Isolation and Identification of a Myxobacterium Producing Myxovirescins, Myxalamides and Myxochromids from Intestinal Tract of earth Worm of Ghaemshahr County

Zahra Khosravi Babadi
Ph.D student, Department of Microbiology & Microbial Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University GC, Tehran, Iran, zahrakhosravi1365@yahoo.com
Gholamhossein Ebrahimipour *
Associate professor, Department of Microbiology & Microbial Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University GC, Tehran, Iran, g-ebrahimi@sbu.ac.ir
Joachim Wink
Microbial Strain Collection, Helmholtz Centre for Infection Research (HZI), Inhoffenstraße 7, D-38124 Braunschweig, Germany, Joachim.Wink@helmholtz-hzi.de

Abstract

Introduction: Myxobacteria are Gram-negative Deltaproteobacteria with rod-shaped vegetative cells, aerobic organotrophs that exhibit unique group behavior.

Materials and Methods: The myxobacterial strain Mx18Zk was isolated from intestinal tract of earth worm of Ghaemshahr County in Mazandaran province and the extraction of the fermented broth culture was prepared with organic solvent extraction method. Methanol extract tested for potential antimicrobial activity against 11 various human pathogens. Finally the rest of methanol extract fractionated by HPLC and tested again against sensitive pathogens.

Results: Strain Mx18Zk significantly inhibited growth of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Chromobacterium violaceum*, therefore was used for further characterization. Analysis of morphological, biochemical, 16S rRNA gene sequence and phylogenetic tree indicated that this strain with 100 % homology belongs to the genus *Corallococcus macrosporus* . The methanol extract was subjected to HPLC fractionation against sensitive pathogens. The active extracts studied by LC-MS and its results compared by previously identified myxobacterial secondary metabolites deposited in Myxobase database of HZI. LC/MS analysis resulted in the identification of Myxochromids and unknown Myxovirescins, Myxalamides antibiotics in methanol extract of the strain Mx18Zk.

Discussion and conclusion: On the basis of results, isolated strain was active against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Chromobacterium violaceum* and 100 % homology was belong to the genus *Corallococcus macrosporus.* LC/MS analysis resulted in the identification of Myxochromids and unknown Myxovirescins, Myxalamides antibiotics in methanol extract of the strain Mx18Zk.

Keywords: Myxovirescins, Myxalamides and Myxochromids Antibiotics, Antimicrobial Activity, Metabolite Production.

* Corresponding author
Received: August 5, 2018 / **Accepted:** December 12, 2018

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هشتم، شماره ۲۹، بهار ۱۳۹۸، صفحه ۱۲۹- ۱۱۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۵/۱۴ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۲۱

جداسازی و شناسایی میکسوباکتر تولیدکنندهٔ Myxovirescins، Myxalamides و Myxochromids از دستگاه گوارش کرم خاکی منطقهٔ قائم‌شهر

زهرا خسروی بابادی: دانشجوی دکتری گروه میکروبیولوژی و زیست‌فناوری میکروبی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، zahrakhosravi1365@yahoo.com
غلامحسین ابراهیمی پور *: دانشیار گروه میکروبیولوژی و زیست‌فناوری میکروبی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، g-ebrahimi@sbu.ac.ir
یواخیم وینک: کلکسیون میکروبی مرکز هلم هولتز، برانشویگ، آلمان، Joachim.Wink@helmholtz-hzi.de

چکیده

مقدمه: میکسوباکترها باکتری‌های گرم منفی متعلق به گروه دلتاپروتئوباکترها با سلول‌های رویشی میله‌ای‌شکل و ارگانوتروف هستند که رفتار گروهی منحصربه‌فردی را نشان می‌دهند و در دستهٔ باکتری‌های خاک قرار می‌گیرند.

مواد و روش‌ها: جدایهٔ میکسوباکتریایی Mx18Zk از اندام گوارشی کرم خاکی منطقهٔ قائم‌شهر مازندران جداسازی شد. به‌منظور بررسی فعالیت زیستی باکتری استخراج حلالی محیط‌کشت انجام و عصارهٔ متانولی حاصل برای بررسی فعالیت زیستی علیه یازده نوع بیماری‌زای مختلف انسانی به روش رقت‌سازی در میکروپلیت بررسی شد. درنهایت، باقیماندهٔ عصارهٔ متانولی به‌وسیلهٔ HPLC فراکسیون‌گیری و دوباره علیه بیماری‌زاهای حساس آزمون شد.

نتایج: جدایهٔ Mx18Zk فعالیت ضدمیکروبی درخور توجهی علیه باکتری‌های شاخص *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Chromobacterium violaceum* نشان داد. بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی، توالی ژن *16S rDNA* و درخت فیلوژنی باکتری نشان داد این جدایه با ۱۰۰ درصد همولوژی به گونهٔ *Corallococcus macrosporus* تعلق دارد. عصاره‌های فعال با دستگاه LC/MS مطالعه شدند و نتایج آنها با متابولیت‌های ثانویهٔ میکسوباکتریایی شناخته‌شدهٔ موجود در بانک اطلاعاتی Myxobase مرکز HZI مقایسه شدند. تجزیه‌وتحلیل LC/MS عصارهٔ متانولی محیط‌کشت نشان‌دهندهٔ حضور یون مولکولی آنتی‌بیوتیک‌های میکسوکرومید و همچنین میکسوویریسین و میکسالامید گزارش‌نشده در این گونه بود.

بحث و نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج مشاهده‌شده سویهٔ جداسازی‌شده فعالیت ضدمیکروبی علیه باکتری‌های شاخص *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Chromobacterium violaceum* نشان داد و با ۱۰۰ درصد همولوژی به گونهٔ *Corallococcus macrosporus* تعلق داشت. تجزیه‌وتحلیل LC/MS نشان‌دهندهٔ حضور آنتی‌بیوتیک‌های گزارش‌نشدهٔ میکسوویریسین و میکسالامید و همچنین میکسوکرومید شناخته‌شده در این گونه بود.

واژه‌های کلیدی: *Corallococcus*، فعالیت زیستی، آنتی‌بیوتیک میکسوویریسین، میکسالامید و میکسوکرومید

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

ریزموجودات طیف وسیعی از مولکول‌های کوچک ساختاری را تولید می‌کنند که متابولیت‌های ثانویه نامیده می‌شوند. این مولکول‌ها که بر اساس تعریف بخشی از متابولیت‌های اولیه نیستند ارزش دارویی درخور توجهی دارند؛ برای نمونه، آنتی‌بیوتیک‌ها بخشی از متابولیت‌های ثانویه به شمار می‌روند (۱ و ۲). اگرچه این ترکیبات طبیعی برای سلامتی بشر مهم هستند عملکرد فیزیولوژیکی ریزموجودات تولیدکنندهٔ آنها ناشناخته است (۳). در جستجو برای یافتن ترکیبات طبیعی مفید، غربال‌گری ریزموجودات کمتر مطالعه‌شده امکان یافتن متابولیت‌های جدید را افزایش می‌دهد. طبق گزارش‌ها، میکسوباکترها دارای ویژگی‌های شایان توجهی مانند تولید بسیاری از متابولیت‌های ثانویه و رفتار شکارگر هستند (۴ و ۵) و برخی از آنها سلولز را تجزیه می‌کنند (۶).

