۰ فرآورده میکروبی مفید در درمان انسان به کار می‌رود. حدود ۱۵ تا ۲۰ فرآورده در کشاورزی مثل آفت‌کش‌ها و یا عوامل محافظت کننده گیاهان و افزودنی های غذا استفاده می‌شوند. اکثریت این ترکیبات به جز پنی سیلین های قارچی، سفالوسپورین و چندین پپتید باکتریال از فرآورده‌های اکتینومیست‌ها هستند.

به طور کلی بیشتر فرآورده‌های اکتینومیست ها در بین متابولیت‌های استرپتومیسس‌ها وجود داشته‌اند. تولید آنتی بیوتیک‌ها به طور منحصر به فرد در میان آکتینومیست ها به استرپتومیسس ها متعلق است. فقط تا سال ۱۹۸۴ حدود ۳۴۷۷ آنتی بیوتیک که توسط استرپتومیسس ها تولید شده اند گزارش گردیده است. در بعضی مطالعات نزدیک به ۵۰ ٪ از همه استرپتومیسس های جدا شده آنتی بیوتیک تولید می‌کنند به همین دلیل بر روی آنتی بیوتیک‌هائی که استرپتومیسس ها تولید می‌کنند تحقیقات زیادی صورت گرفته است. بیش از ۵۰۰ آنتی بیوتیک تا به حال از استرپتومیسس ها جدا شده اند و تعداد زیادی از آنها تا به حال مورد مطالعه و بررسی شیمیائی قرار گرفته اند. بیش از ۵۰۰ آنتی بیوتیک جدا شده از استرپتومیسس ها در درمان انسان و دام و در صنعت و کشاورزی کاربرد دارند (۳، ۸).

بعضی از آنتی بیوتیک‌های مهم جدا شده از استرپتومسیس‌ها عبارتند از:

استرپتومیسین واسپکتینومایسین که از *S. griseus* جدا گردید، تتراسیکلین که از *S. auerofaciens* جدا گردید، کلروتتراسیکلین و اریترومایسین که از *S. auerofaciens* و *S.erythaeus* جدا شده بودند.

کلیندامایسین (clindamycin) که آنتی بیوتیکی از دسته ماکرولیدهاست از *S. lincolensis* جدا گردید و نیستاتین و آمفوتریسین B که آنتی بیوتیکی از دسته Polyenes است از *Streyptomyces nodosus*, *Streptomyces noursei* جدا گردیده اند (۳، ۸).

هنوز هم مطالعات برای به‌دست آوردن آنتی بیوتیک‌های جدید از استرپتومیسس ها ادامه دارد زیرا خیلی از بیماری های عفونی هنوز به قدر کافی به وسیله آنتی بیوتیک‌های موجود کنترل نشده اند. همچنین مقاوم شدن بعضی از نژادها به آنتی بیوتیک‌ها نیاز به کشف آنتی بیوتیک‌های جدید را ایجاب می‌کند(۱).

به طور کلی می توان گفت برای جداسازی آنتی بیوتیک‌ها دو فاکتور اصلی عبارتند از :

الف) ارزیابی میکروارگانیسم های تولید کننده

ب) انتخاب تست های جداسازی

برای دستیابی به این آنتی بیوتیک‌ها مانیز تحقیق خود را بر روی جداسازی آنها متمرکز کرده بدین منظور ابتدا لازم است که میکرو ارگانیسم تولیدکننده آن را از خاک جدا کرده (نمونه های خاک از مناطق مشهد، لاهیجان ، تهران و کرمان جمع آوری گردیده شد) و سپس آن را شناسائی کرده و بعد از آن مناسبترین و ارزانترین تستی که برای جداسازی آنتی بیوتیک‌ها از آن لازم است را پیدا کرده و انتخاب کردیم.

به طور خلاصه روش کار در این پروژه به ترتیب زیر است:

۱ – جداسازی و شناسائی استرپتومیسس های خاک که در گروه تولید کننده‌های آنتی بیوتیک قرار می گیرند.

