

دورنمای موفقیت در مهار رشد باکتری‌های مقاوم به چند دارو با

پارومومایسین

مهسا عی‌قرلو^۱، علی محمدی^۲ و اکرم صادقی^{۳*}

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

۲- استادیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

۳- استادیار ژنتیک مولکولی، بخش بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات،

آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

aksadeghi@abrii.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۹/۲۸، تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۰۸

صفحه ۱۶-۱

چکیده

استرپتومایسس (*Streptomyces*) مهمترین جنس باکتریایی شناخته‌شده در تولید ترکیبات ثانویه آنتی‌بیوتیکی است. با در نظر گرفتن سرعت گسترش مقاومت باکتریایی اهمیت بررسی ترکیبات کمتر استفاده‌شده بیشتر می‌شود. آمینوگلیکوزیدها با اثر در فرآیند پروتئین‌سازی موجب اختلال در عملکرد میکروارگانیسم هدف می‌شوند. پارومومایسین از آمینوگلیکوزیدهایی است که بر طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و تک‌یاخته‌ها اثرگذار است. امروزه این آنتی‌بیوتیک بیشتر در درمان لیشمانیوز احشایی کاربرد دارد. مولد اصلی پارومومایسین *S. rimosus* NRRL 2455 است. مصرف این آنتی‌بیوتیک در دوزهای بالا موجب بروز عوارض گسترده در قلب، کلیه و سیستم شنوایی می‌شود اما در دوزهای پائین و به همراه دیگر انواع آنتی‌بیوتیک‌ها بر اثر هم‌افزایی عملکرد قابل‌توجهی در مهار رشد باکتری‌های مقاوم به چند دارو یا MDR نشان می‌دهد. با توجه به این اطلاعات، شناخت عوامل مؤثر در افزایش تولید و شناخت ارتباط بین ساختار و عملکرد این آنتی‌بیوتیک اهمیت پیدا می‌کند. هدف این مطالعه گردآوری اطلاعات مفید و به‌روز در مورد پارومومایسین، شرایط تولید و اهمیت این آنتی‌بیوتیک در درمان عفونت‌های باکتریایی MDR است.

واژه‌های کلیدی: استرپتومایسس، آمینوگلیکوزید، بهینه‌سازی، پارومومایسین، مقاومت دارویی.

مقدمه

۱- معرفی پارامومایسین

آمینوگلیکوزیدها (aminoglycosides) دسته‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها هستند که تولید پروتئین در عوامل بیماری‌زا را مهار می‌کنند (۱). آمینوگلیکوزیدهایی که به طور طبیعی توسط جنس /ستریپتومایسس تولید می‌شوند علاوه بر پارومومایسین شامل استریپتومایسین (streptomycin)، کانامایسین (kanamycin)، جنتامایسین (gentamicin)، نئومایسین (neomycin) و توبرامایسین (tobramycin) هستند. برخی از این آنتی‌بیوتیک‌ها به شکل نیمه‌سنتزی نیز تولید می‌شوند. آمینوگلیکوزیدها از نظر شیمیایی پایدار هستند و به طور معمول با سایر داروهای ضدباکتری اثر هم‌افزایی دارند. پرکاربردترین اعضاء خانواده آمینوگلیکوزیدها در حوزه درمان پاروموماسین، نئومایسین‌ها، کانامایسین‌ها و جنتامایسین‌ها هستند. خوشه‌های ژنی تولید زیستی این آنتی‌بیوتیک‌ها جدا و آنالیز شده اما همه ژن‌ها از نظر بیوشیمیایی آنالیز نشده‌اند (۲). آمینوگلیکوزیدها به عنوان داروی مناسب برای تعدادی از بیماری‌ها

انتخاب شده‌اند اما عوارض جانبی ناشی از سمیت دلیل اصلی کاهش مصرف آن‌ها در ۳۰ سال گذشته است. این آنتی‌بیوتیک‌ها عوارض جانبی مهمی مانند سمیت کلیوی، سمیت دهلیزی و اختلال شنوایی دارند (۳). بنابراین تجویز این آنتی‌بیوتیک به تنهایی توصیه نشده و به طور معمول همراه با دیگر داروها و در دوزهای پایین مصرف محدود دارد. رویکردهایی برای غلبه بر سمیت این داروها در نظر گرفته شده است، برای مثال یک بار مصرف هر دوز دارو در هر روز مصرف آمینوگلیکوزیدها را ایمن‌تر می‌کند. آمینوگلیکوزیدها آنتی‌بیوتیک‌هایی توانمند و مؤثر در برابر بیماری‌زاهای با مقاومت چندگانه (MDR) هستند و نمی‌توان به سادگی از آن‌ها چشم‌پوشی کرد (۴).