میکسوباکترها کلاس غالب باکتری‌های گلایدینگ[1] و گروه متفاوتی از سایر ریزموجودات (ازنظر تاکسونومیکی) هستند که با هر زیستگاهی ازجمله چشمه‌های هیدروترمال[2] تا رودهٔ انسان‌ها و حیوان‌ها سازگار هستند و تنوع زیادی در سراسر جهان دارند. توزیع جهانی میکسوباکترها در خاک با ۱۳۹۸ نمونه‌برداری از ۶۴ کشور دنیا ثابت شده است (۷ و ۸). این دسته از باکتری‌ها با اگزوآنزیم‌های خود ماکرومولکول‌های زیستی، باکتری‌ها و مخمرها را لیز می‌کنند و به‌محض تمام‌شدن مادهٔ غذایی میکسوسپور و جسم زایشی[3] تشکیل می‌دهند. جسم زایشی مهم‌ترین و شاخص‌ترین ویژگی میکسوباکترهاست و تشکیل این ساختار چندسلولی در مواقع قحطی به اوج خود می‌رسد؛ اجسام زایشی رنگ‌های درخشانی دارند و با چشم غیرمسلح دیده می‌شوند. تاکنون از میکسوباکترها حدود ۱۰۰ ساختار پایه و حدود ۵۰۰ ترکیب مشتق‌شده از این ساختارها گزارش شده است که این گروه میکروبی بسیاری از آنها را به‌طور خاص تولید می‌کند (۹). اگرچه این ریزموجودات منابع خوبی برای ترکیبات جدید هستند در غربال‌گری‌های دارویی به‌خوبی مطالعه نشده‌اند؛ زیرا جداسازی آنها فرایندی طولانی و خالص‌سازی و نگهداری آنها دشوار است (۱۰).

میکسوباکترها به‌طورمعمول در خاک‌های خنثی یا کمی قلیایی یافت می‌شوند و از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از جنگل‌های بارانی گرمسیری، تندراهای قطبی، استپ‌ها، بیابان‌ها، باتلاق‌ها، سطح دریا و ارتفاعات زیاد جداسازی می‌شوند؛ باوجوداین، دیده شده است مناطق گرم و دارای فصل‌های خشک ازنظر تنوع میکسوباکترها غنی‌تر هستند. ایران ازنظر داشتن اقلیم زمستان گرم و مرطوب و تابستان خشک استپی مکان مناسبی برای میکسوباکترها به نظر می‌رسد زیرا میکسوسپورها خشکی و دمای زیاد را تحمل می‌کنند. مطالعه‌های داوید[4] (۲۰۰۰) و مرادی و همکاران[5] (۱۳۹۵) نشان‌دهندهٔ میانگین بسیار زیاد تعداد گونه‌ها بر نمونهٔ خاک در ایران هستند و این مطالعه‌ها نشان می‌دهند طیف گونه‌ها در ایران بسیار گسترده است (۱۱ و ۱۲).

هدف مطالعهٔ حاضر که دومین نمونه از این مطالعه‌ها در ایران است جداسازی و بررسی تولید متابولیت‌های ثانویهٔ زیست‌فعال در میکسوباکترهای بومی ایران است.

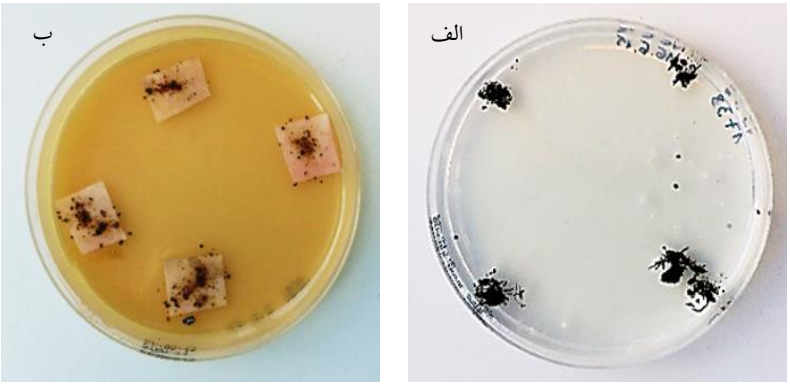
مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: جدایهٔ میکسوباکتر بررسی‌شده از دستگاه گوارش نمونهٔ کرم خاکی جنگل‌های قائم‌شهر واقع در استان مازندران جداسازی شد. این نمونه در دی‌ماه سال ۱۳۹۴ جمع‌آوری شد.

جداسازی: پس‌از انتقال نمونه به آزمایشگاه در شرایط استریل، به‌منظور افزایش دقت و اطمینان از تعلق نمونهٔ جداشده به فلور میکروبی دستگاه گوارش کرم خاکی (نمونه با غذا از خاک وارد نشده باشد) نمونه مشابه روش ون هورن و همکاران[۶] (۲۰۱۱) به مدت یک هفته در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شد و پیش‌از تشریح، به‌مدت ۱۰ دقیقه درون الکل ۲۰ درصد و آب ولرم استریل شد. سپس دستگاه گوارش آن در شرایط استریل با قیچی بریده شد و نمونه با پنس به محیط کشت‌های مدنظر منتقل شد (۱۳). دو روش برای جداسازی میکسوباکترها از نمونه استفاده شد:

در روش اول، محیط کشت WATآگار شامل ۰/۱ درصد $CaCl_2.\ 2H_2O$ (وزنی/حجمی)، Agar ۱/۵ درصد (وزنی/حجمی) و HEPES ۲۰ میلی‌مولار (۶) دارای سیکلوهگزمید[۷] (۱۰۰ میکروگرم‌برمیلی‌لیتر) تهیه و باکتری *E. coli.* ATCC 25922 به‌شکل متقاطع وسط آن کشت شد؛ سپس نمونه به‌اندازهٔ یک نخود به هریک از چهار انتهای خطوط کشت *E. coli* منتقل (شکل ۱، الف) و پلیت به‌مدت یک هفته در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شد؛ پس‌ازآن، تشکیل جسم زایشی و خزش میکسوباکتر زیر لوپ دوچشمی Olympus SZX12 بررسی شد.