۲ – غربال برای تعیین قدرت ضد میکروبی

۳- انتخاب سویه‌های مناسب تولید کننده آنتی بیوتیک

۴ – شناسائی نهائی میکرو ارگانیسم های جدا شده

۵ - تولید آنتی بیوتیک و تعیین خصوصیات ضد میکروبی آن

مواد و روش ها

مواد

مهمترین مواد و محیط های کشت که در این تحقیق از آنها استفاده شده است عبارتند از:

محیط کشت اختصاصی استرپتومیسس ها (ISP4)، محیط اسپورولیشن برات، محیط برین هارت اینفیوژن آگار، محیط برین هارت اینفیوژن برات، محیط نوترینت آگار، گزانتین، گوانین، نشاسته،کازئین، اوره، ساکارز، مانیتول، ژلاتین، نیترات، الکل، کریستال ویوله، سافرانین ، ید، معرف اکسیداز، معرف کاتالاز، سیکلوهگزمید.

روش‌ها: نمونه‌های خاک از ۴سانتی متر اول وبالای خاک جمع اوری شدند زیرا در این محل بیشترین فعالیت میکروبی دیده می‌شود پس بیشترین جمعیت میکروبی هم در ان وجود دارد.سعی گردید بلافاصله پس از جمع اوری نمونه از ان رقت تهیه کرده و کشت دهیم ولی در صورتیکه امکان پذیر نبود در درجه حرارت ۲۰ درجه سانتی گراد نگه داری گردید تا بعد مورد بررسی قرار گیرند(۱۴). از هریک از نمونه‌های خاک رقت‌های 10^{-2} تا 10^{-5} تهیه کردیم و در محیط(International streptomyces project) ISP که حاوی آنتی بیوتیک ضد قارچ سیکلوهگزمید بود کشت دادیم و پس از ۱۰ – ۷ روز از استرپتومیسس های رشد کرده بر روی محیط اسپورولیشن برات (محیط پروداکشن) تلقیح کردیم و به مدت ۵ روز (۱۲۰ ساعت) برروی شیکر با دمای ۳۰ درجه و دور ۱۵۰ قرار دادیم تا اگر استرپتومیسس قدرت تولید آنتی بیوتیک را داشت در این محیط تولید کند.

سپس برای غربال تعیین قدرت ضد میکروبی، آزمایش تعیین حساسیت آنتی بیوتیک انجام گرفت. روش انتخابی ما روش انتشار درپلیت بود(۷،۵) که دراین روش هاله ممانعت رشد به طریق انتشار خارجی آنتی بیوتیک از یک منبع (مثلاً دیسک یا در چاله هائی که در لایه آگار

ایجاد می‌شود) به یک سطحی از محیط آگار در پلیت که به وسیله میکروب های

Bacillus cereus (PTCC: ۱۰۱۵ , ATCC: ۱۱۷۷۸)

Micrococcus luteus (PTCC: ۱۱۱۰, ATCC: ۹۳۴۱)

Escherichia coli (PTCC: ۱۳۳۸, ATCC: ۱۰۵۳۶)

Staphylococcus aureus (PTCC: ۱۳۳۷, ATCC: ۲۹۷۳۷)

Saccharomyces cerevisiae (PTCC: ۵۰۵۲ ATCC: ۹۷۶۳)

تلقیح شـده اند، ایجاد می‌گـردد. اندازه هاله(منطقه ممانعت رشـد) اطراف هر چاله بیش از ۱ سـانتی متر به عنوان فعالیت آنتی بیوتیکی قابل قبول ثبت گردید.

برای شناسائی استرپتومیسـس‌های تولید کننده آنتی بیوتیک تست هائی نظیر رنگ توده اسپور، رنگ کلنی‌ها پس از ۴۸ ساعت، تست کاتالاز، تست اکسیداز، تجزیه گزانتین، گوانین، نشاسته، کازئین، اوره، ساکارز، مانیتول، ژلاتین، احیاء نیترات، تولید پیگمان ملانین، رشد در دماهای مختلف، رشد در درصدهای مختلف نمک انجام گردید.

ولی تسـت هائی نظیر مورفولوژی زنجیره ای اسپور، آرایش سطح اسپور و میسلیوم های استرپتومیسس‌ها که از تسـت های مهم برای طبقه بندی استرپتومیسـس‌ها هستند و به وسیله میکروسکپ الکترونی صورت می‌گیرد، به علت هزینه بالا فقط برای سـویه ۷۱ که فعالیت بالائی برای تولید آنتی بیوتیک نشان داد انجام پذیرفت.

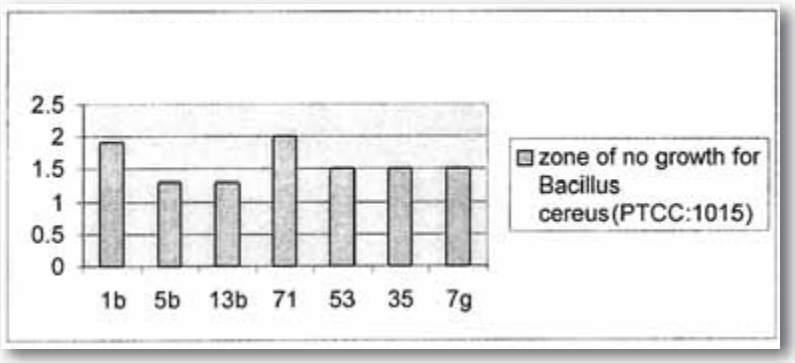
نتایج

برای جداسازی استرپتومیسس های تولید کننده آنتی بیوتیـک ابتـدا ۲۳۰ استرپتومیسـس از خاک‌های مناطق مشهد، لاهیجان،تهران ، کرمان جدا گردید و سپس آنها برای تولید آنتی بیوتیک مورد ارزیابی قرارگرفتند. بدین منظور در ابتدا هر استرپتومیسـس را بر روی محیط ۴ – ISP کشت داده و پس از ۴۸ ساعت مورفولوژی میکروسکوپی آنها مورد بررسـی قرار گرفت. در نهایت تمام ۲۰ استرپتومیسس جدا شـده در محیط مایع اسپورولیشن برات کشت داده شدند و بعد از ۵ روز که فرآورده‌های آنها به حداکثر رسید در آزمایش تعیین حساسـیت، فعالیت خود را نشـان دادند. که از میان ۲۳۰ استرپتومیسس تست شـده فقط ۱۶ استرپتومیسس قـادر به تولید آنتی بیوتیک بـوده و هاله ممانعت کروی که ایجاد کردند قابل توجه بود (هاله های کمتر از ۱ سانتی متر هم منفی گزارش گردید) که نتایج آن به صورت ۴ نمودار ۱ و ۲و ۳و ۴ مشخص شده است.

از میان ۱۶ استرپتومیسـس تولید کننده آنتی بیوتیک سویه‌های ۷g, ۳۵ , ۵۳ , ۷۱ ,۱۳b, ۵b, ۱b نسبت به سویه *Bacillus cereus* (PTCC: ۱۰۱۵, ATCC: ۱۱۷۷۸) قطر هاله عدم رشدی بیش از ۱/۵ سانتی متر نشان دادند (نمودار ۱)

از میان ۱۶ استرپتومیسـس تولید کننده آنتی بیوتیک، سویه‌های ۷g, ۵۵, ۵۴, ۷۱, ۴b نسبت به سویه *Staphylococcus aureus* PTCC: ۱۳۳۷, (ATCC: ۲۹۷۳۷ قطر هاله عدم رشدی بیش از ۱ سانتی متر نشان دادند(نمودار ۲).