در روش دوم، محیط ST21آگار شامل محلول A: ۰/۱ K_2HPO_4 درصد (وزنی/حجمی)، Yeast extract (Difco) ۰/۰۰۲ درصد (وزنی/حجمی)، Agar ۱/۵ درصد (وزنی/حجمی) و محلول B: ۰/۱ KNO_3 درصد (وزنی/حجمی)، ۰/۲ $MgSO_4.\ 7H_2O$ درصد (وزنی/حجمی)، ۰/۱ $CaCl_2.\ 2H_2O$ درصد (وزنی/حجمی)، ۰/۰۲ $FeCl_3$ درصد (وزنی/حجمی) و ۰/۰۱ $MnSO_4.\ 7H_2O$ درصد (وزنی/حجمی) (۶) دارای سیکلوهگزمید (۱۰۰ میکروگرم‌برمیلی‌لیتر) تهیه شد و سلولز (منبع کربن) به‌شکل چهار عدد کاغذ فیلتر استریل در ابعاد تقریباً ۲×۲ سانتی‌متر در چهار طرف پلیت قرار گرفت. نمونه به‌اندازهٔ یک نخود به مرکز کاغذهای فیلتر منتقل (شکل ۱، ب) و پلیت به‌مدت یک هفته در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شد؛ سپس تشکیل جسم زایشی و خزش میکسوباکتر بررسی شد.



شکل ۱- نمونه‌گذاری از دستگاه گوارش کرم خاکی. الف. محیط WATآگار با کشت متقاطع *E. coli* که نمونه به‌شکل نقاط تیره‌رنگ مشخص است، ب. ST21آگار با کاغذ فیلتر (منبع سلولز) که نمونه به رنگ قهوه‌ای دیده می‌شود.

خالص‌سازی: خالص‌سازی جدایه ابتدا با انتقال مستقیم رأس جسم زایشی جوان به محیط VY/2آگار شامل Bakers' yeast ۰/۵ درصد (وزنی/حجمی)، Agar ۱/۵ درصد (وزنی/حجمی)، Cyanocobalamin ۰/۵ میلی‌گرم، $CaCl_2.\ 2H_2O$ ۰/۱ درصد (وزنی/حجمی) (۶) به‌وسیلهٔ سرنگ انسولین و برای چند مرتبه انجام شد و سپس جسم زایشی از این محیط به چهار رأس کشت متقاطع *E. coli* زنده روی محیط WATآگار منتقل شد؛ این انتقال چند مرتبه تا خالص‌سازی کامل تکرار شد.

نگهداری بلندمدت: جدایه در محیط کشت مایع CY/H شامل casitone ۰/۳ درصد، yeast extract (Marcor typ 9000) ۰/۱ درصد، $CaCl_2.\ 2H_2O$ ۰/۱ درصد، HEPES (11.8) ۵۰ میلی‌مولار (اسیدیتهٔ ۷/۲) و Agar ۱/۶ درصد (۶) کشت و به‌مدت ۷ روز در ۱۶۰ دوردردقیقه (rpm) و ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شد. از کشت مایع حاصل برای نگهداری بلندمدت در فریزر منفی ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد استفاده شد.

شناسایی و رده‌بندی: لوپ دوچشمی Olympus SZX12 برای بررسی ریخت‌شناسی اجسام زایشی و میکروسکوپ نوری برای بررسی سلول‌های رویشی و میکسوسپورها استفاده شد. شناسایی ریخت‌شناختی بر اساس کلید شناسایی ریشنباخ و دورکین[۸] (۱۹۹۲) انجام شد (۱۴).

از آزمون API ZYM® برای بررسی ۱۹ واکنش آنزیمی و تعیین پروفایل آنزیمی باکتری استفاده شد و درنهایت ویژگی‌های بیوشیمیایی باکتری مشخص شدند. دمای بهینهٔ رشد باکتری با کشت روی پلیت VY/2آگار در چهار دمای ۲۲، ۳۰، ۳۷ و ۴۴ درجهٔ سانتی‌گراد و گرماگذاری به‌مدت حداقل یک هفته و مقایسهٔ قطر رشد باکتری در چهار دما تعیین شد. برای تعیین اسیدیتهٔ بهینه، محیط VY/2آگار با اسیدیته‌های ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ تهیه و جدایه روی آنها منتقل و به‌مدت حداقل یک هفته در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شد؛ سپس قطر رشد باکتری در اسیدیتهٔ ۵ اندازه‌گیری و بهترین اسیدیتهٔ رشد تعیین شد. ۱۳ پلیت VY/2آگار حاوی ۱۳ نوع آنتی‌بیوتیک به شرح جدول ۱ برای تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری استفاده شدند؛ به‌این ترتیب که ابتدا محیط کشت یادشده آماده و استریل شد و پس‌از رسیدن به دمای ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد، غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها درون پلیت فیلتر شدند و محیط کشت به آن اضافه شد.

جدول۱- آنتی‌بیوتیک‌های استفاده‌شده در شناسایی و غلظت آنها

آنتی‌بیوتیک	غلظت نهایی
پلی‌میسن ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر	۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر
جنتامیسین ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر	۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر
اکسی‌تتراسایکلین ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر	۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر
آمپی‌سیلین ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر	۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر
کلرامفنیکل ۹ میلی‌گرم/میلی‌لیتر	۳۰ میکروگرم/میلی‌لیتر
اسپکتریومایسین ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر	۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر
کانامایسین ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر	۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر
سفالوسپورین ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر	۵۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر
فوزیدیک‌اسید ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر	۵۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر
باسیتراسین ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر	۵۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر
تیواسترپتون ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر	۵۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر
تری‌متوپریم ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر	۵۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر
هیگرومایسین ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر	۱۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر

باکتری با سوزن استریل‌شده به پلیت‌های آنتی‌بیوتیک منتقل و حداقل به‌مدت یک هفته در ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شد؛ پس‌از این مدت، رشدکردن یا نکردن باکتری در حضور آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بررسی شد. پلیت کشت VY/2آگار بدون آنتی‌بیوتیک برای شاهد استفاده شد تا بتوان نتایج را بر اساس آن مقایسه کرد.

به‌منظور بررسی فیلوژنتیکی جدایه، DNA طبق پروتکل استاندارد باکتری‌های گرم منفی و با استفاده از کیت Invisorb Spin Plant Mini (Invitek, Germany) استخراج شد. DNA جداسازی‌شده با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و با استفاده از آغازگرهای عمومی F27 و R1525 و برنامهٔ دمایی جدول ۲ تکثیر شد. در مرحلهٔ بعد، محصول PCR با استفاده از کیت NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) خالص و با همان آغازگرها توالی‌یابی شد. توالی‌های حاصل با نرم‌افزار SeqMan II نسخهٔ ۶ به هم متصل شدند تا توالی کامل ژن حاصل شود؛ سپس این توالی با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی EzBioCloud مقایسه شد. درخت فیلوژنی (تبارنما) با نرم‌افزار بیژین بر مبنای ناحیهٔ ژنی ITS برای جدایه‌های مطالعه‌شده در پژوهش حاضر و جدایه‌های موجود در بانک ژن ترسیم شد. تجزیه‌وتحلیل بیژین با PAUP v.4.0b10 و MrBayes v3.2.2 انجام شد (۱۵). مناسب‌ترین الگوی تکامل با Mrmodeltest v.2.2 تخمین زده شد (۱۶).