از میان ۱۶ استرپتومیسس تولید کننده آنتی بیوتیک سویه‌های TC, ۳۹b, ۵b, ۴b, ۱b

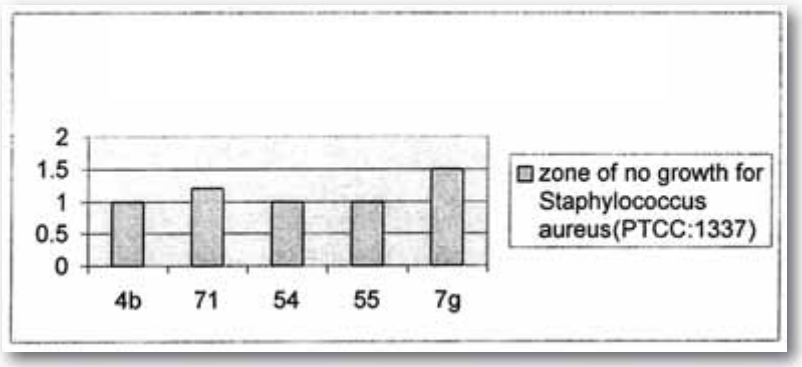


نمودار ۱- قطر هاله عدم رشد نسبت به *B. cereus* (ATCC:۱۱۷۷۸)

۷g, ۱۴g, ۴g, ۵۵, ۸, ۵۴, ۷۱ , ۸۲ نسـبت به سـویه *Micrococcus luteus* (PTCC: ۱۱۱۰, ATCC:۹۳۴۱) قطر هاله عدم رشدی بیش از ۱ سانتی متر نشان دادند (نمودار ۳).

از میان ۱۶ اسـترپتومیس تولید کننده آنتی بیوتیک، سویه‌های TC, ۸۲, ۱۴g, ۵b, ۱b نسـبت بـه سـویه *Escherichia coli* PTCC:۱۳۳۸, ATCC:)۱۰۵۳۶ قطر هاله عدم رشدی بیش از ۱ سانتی متر نشان دادند (نمودار ۴).

پس از بررسـی فعالیت آنتی بیوتیکی این ۱۶ استرپتومیسس، ۶ سویه ۷۱, ۴b, ۸۲, ۷g, ۵b, ۱b که فعالیت آنتی بیوتیکی قابل توجه‌تری نسـبت به سویه‌های دیگر نشان دادند برای شناسائی و جداسازی آنتی بیوتیک انتخاب گردیدند. در جدول ۱ فعالیت آنتی بیوتیکی این ۶ سویه نشان داده شده است و در جدول ۲ همانطور که مشاهده می‌شود تست های تشخیصی مهمی که برای شناسائی این استرپتومیسس‌ها انجام پذیرفته مشخص شده است.



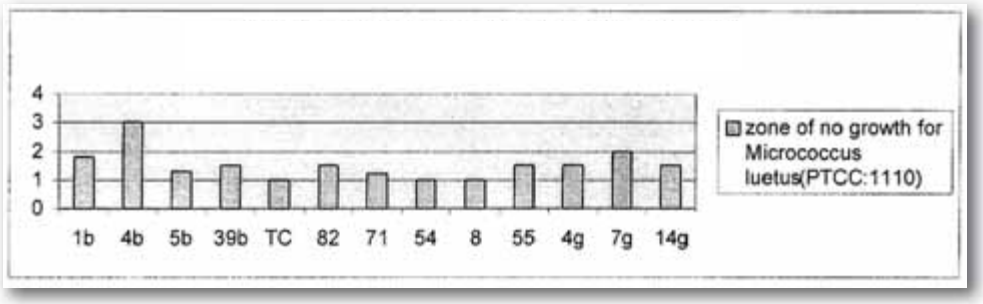
نمودار ۲- قطر هاله عدم رشد نسبت به *Sta. aureus* (ATCC: ۲۹۷۳۷)

جدول شماره ۱ – قطرهاله عدم رشد (cm)

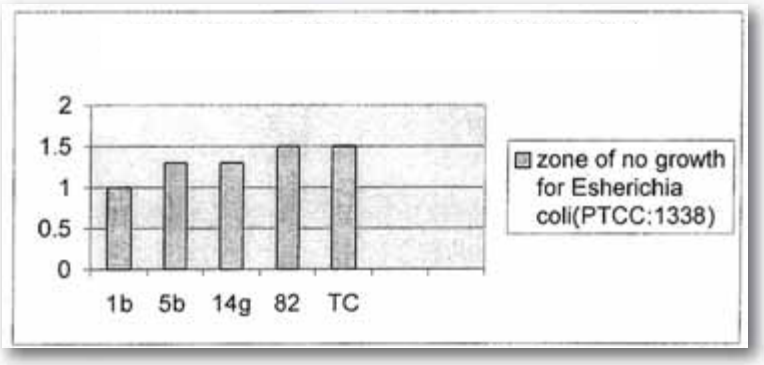
خصوصیات	قطر هاله عدم رشد در برابر باکتریهای مورد آزمایش (cm)				
سویه های استرپتومیسس	*Bacillus cereus* ,PTCC: ۱۰۱۵ ATTC: ۱۱۷۷۸	*Micrococcus luteus* PTCC: ۱۱۱۰ ATTC: ۹۳۴۱	*Staphylococcus aureus* PTCC: ۱۳۳۷ ATTC: ۲۹۷۳۷	*Escherichia coli* PTCC: ۱۳۳۸ ATTC: ۱۰۵۳۶	*Saccharomyces cerevisiae* PTCC: ۵۰۵۲ ATTC: ۹۷۶۳
۷۱	۲cm	۱/۲cm	۱/۲cm	-	-
۷g	۱/۵cm	۲cm	۱/۵cm	-	-
۸۲	-	۱/۵cm	-	۱/۵cm	-
۴b	-	۳cm	۱cm	-	-
۱b	۱/۹cm	۱/۸cm	-	۱cm	-
۵b	۱/۳cm	۱/۳cm	-	۱/۳cm	-

باتوجه به اینکه یکی از تست های تشخیصی مهم برای طبقه بندی استرپتومیسس ها تهیه میکرو گراف الکترونی برای مشخص شدن آرایش اسپور و زنجیره اسپور و هیف استرپتومیسس ها است به دلیل هزینه بالا برای تهیه این میکرو گراف، فقط توانستم برای سویه ۷۱ (که فعالیت آنتی بیوتیکی قوی تری نسبت به ۵ سویه دیگر نشان داد) آن را تهیه کنیم که عکس این میکرو گراف ضمیمه مقاله می باشد (شکل ۱). و درشکل ۲ هم رنگ کلنی ها پس از ۴۸ ساعت مشخص می باشد.

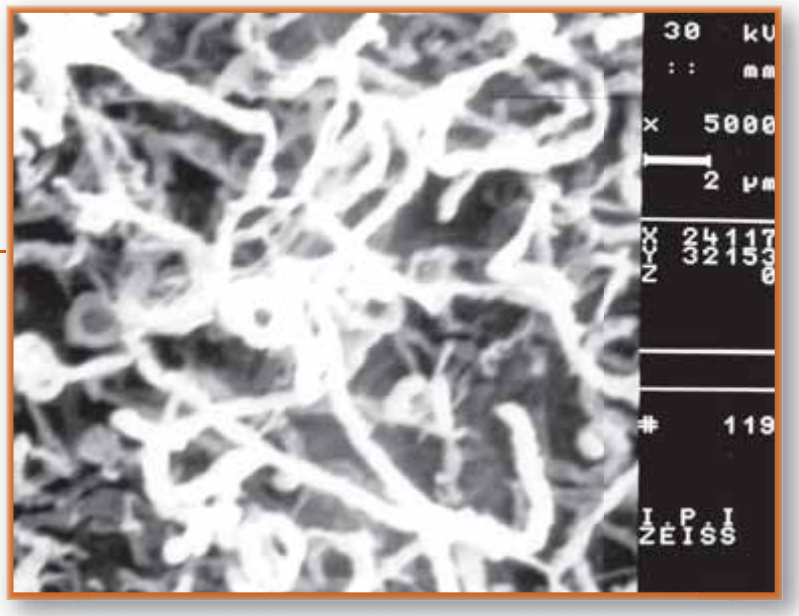
لازم به ذکر است پس از شناسائی سویه ۷۱ جزء دسته *Streptomyces diastaticus* طبقه بندی گردید. همچنین آنتی بیوتیک‌های تولید شده توسط سویه ۷۱ جداسازی گردید و برای شناسائی به دانشکده داروسازی دانشگاه تبریز ارسال گردید که آنتی