جدول ۲- چرخهٔ دمایی PCR

مرحله	زمان (دقیقه)	دما (درجهٔ سانتی‌گراد)
واسرشت اولیه	۵	۹۵
۳۴ چرخهٔ واسرشت	۰/۵	۹۴
اتصال آغازگر	۰/۵	۵۲
طویل‌سازی	۲	۷۲
طویل‌سازی نهایی	۱۰	۷۲

غربال‌گری فعالیت ضدمیکروبی: پیش‌کشت جدایهٔ میکسوباکتریایی Mx18Zk در چهار محیط کشت مختلف Myxoviresin شامل casein peptone ۱ درصد، $CaCl_2$ ۰/۰۰۵ درصد، $MgSO_4$ ۰/۰۲۵ درصد، $CoCl_2$ ۱ میلی‌گرم‌درلیتر، HEPES ۱۰۰ میلی‌مولار و ویتامین B_{12} با غلظت نهایی ۵۰۰ میکروگرم‌برلیتر؛ محیط P شامل peptone ۰/۲ درصد، starch ۰/۸ درصد، Probion ۰/۴ درصد، yeast extract ۰/۲ درصد، $CaCl_2$. $2H_2O$ ۰/۱ درصد، $MgSO_4$. $4H_2O$ ۰/۱ درصد، HEPES ۱۰۰ میلی مولار، Fe-EDTA (اسیدیتهٔ ۷/۵) ۸ میلی‌گرم‌درلیتر، Agar ۱/۶ درصد؛ E شامل glucose ۰/۲ درصد، starch ۰/۸ درصد، $CaCl_2$. $2H_2O$ ۰/۱ درصد، $MgSO_4$. $4H_2O$ ۰/۱ درصد، HEPES ۵۰ میلی‌مولار و محیط H شامل soy flour ۰/۲ درصد، glucose ۰/۲ درصد، starch ۰/۸ درصد، yeast extract ۰/۲ درصد، $CaCl_2$. $2H_2O$ ۰/۱ درصد، 2x $MgSO_4$. $4H_2O$ ۰/۱ درصد، HEPES ۵۰ میلی‌مولار و Fe-EDTA ۸ میلی‌گرم‌برلیتر (۶) تهیه شد و ۱۰ میلی‌لیتر از آن به محیط‌کشت‌های Myxoviresin، P، E و H حاوی ۲ درصد رزین XAD4 (Sigma, USA) تلقیح و به‌مدت ۱۲ روز در ۱۶۰ دوردردقیقه و ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پس‌از این دوره، رزین و توده‌های میکسوباکتر از محیط‌کشت جدا و پس‌از شستشو با آب دیونیزه، استخراج عصاره از رزین با ۷۰ میلی‌لیتر استون انجام شد. عصارهٔ استونی در ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد با روتاری (Heidolph, Germany) خشک و سپس در ۱ میلی‌لیتر متانول حل شد. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصارهٔ متانولی جدایهٔ میکسوباکتریایی Mx18Zk به روش رقت‌سازی در میکروپلیت ۹۶ چاهکی (BRAND, Germany) (۱۷) علیه ریزموجودات شاخص شامل *Escherichia coli* DSM 116، *Escherichia coli* TolC، *Staphylococcus aureus* (Newman)، *Candida albicans* DSM 1665، *Pseudomonas aeruginosa* DSM 19882، *Bacillus subtilis* DSM10s،

Micrococcus luteus DSM1790، *Chromobacterium violaceum* DSM30191، *Pichia anomala* DSM6766، *Mycobacterium smegmatis* ATCC 700084 و *Mucor heimalis* DSM2656 مطالعه شد. محیط‌کشت مولرهینتون‌براث (MHB) برای باکتری‌های شاخص و محیط‌کشت MYC (۱۸) برای مخمر و قارچ شاخص استفاده شد. کدورت باکتری‌های آزمون در محیط‌کشت MHB ۰/۰۵ مک‌فارلند و کدورت قارچ و مخمرهای آزمون در محیط‌کشت MYC ۰/۰۱ مک‌فارلند بود. چنانچه عصاره در رقت‌های بیشتر از یک‌هشتم روی هرکدام از ریزموجودات بازدارندگی ایجاد می‌کرد با HPLC و طیف‌سنجی جرمی بررسی می‌شد.

شناسایی متابولیت: عصارهٔ متانولی به‌شکل خودکار و در حجم ۵ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق شد. HPLC Agilent 1100 مجهز به ستون X-Bridge (Waters, Milford, USA) با ذرات ۳/۵ میکرومتر و ابعاد ۱۰۰×۲/۱ میلی‌متر و مجهز به آشکارساز (۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر) DAD با سیستم حلالی A شامل بافر آمونیوم‌استات ۰/۰۵ میلی‌مولار (اسیدیتهٔ ۵) و B شامل استونیتریل و بافر آمونیوم‌استات ۰/۰۵ میلی‌مولار در شدت جریان ۰/۳ میلی‌متردردقیقه انجام شد. فراکسیون‌گیری به روش برش زمانی هر ۳۰ ثانیه به‌طور خودکار در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای انجام شد. فراکسیون‌ها با دستگاه MiniVap (Porvair Sciences, UK) در جریان نیتروژن ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد خشک شدند. سپس چاهک‌های پلیت با ۱۵۰ میکرولیتر ریزموجود شاخص حساس به این عصاره تلقیح شد.

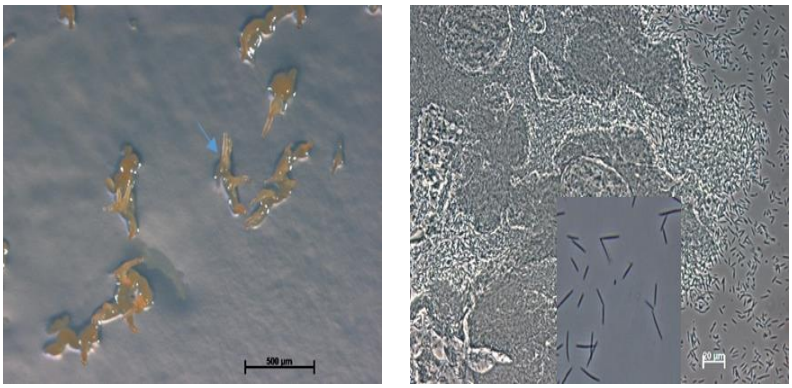
از عصارهٔ متانولی برای انجام LC/MS استفاده شد که شامل سیستم HPLC Agilent 1100 مجهز به آشکارساز (۲۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر) DAD در اتصال به اسپکترومتر جرمی maXis UHR-TOF (Bruker Daltonics, USA) بود. عصاره به‌وسیلهٔ ستون ACQUITY UPLC BEH C18 (Waters, Milford, USA) در ابعاد ۵۰×۲/۱ میلی‌متر و با ذرات ۱/۷ میکرومتر تجزیه‌وتحلیل شد. شرایط کروماتوگرافی برای انجام LC/MS با دمای محفظهٔ ستون ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد، شدت جریان ۰/۶ میلی‌متردردقیقه، حلال A (۰/۱ درصد فرمیک‌اسید)، حلال B (استونیتریل حاوی ۰/۱ درصد فرمیک‌اسید)، شیب غلظت ۵ درصد B در دقیقه ۰/۵ تا ۹۵ درصد B در دقیقه ۱۰ و ثابت در ۹۵ درصد B تا دقیقه ۱۹/۵. یون‌سازی به روش ESI[۹] در حالت مثبت انجام شد و نتایج با نرم‌فزار Bruker Compass DataAnalysis 4.2 بررسی شدند. ترکیبات فعال بر اساس مقایسهٔ نتایج LC/MS، طیف UV و زمان بازداری در HPLC با پایگاه داده‌های Myxobase شناسایی شدند.