نمودار ۳- قطر هاله عدم رشت نسبت به *Microccocus luetus* (ATCC:۹۳۴۱)



نمودار ۴- قطر هاله عدم رشد نسبت به *E. coli* (ATCC: ۱۰۵۳۶)



شکل (۱) میکروگراف استرپتومیسس سویه ۷۱

بیوتیک جداشده توسط سویه ۷۱ را جزء دسته آمینه گلیکوزید ها طبقه‌بندی کرده‌اند.

بحث

هدف اصلی جداسازی استرپتومیسس ها از خاک و به‌دست آوردن فرآورده‌های آنها در محیط مایع، غربال کردن آنتی بیوتیک‌ها و در نتیجه استرپتومیسس های تولید کننده این مواد بود.

غربالگری آنتی بیوتیک‌ها عبارت است از روش هائی که بتواند فعالیت آنتی بیوتیکی موادی همچون فرآورده‌های میکروبی را مشخص کند و در این رابطه از راندمان خوبی نیز برخوردار باشند. روش انتخابی ما برای غربالگری (Screening)، روش انتشار Diffusion methods بود زیرا راه معمولی تشخیص فعالیت ضد باکتریائی در نمونه هائی که فعالیت مشخص نمی باشد با کمک تست انتشار انجام می پذیرد (۷و ۵).

در این روش انتشار خارجی آنتی بیوتیک از یک منبع به یک سطحی از محیط آگار تلقیح شده (به وسیله میکروب های مورد آزمایش) در پلیت باعث ایجاد هاله ممانعت کروی می‌شود. طول هاله متناسب است با لگاریتم غلظت آنتی بیوتیک. هنگام استفاده از روش پلیت باید نکات ریزی به کار گرفته شود تا صحت کامل به‌دست آید. روش انتشار یک روش فیزیکو شیمیائی است که در آن باکتری به عنوان اندیکاتور غلظت ترکیب فعال به کار برده می‌شود(۷،۵).

انتشار آنتی بیوتیک با ضریب انتشار تعیین می‌گردد، دما،تاحد کمی pH ، غلظت نمک و غلظت آگار در آن نقش تعیین کننده دارد. ضریب انتشار بستگی به وزن مولکولی نمونه های منتشر شونده دارد. هر چه وزن مولکولی کمتر باشد آنتی بیوتیک دورتر انتشار پیدا می‌کند. موقعیت لبه ممانعت با رسیدن یک غلظت معین (غلظت بحرانی) دارو قبل از اینکه باکتری ها به میزان غلظت بحرانی از نظر تعداد برسند تعیین می‌گردد.

اندازه هاله (منطقه ممانعت رشد) تشکیل شده بستگی به فاکتورهای بیولوژیک و فیزیولوژیک دارد. ولی اندازه هاله به تنهائی تعیین کننده غلظت دارو و یا حساسیت میکروب مورد آزمایش (Test strain) نمی باشد(۵، ۸، ۱۲، ۱۳).

روشهای انتشار وابسته هستند و یک استاندارد جهت کالیبر کردن سیستم وجود دارد. استاندارد و نمونه می‌بایستی دارای گونه های مشابه شیمیائی جهت تست حساسیت (assay) باشند ولی در این پروژه به دلیل ناشناخته بودن استرپتومیسس و نوع آنتی بیوتیکی که تولید می‌کند نمی توان استانداردی جهت کالیبر کردن سیستم در نظر گرفت.

شکل (۲) رنگ کلنی‌های استرپتومیسس سویه ۷۱ بعد از ۴۸ ساعت

جدول ۲ – خصوصیات بیولوژیک و شیمیائی نژادهای استرپتومیسس

خصوصیات	سویه های استرپتومیسس					
	71	7g	82	4b	1b	5b
رنگ کلنی ها پس از 48 ساعت بر روی محیط ISP-4	رنگ کلنی سفید پشت کلنی هم سفید	رنگ کلنی سفید و پشت کلنی زرد – قهوه ای	رنگ کلنی خاکستری پشت کلنی خاکستری	رنگ کلنی خاکستری پشت کلنی زرد – قهوه ای	رنگ کلنی زرد و پشت کلنی هم زرد – قهوه ای	رنگ کلنی خاکستری پشت کلنی هم خاکستری
رنگ توده اسپور پس از 2 هفته	سفید	سفید	سبز روشن	سفید	خاکستری (پررنگ)	سبز روشن
تست کاتالاز	+	+	+	+	+	+
تست اکسیداز	–	–	–	–	–	–
تجزیه گزانتین	+	+	+	–	_	+
تجزیه گوانین	+	+	+	_	_	+
تجزیه نشاسته	+	+	+	+	± ضعیف	+
تجزیه کازئین	+ ضعیف	_	_	+	+ ضعیف	+
تجزیه اوره	–	+	+	–	_	+
تجزیه ساکاروز	–	–	–	–	+	+
تجزیه مانیتول	+	+	+	+	+	+
تجزیه ژلاتین	–	–	–	–	–	–
احیاء نیترات	–	+	–	+	–	+
پیگمان ملانین	–	+	–	+	–	–
رشد در ۲۵ سانتیگراد	+	+	+	+	+	+
رشد در ۳۷ سانتیگراد	+	–	–	+	–	–
رشد در ۵۰ سانتیگراد	–	–	–	–	–	–
Nacl ٪ ۱/۵	+	+	+	+	+	+
Nacl ٪ ۳	–	+	+	+	–	–
Nacl ٪ ۵	–	+	+	–	–	–

در مقایسه نتایج تحقیقات این پروژه با تحقیقات مشابه قبل باید گفت در سال ۱۹۹۴ دوپپتید جدید از *Streptomyces griseus* جدا گردیدند که این ترکیبات دو باز دارنده آنزیمی هستند(۲).

در سال ۱۹۸۲ یک آنتی بیوتیک جدید به نام Cyanocycline A از *Streptomyces flavogriseus* جدا گردید که این استرپتومسیس هم از خاک جدا شده بود(۹،۶).

در سال ۱۹۸۲ از *Streptomyces Ravidus* که از خاک گواتمالا جدا گردیده بود آنتی بیوتیک جدیدی به اسم Ravidomycin (Ay- ۲۵ ,۵۴۵) جدا گردید (۱۲).

در سال ۲۰۰۰ – ۲۰۰۲، ۴۷ استرپتومسیس از خاک‌های Antarctic جدا گردیدند که ۱۹ تا از آنها خاصیت آنتاگونیستی در مقابل باکتریهای گرم مثبت و منفی نشان دادند که از بین آنها ۶ تا فعالیت آنتی باکتریال بالاتری نسبت به بقیه نشان دادند (۱۱).

به طور خلاصه باید گفت در این پروژه تعیین حساسیت به روش انتشار روشی بود برای به‌دست آوردن سریع فعالیت و نمی تواند جهت به‌دست آوردن اندازه مطلق حساسیت باکتری و یا فعالیت آنتی بیوتیک استفاده شود. به علت کنترل ضعیف فاکتورهای عمل کننده روش تعیین حساسیت با کمک پلیت می تواند درصد خطای ۱۰ – ۵ درصد داشته باشد. صحت بالا و درست با روش انتشار مشکل‌تر از روش‌های توربیدومتریک به‌دست می‌آید. روش‌های تعیین حساسیت (assay) می توانند از صحت بالائی برخوردار باشند اگر نکات زیر در نظر گرفته شود:

ارگانیسم مورد آزمایش (test strain) از گروه ارجح متوقف شده با دارو انتخاب گردد، باید رشد ارگانیزم مورد آزمایش توسط دارو متوقف شود و زمان تقسم (generation time) کمتر از ۶۰ دقیقه باشد در این صورت

زمان انکوباسیون بالا می‌رود.