نتایج

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی جدایهٔ Mx18Zk: جدایهٔ Mx18Zk از دستگاه گوارش کرم خاکی با استفاده از پلیت حاوی کاغذ نیتروسلولزی (منبع کربن) جداسازی و به روش انتقال مستقیم از جسم زایشی روی پلیت طعمه‌گذاری‌شده با کشت *E. coli* خالص‌سازی شد. این جدایهٔ میکسوباکتر گرم منفی، هوازی و دارای سلول‌های میله‌ای با دو انتهای تیز بود و اجسام زایشی کشیده و نارنجی‌رنگی تولید می‌کرد که شباهت آن با جنس *Corallococcus* را نشان می‌دادند (شکل ۲). رشد جدایهٔ Mx18Zk در محدودهٔ اسیدیتهٔ ۶ تا ۱۰ و اسیدیتهٔ بهینهٔ ۷ و محدودهٔ دمایی ۲۰ تا ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و دمای بهینهٔ ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد مشاهده شد.

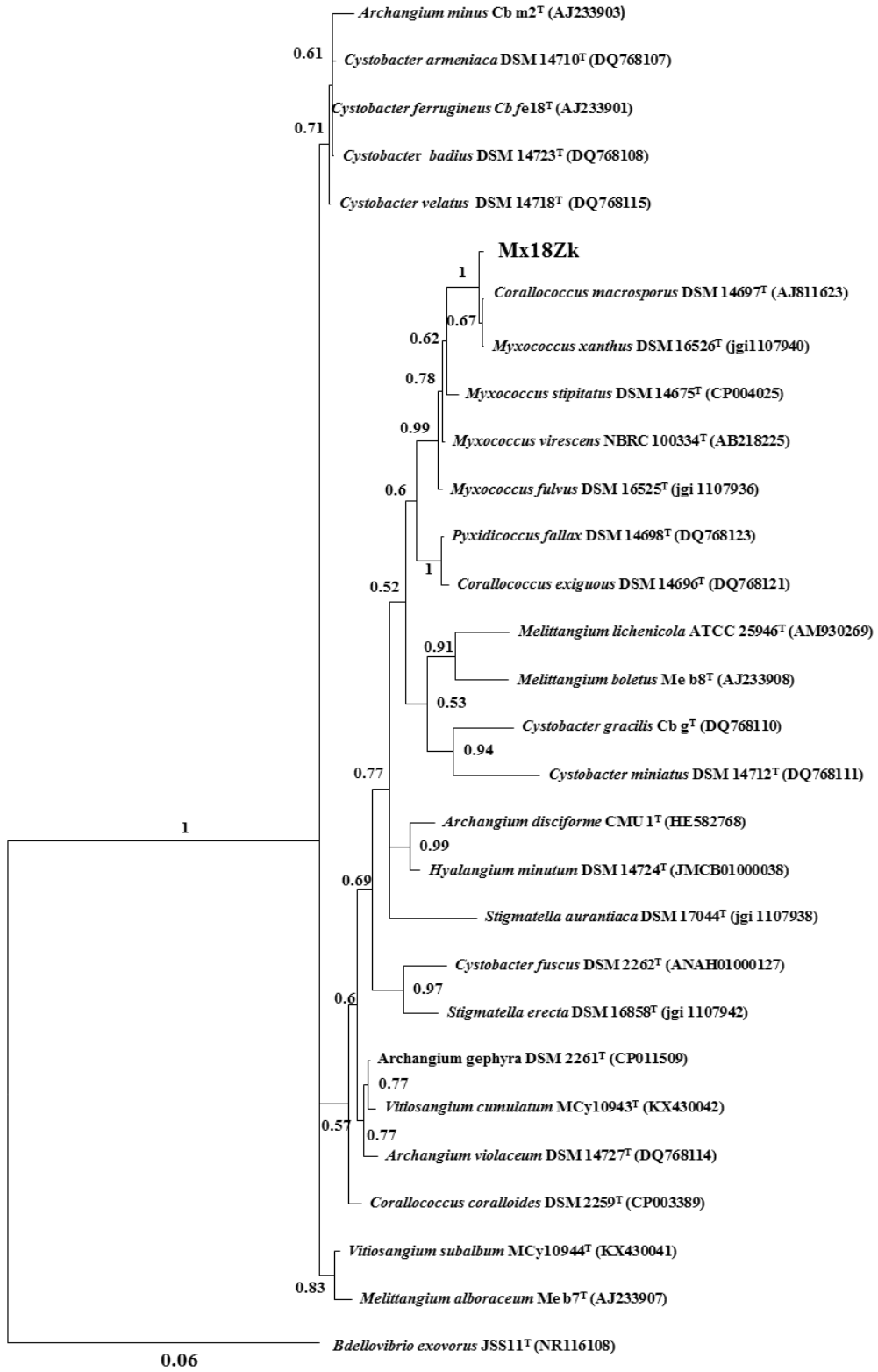
نتایج آزمون فعالیت آنزیمی API ZYM این گونه فعالیت آنزیم‌های آلکالین‌فسفاتاز، C4استراز، C8استرازلیپاز، C14لیپاز، لوسین‌آریل‌آمیدازی، والین‌آریل‌آمیداز، سیستئین‌آریل‌آمیداز، آلفاکموتریپسین، نفتول‌AS-BI–فسفوهیدرولاز، آلفاگلوکوزیداز و بتاگلوکوزیداز و فعالیت‌نداشتن آنزیم‌های تریپسین، آلفاگالاکتوزیداز و بتاگالاکتوزیداز، بتاگلوکورونیداز، N–استیل‌بتاگلوکورومینیداز، آلفامانوزیداز و آلفافوکوزیداز را در این باکتری نشان دادند.

مقاومت جدایه به آمپی‌سیلین، باسیتراسین، اسپکتینومایسین، کانامایسین، جنتامایسین، پلی‌مایسین، فوزیدیک‌اسید، تری‌متوپریل و هایگرومایسین و حساسیت آن به اکسی‌تتراسایکلین، سفالوسپورین، تیوستریتون و کلرامفنیکل به همراه ویژگی‌های ریخت‌شناختی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایهٔ Mx18Zk نشان دادند این جدایه بر اساس کلید شناسایی ریشنباخ و دورکین (۱۴) به گونهٔ *Corallococcus macrosporus* تعلق دارد.



شکل۲. جدایه Mx18Zk. الف. سلول‌های رویشی باریک و بلند با دو انتهای تیز با مقیاس ۲۰ میکرومتر پس‌از رشد درون محیط CY/H، ب. جسم زایشی کشیده، بزرگ، سفت، بدون پایه و غالباً منفرد با مقیاس ۵۰۰ میکرومتر روی محیط VY2 جامد که ویژگی جنس *Corallococcus* است.

تجزیه‌وتحلیل توالی *16S rDNA* جدایهٔ Mx18Zk و تجزیه‌وتحلیل فیلوژنتیک آن: مقایسهٔ توالی ۱۲۱۰ بازی *16S rDNA* جدایهٔ Mx18Zk با توالی سویه‌های شاخص میکسوباکترها در پایگاه اطلاعاتی EzBioCloud نشان داد این جدایه ۱۰۰ درصد به سویهٔ *C. macrosporus* DSM 14697^T شباهت دارد. درخت فیلوژنی با نرم‌افزار بیژین رسم شد. فایل رج‌بندی‌شدهٔ نهایی شامل ۲۸ آرایهٔ داخلی، ۸۸۰ کاراکتر و ۱۴۶ الگوی مکانی منحصربه‌فرد بود. بر اساس نتایج نرم‌افزار مدل تست، بهترین مدل جایگزینی GTR+I+G بود. گونهٔ *Bdellovibrio exovorus* JSS11^T (NR116108) نیز به‌عنوان آرایهٔ خارجی به کار گرفته شد. تجزیه‌وتحلیل بیژین به ۳۹۲۲ تبارنما منتهی شد. پس‌از حذف ۲۵ درصد تبارنماهای جمع‌آوری‌شده برای مرحلهٔ burn-in، تبارنماهای اجمالی و توزیع احتمال پسین خوشه‌ها از ۲۹۴۲ (۷۵ درصد) تبارنمای باقیمانده محاسبه شد. نتایج نشان دادند سویهٔ Mx18 در دستهٔ (کلاد) مشابهی با *Corallococcus macrosporus* DSM 14697^T (AJ811623) قرار می گیرد و با اعتبارسنجی زیاد به همراه سایر جدایه‌های دریافت‌شده از بانک ژن (شکل ۳) گروه‌بندی می‌شود.



شکل ۳. تبارنمای اجمالی برآیند ۲۹۴۲ تبارنمای حاصل از استنتاج بیژین رج‌بندی توالی ناحیهٔ ITS با نرم‌افزار MrBayes v.3.2.2 برای گونه های *Corallococcus* مقیاس، ۰/۰۶ تغییر مورد انتظار در هر مکان را نشان می دهد. گونه *Bdellovibrio exovorus JSS11^T (NR116108)* به عنوان آرایه خارجی در نظر گرفته شده است (۱۵ و ۱۶).

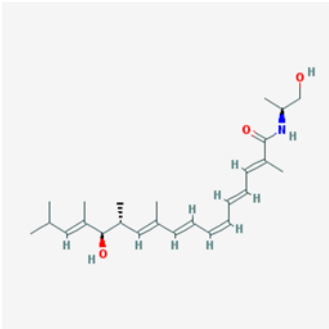
کشت مایع میکسوباکتر: جدایهٔ Mx18Zk جداشده در پژوهش حاضر در چهار محیط کشت مایع Myxoviresin، P، E و H تقریباً مشابه و به‌شکل توده‌ای و غیرهموژن رشد کرد و حتی با چندین بار انتقال در کشت مایع کشت هموژن ایجاد نشد؛ ازاین‌رو برای ادامهٔ بررسی از توده‌های باکتریایی استفاده شد.

فعالیت ضدمیکروبی و ترکیبات فعال زیستی جدایهٔ Mx18Zk جداشده در پژوهش حاضر: نتایج نشان دادند عصارهٔ متانولی جدایهٔ Mx18ZK حاصل از محیط کشت‌های E و H دارای فعالیت ضدمیکروبی قوی‌تری نسبت به دو محیط Myxoviresin و P است و بیشترین فعالیت ضدمیکروبی خود را علیه ریزموجودات گرم منفی *E. coli* DSM تا رقت یک‌سی‌ودوم (چاهک E پلیت ۹۶ چاهکی که دارای ۸ ردیف است) و *E. coli* TolC تا رقت اخر (چاهک H پلیت)، علیه *C. violaceum* گرم مثبت تا رقت یک‌سی‌ودوم و باکتری شاخص *S. aureus* تا رقت یک‌شانزدهم نشان می‌دهد؛ بنابراین عصاره‌ها با HPLC فراکسیون‌گیری شدند و آزمون زیستی علیه این سه ریزموجود انجام شد. آزمون فعالیت ضدباکتریایی فراکسیون‌های HPLC نشان داد فراکسیون‌های دقایق ۲۲ تا ۲۴ و ۲۶ تا ۳۲ دارای فعالیت زیستی هستند. جدول ۳ نتایج مربوط به بررسی LC/MS را نشان می‌دهد.

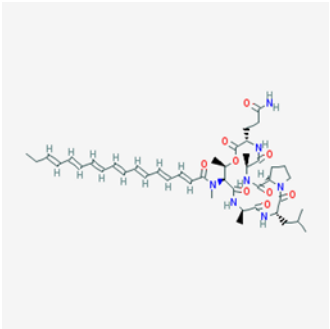
مقایسهٔ نتایج به‌دست‌آمده از زمان بازداری و وزن مولکولی این پیک‌ها با پایگاه داده‌ها به‌وسیلهٔ نرم‌افزار به شناسایی این پیک‌ها به‌عنوان میکسوویریسین، میکسوکرومید و میکسالامید منجر شد (شکل ۴).