محیط تعیین حساسیت (assay) می بایستی رشد ارگانیزم مورد آزمایش را تقویت نموده و با میزان فعالیت دارو مداخله نکند. ارگانیزم مورد آزمایش نمی بایستی پاتوژن باشد، در سوسپانسیون به صورت یکنواخت رشد نماید و به صورت توده ای و رشته ای رشد نکند.

در میزان غلظت کمی دارو مورد نظر در تعیین حساسیت، اوزان بیشتر دارو با ارگانیزم مورد آزمایش واکنش می‌دهد (جهت پایین آوردن میزان رشد). بنابراین روش تعیین حساسیت یک روش وابسته به درجه است که در آن میزان کاهش رشد اندازه‌گیری می‌شود.

بنابراین یک زمان Logo (لگاریتم صفر) در این کار نیز وجود دارد. زمان کل انکوباسیون‌طولانی تر از زمان فاز لگاریتمی رشد می باشد و طول زمان انکوباسیون مهم نبوده و به طور کامل برای استانداردها و نمونه ها یکسان می باشد. از این رو روش‌های تعیین حساسیت روش‌های محدود به رشد می باشند و هر چیز مؤثر روی رشد و میزان آن به غیر از دارو موجب می‌شود که روش تعیین حساسیت (assay) منحرف گردد. آنالیت می‌بایستی همیشه در این موارد تداخل، هوشیار باشد البته این مورد در زمینه دوزهای داروئی به ندرت مشاهده می‌گردد.

منابع مورد استفاده

۱- راینر؛ رونالد ترجمه دکتر عباس شفیعی و دکتر علیرضا قنبر پور-۱۳۷۱؛ مبادی آنتی بیوتیکها صفحات(۴۲-۱)

2- Alvarez M. Estela, David R. Houck, Caroleb. White, James E. Browneil, Mark A. Bobko, 1994, Isolation and structure Elucidation of two new calpain inhibitors from *Streptomyces griseus*. The journal of Antibiotic Vol 47 No. 11 (1195-1201)

3- Brok Thomas D. Michael T. Madigan, 1991. Biology of microorganism, (361-369,785-790)

4- Demain Arnold L.,Nadine. A. Solomon, 1986. Industrial microbiology and biotechnology. chapter1 (1-24)

5- Hash John H., 1975. Method in enzymology. Volume 43 (1-24)

6- Hayashi Toshiaki, Takao Noto, Yoshiharu Nawata, Hiroshi Okazaki, Mikio Sawada and Kurio ANDO, 1982, Cyanocycline A, A new antibiotic, Taxonomy of the producing organism, Fermentation, Isolation and Characterization.The Journal of Antibiotics.Vol. XXXV No.7 (771-777)

7- Hewitt William, 1988. Theory and application of microbiological assay, Capter(4).

8- Graw Hill, 1990. Isolation of biotechnology organism from nature, (1-17)

9- Ishii Kiyoto,Shinichi Kondo, Yoshio nishimura, Masa Hamada, Tomio Takeuchi, 1983. Decilorubicin A new anthracycline antibiotic.The Journal of Antibiotics, vol. XXXVI No. 4(450-454).

10- Perlman D., 1977. Advance in applied microbiology. volume21 (53-60)

11- Penka Moncheva, Sava Tiskkov, 2000-2002.Characteristics of soil actinomyces from ANTARCTICA.Journal of Culture Collections Volume 3 pp.3-

12- Sehgal S. N., Helen Czerkawski, Alicia Kudelski, K. Panden. 1982. Ravidomycin (AY-25, 545), A new antitumor antibiotic. The Journal of Antibiotics, Vol. XXXVI No.4 (355-360)

13-Williams & Wilkins,Baltimore, 1989, Streptomyces and related genera in: Bergeys Manual of Systematic Bacteriology (8th), Vol 4, Williams S.t, etal,2451-2508