جدول ۳- نتایج تجزیه‌وتحلیل LC/MS با استفاده از زمان بازداری و وزن مولکولی پیک‌های به‌دست‌آمده از بانک اطلاعاتی Myxobase

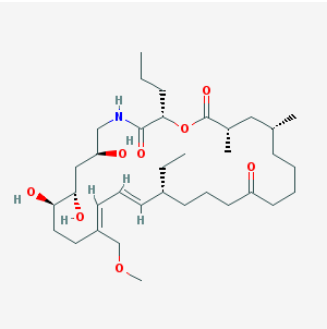
نتایج تجزیه‌وتحلیل فراکسیون‌ها	زمان فراکسیون‌ها	ریزموجودات
Myxovirescins, Myxalamides	۲۱/۵ تا ۲۲/۵ دقیقه	*C. violaceum*
Myxovirescins	۲۹/۵ دقیقه	
Myxovirescin, Myxalamides	۲۱/۵ تا ۲۳/۰ دقیقه	*E. coli*
Myxovirescins	۲۶/۰ تا ۲۶/۵ دقیقه	
Myxovirescins	۲۸/۵ تا ۳۰/۵ دقیقه	
Myxovirescins, Myxalamides Myxochromids	۲۱/۵ تا ۲۳/۰ دقیقه	*S. aureus*



Myxalamid



Myxochromid



Myxovirescin

شکل ۴- شناسایی متابولیت‌های فعال جدایهٔ Mx18Zk جداسازی‌شده در پژوهش حاضر از چپ به راست به‌ترتیب ساختار مولکولی میکسوویریسین با فرمول شیمیایی $C_{35}H_{61}NO_8$، میکسوکرومید $C_{44}H_{63}N_7O_9$ و میکسالامید $C_{25}H_{39}NO_3$

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعهٔ حاضر، جدایهٔ میکسوباکتریایی Mx18Zk برای نخستین‌بار از دستگاه گوارش نمونهٔ کرم خاکی برداشته‌شده از منطقهٔ قائم‌شهر مازندران ایران جداسازی شد. به‌طورکلی، جداسازی میکسوباکترها به‌علت کندی رشد مشکل است زیرا احتمال آلودگی با باکتری‌های سریع‌رشد و قارچ‌ها افزایش می‌یابد؛ به‌طوری‌که حتی بازیابی کشت خالص سویه‌های جداسازی‌شده به‌علت آلودگی‌ها مشکل و زمان‌بر است (۶). تاکسونومی میکسوباکترها بر پایهٔ ویژگی‌های ریخت‌شناختی مانند شکل و اندازهٔ سلول‌های رویشی و میکسوسپورها، رنگ و نوع اجسام زایشی و خزش باکتری است (۱۴ و ۱۹). بررسی این ویژگی‌ها نشان داد سویهٔ Mx18Zk به گونهٔ *Corallococcus macrosporous* تعلق دارد که نخستین‌بار کریزمینویسکی و کریزمینویسکا[۱۰] در سال ۱۹۲۶ آن را شرح دادند (۲۰). در ابتدا رده‌بندی میکسوباکترها بر اساس ریخت‌شناسی انجام می‌شد که تمایز بین گونه‌های مختلف بسیاری از جنس‌ها را مشکل می‌کرد اما به‌تازگی شناسایی فیلوژنتیکی بر اساس تجزیه‌وتحلیل توالی *16S rDNA* در کنار روش‌های ریخت‌شناختی برای میکسوباکترها انجام می‌شود. توالی‌یابی ژن *16S rRNA* نیز شناسایی ۱۰۰ درصدی این جدایه را به‌عنوان *C. macrosporous* تأیید کرد. جداسازی و خالص‌سازی این گونه به‌علت اجسام زایشی‌ای که خارج از سطح آگار رشد می‌کنند و میکسوسپور فراوانی تولید می‌کنند نسبت به برخی میکسوباکترها که داخل آگار رشد می‌کنند و خزش و اجسام زایشی ضعیفی تولید می‌کنند آسان‌تر است (۲۱).

امروزه، افزایش تعداد بیماری‌زاهای مقاوم به دارو به‌ویژه شیوع سویه‌های میکروبی چندمقاومتی به مشکلی جدی در سراسر جهان تبدیل شده و سلامت عموم را به خطر انداخته است؛ بنابراین، نیاز به کشف مواد ضدمیکروبی و درمان بهتر برای این عفونت‌ها به‌ویژه در بیمارستان‌ها که مقاومت به‌طور تهدیدآمیزی شیوع می‌یابد ضروری است (۲۲ و ۲۳). در این راستا، طی ۶۰ سال گذشته بین ۳۰۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰ ترکیب طبیعی از ریزموجودات به‌ویژه قارچ‌ها و باکتری‌های جداشده از خاک به دست آمده است که بیش از ۱۰۰۰۰ نمونهٔ آنها دارای فعالیت زیستی هستند و بیشتر آنها شامل آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضدتوموری هستند و ۲۵۰ مورد آنها کاربرد بالینی دارند. جستجوی منابع مختلف در سراسر دنیا به کشف عوامل ضدمیکروبی بسیاری منجر شده است که دارای ارزش درمانی بسیار برای مقابله با بیماری‌های عفونی هستند. در این میان، تمرکز اصلی روی ترکیباتی است که دارای فعالیت آنتی‌بیوتیکی با طیف وسیع هستند؛ هرچند یافتن چنین ترکیباتی بسیار دشوار است (۲۴).

میکسوباکترها یکی از روزنه‌های امید کشف و توسعهٔ عوامل ضدمیکروبی جدید در جهان محسوب می‌شوند و از ۳۰ سال پیش تاکنون به یکی از جذاب‌ترین موضوع‌های میکروبیولوژی تبدیل شده‌اند (۱۱). میکسوباکترها پتانسیل زیادی برای تولید متابولیت‌های ثانویه از خود نشان می‌دهند که این به‌علت وجود سازوکارهای جدید عملکرد و تولید ویژهٔ این دسته از باکتری‌ها است (۲۵). به‌منظور ارزیابی توانایی تولید متابولیت‌های ثانویهٔ جدایهٔ Mx18Zk فرایند کشت، استخراج و آزمون فعالیت ضدمیکروبی انجام شد که نشان می‌دهد این جدایه فعالیت ضدباکتریایی زیادی علیه *E. coli*، *C. violaceum* و *S. aureus* دارد. بررسی‌های HPLC و LC/MS عصاره به شناسایی آنتی‌بیوتیک میکسوکرومید که قبلاً نیز در این گونه گزارش شده

است و آنتی‌بیوتیک‌های میکسوویریسین و میکسالامید که برای نخستین‌بار در این گونه گزارش می‌شوند منجر شدند. میکسوکرومید نخستین‌بار در سال ۲۰۰۵ از *Stigmatella aurantiaca* گزارش شد. این متابولیت ثانویه سازوکار مولکولی ناشناخته‌ای دارد و تاکنون از گونه‌های *Myxococcus fulvus*، *Myxococcus virescens*، *Myxococcus xanthus*، *Nannocystis pusilla*، *Corallococcus macrosporous* و *Stigmatella aurantiaca* جداسازی شده است. میکسوویریسین نخستین‌بار در سال ۱۹۸۲ از *M. virescens* گزارش شد. این آنتی‌بیوتیک متابولیت مرکبی از پلی‌کتید و پپتید غیرریبوزومی است و با عمل‌کردن در مراحل اولیهٔ سنتز دیواره، قرارگیری N-استیل گلوکزآمین را مهار می‌کند (۲۶). میکسوویریسین اتصالی قوی با سطوح مختلف مانند بافت دندان و پلاستیک ایجاد می‌کند و در همان حال، فعالیت آنتی‌بیوتیکی خود را نیز حفظ می‌کند. این مشاهده‌ها سبب بررسی کاربرد آن در درمان پلاک دندانی و ژنژیویتیس و عفونت‌های ادراری وابسته به کاتر شده‌اند. درحال‌حاضر، میکسوویریسین از گونه‌های *Myxococcus virescens*، *Myxococcus xanthus* و *Pyxidiococcus fallax* گزارش شده است که نخستین گزارش از *Corallococcus macrosporous* جداسازی‌شده در پژوهش حاضر است (۲۷). میکسالامید ضدقارچی است که نخستین‌بار در سال ۱۹۸۳ از *M. xanthus* و سپس از *S. aurantiaca* گزارش شد. میکسالامید از گونه‌های *Corallococcus exiguous*، *Myxococcus fulvus* و *Pyxidiococcus fallax* نیز گزارش شده است اما برای نخستین‌بار است که از *macrosporous Corallococcus* جداسازی‌شده در پژوهش حاضر گزارش می‌شود (۲۸).

جدایهٔ Mx18Zk جداسازی‌شده در پژوهش حاضر نتایج امیدبخشی در آزمون‌های ابتدایی نشان داد که اهمیت این منبع جدید و بالقوه را برای تولید آنتی‌بیوتیک‌ها نشان می‌دهد. همچنین با استناد به این نمونه، موجودات زنده مانند کرم خاکی علاوه‌بر نمونه‌های خاک، چوب پوسیده و ... که قبلاً وجود میکسوباکترها در آنها اثبات شده است منبع جدیدی از این نوع باکتری‌ها و طبعاً منبع جدیدی از وجود متابولیت‌های ثانویه مانند آنتی‌بیوتیک‌ها معرفی می‌شوند. امید است در آینده ترکیبات جدید و فعالی از این منابع به دست آید.

سپاسگزاری

نویسنده از مؤسسهٔ Helmholtz Centre for Infection Research (HZI) شهر برانشوایگ آلمان برای فراهم‌کردن تجهیزات و حصول نتایج سپاسگزاری می‌کند.

References

(1) Li JW., Vederas JC. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* 2009; 325: 161-165.

(2) Walsh C. Where will new antibiotics come from? *Nature Reviews Microbiology* 2003; 1: 65-70.

(3) Davies J. Are antibiotics naturally antibiotics? *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2006; 33: 496-499.

(4) Berleman JE., Kirby JR. Deciphering the hunting strategy of a bacterial wolfpack. *FEMS Microbiology Reviews* 2009; 33: 942-957.

(5) Weissman KJ., Muller RA. Brief tour of myxobacterial secondary metabolism. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2009; 17: 2121-2136.

(6) Shimkets LJ., Dworkin M., Reichenbach H. The myxobacteria. In: *The prokaryotes*. New York: Springer NY; 2006.

(7) Cascaval D., Galaction AI. New extraction techniques on bioseparations: 1. Reactive extraction. *Hemijska industrija* 2004; 58(9): 375-386.

(8) Rokem JS., Lantz AE. Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Natural Product Reports* 2007; 24(6): 1262.

(9) Weissman KJ., Müller R. Myxobacterial secondary metabolites: and modes-of-action. *Natural Product Reports* 2010; 27(9): 1276-1295.

(10) Reichenbach H., Höfle G. Myxobacteria as producers of secondary metabolites. *Drug Discovery from Nature* 1999; 79-149.

(11) Dawid W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiology Reviews* 2000; 24(4): 403-427.

(12) Moradi A., Ebrahimipour GH., Mohr KI., Kämpfer P., Glaeser SP., Hennessen F., et al. Racemic cystis iranensis sp. nov., a novel myxobacterium from Iranian soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2017; 67: 472-478.

(13) Van Horn D., Garcia JR., Loker ES., Mitchell KR., Mkoji GM., Adema CM., et al. Complex intestinal bacterial communities in three species of planorbid snails. *Journal of Molluscan Studies* 2011; 78(1): 74-80.

(14) Reichenbach H., Dworkin M. The myxobacteria. In: *The prokaryotes*. New York: Springer NY; 1992.

(15) Ronquist F., Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 2003; 19: 1572-1574.

(16) Nylander JAA. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Uppsala: Evolutionary Biology Centre; 2004.

(17) Wiegand I., Hilpert K., Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols* 2008; 3(2): 163-175.

(18) Cazin J., Wiemer DF., Howard, JJ. Isolation, growth characteristics, and long-term storage of fungi cultivated by attine ants. *Applied and environmental microbiology* 1989; 55(6): 1346-1350.

(19) Spröer C., Reichenbach H., Stackebrandt E. The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1999; 49(3): 1255-1262.

(20) Krzemieniewska H., Krzemieniewski S. Miksobakterje Polski (Die Myxobakterien von Polen). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 1926; 4: 1-54.

(21) Zhang L., Wang H., Fang X., Stackebrandt E., Ding Y. Improved methods of isolation and purification of myxobacteria and development of fruiting body formation of two strains. *Journal of Microbiological Methods* 2003; 54(1): 7-21.

(22) Darabpour E., Ardakani MR., Motamedi H., Ghezelbash G., Ronagh MT. Isolation of an antibiotic producer Pseudomonas sp. from the Persian Gulf. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2010; 3(4): 318-321.

(23) Shlaes DM., Projan SJ., Edwards JE. Antibiotic discovery: state of the state. *ASM News-American Society for Microbiology* 2004; 70(6): 275-281.

(24) Schmitz A., Felder S., Höver T., Kehraus S., Neu E., Lohr F., et al. Antibiotics from gliding bacteria. *Phytochemistry Reviews* 2012; 1-10.

(25) Reichenbach H. Myxobacteria,

producers of novel bioactive substances. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2001; 27(3): 149-156.

(26) van Pée KH., Ligon JM. Biosynthesis of pyrrolnitrin and other phenylpyrrole derivatives by bacteria. *Natural Product Reports* 2000; 17(2): 157-164.

(27) Simhi E., van der Mei HC., Ron EZ., Rosenberg E., Busscher HJ. Effect of the adhesive antibiotic ta on adhesion and initial growth of E. coli on silicone rubber. *FEMS Microbiology Letters* 2000; 192(1): 97-100.

(28) DeLong EF., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F., Rosenberg E. Proteobacteria: Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria. In: *The prokaryotes*. 4th ed. Berlin: Springer; 2014.

[1]- Gliding
[2]- Hydrothermal
[3]- Fruiting body
[4]- Dawid
[5]- Moradi et al.
[6]- Van horn *et al.*
[7]- Cycloheximide
[8]- Reichenbach & Dworkin
[9]- Electrospray Inoziation
[10]- Krzemieniewski & Krzemieniewska