پارامومایسین یک 2 deoxystreptamine aminoglycoside aminocyclitol antibiotic با طیف گسترده فعالیت علیه بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و همچنین تک‌یاخته‌ها است. پارومومایسین به صورت اختصاصی به الیگونوکلوئید آر.ان.ای ریبوزوم‌های 30S باکتریایی متصل می‌شود و در نتیجه موجب

"عی قزلو و همکاران، دورنمای موفقیت در مهار رشد باکتری‌های مقاوم به چند دارو با پارومومایسین"

خاتمه زودرس ترجمه شده و منجر به مهار سنتز پروتئین می‌شود (۱). این آنتی‌بیوتیک بر سویه‌های *Staphylococcus aureus* به‌ویژه آن‌هایی که در برابر اکسی‌تتراسایکلین (oxytetracycline)، اریترومایسین (erythromycin) و کاربومایسین (carbomycin) مقاوم هستند اثرگذاری بیشتری دارد (۵). همچنین پارومومایسین در درمان علیه عفونت‌های تک‌یاخته‌ای مانند لیشرمانیوز احشایی بسیار مؤثر است. این آنتی‌بیوتیک همچنین دارای فعالیت بالای ضدآمیبی است و در عین حال سمیت کمی برای دستگاه گوارش دارد، بنابراین به‌صورت کنترل شده برای درمان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۶).

مقاومت آنتی‌بیوتیکی

توانایی باکتری‌ها در کسب مقاومت آنتی‌بیوتیکی از زمان کشف عوامل ضدمیکروبی شناخته شده است. کسب مقاومت تحت تأثیر مجموعه‌ای از ژن‌های ویژه مقاومت برای یک جامعه خاص باکتریایی است که در دهه‌های اخیر

شناخته شده است (۷). کاهش تنظیم ژن‌های مقاومت امکان استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های موجود را در درمان باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک فراهم کرده است (۸).

مقاومت باکتریایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی برای اولین بار در سال ۱۹۵۲ کشف شد. فرضیه‌ای برای توضیح منشاء ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی با نام aminoglycoside phosphotransferase حاصل از باکتری‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک در خاک در اوایل دهه ۱۹۷۰ مطرح شد (۹).

در سال ۱۹۸۳، ژن‌های aminoglycoside-3'-phosphotransferase در پلاسמידها و عناصر متحرک در سویه‌های بالینی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت شناسایی و توالی‌یابی شدند (۱۰).

ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک در جنس *استرپتومایسس* شناخته شده‌اند. بررسی ژنوم حداقل چهارده ژن aminoglycoside phosphotransferase را در این باکتری‌ها نشان می‌دهد (۱۱). هنگام تعیین توالی ژنوم

۲- بیوستز پارومومایسین

استرپتومایسس ها (*Streptomyces*) عضو خانواده اکتینومایستاسه (Actinomycetaceae) هستند. این باکتری ها در تولید ترکیب های ثانویه مانند آنتی بیوتیک ها اهمیت بسیار زیادی دارند (۱۳).

سویه اصلی تولیدکننده پارومومایسین *S. rimosus* NRRL 2455 است (۱). اعضای استرپتومایسس ها ناپایداری ژنتیکی و اختلاف ریخت شناسی (morphology) درون سویه ای زیادی را نشان می دهند و این یکی از دلایل ترس برخی از پژوهشگران برای کار با این باکتری ها است. هرچند تحقیقات نشان می دهد که بین شکل کلنی ها و فعالیت آنتی بیوتیکی آن ها همبستگی و ارتباط وجود دارد. جهش زایی تصادفی به عنوان یک روش مؤثر در بهبود بهره وری کشت های میکروبی در صنعت در نظر گرفته می شود.

بررسی های ژنتیکی در برخی جهش یافته هایی که شکل کلنی نیز در آن ها تغییر یافته است افزایش توان فعالیت تولیدی را نشان می دهد (۱۴).

تولید *Streptomyces rimosus* subsp. *aph* ATCC 10970، چهارده ژن *aphSR1* تا *aphSR14* نامگذاری شده اند. تجزیه و تحلیل مقایسه ای و تبارزایی از توالی اسیدهای آمینه برای محصولات این چهارده ژن و ژن های *aph* که در گذشته از جدایه های بالینی و سویه های تولیدکننده آنتی بیوتیک آمینوگلیکوزیدی از هفت زیر خانواده شناخته شده بودند، انجام شده است. ژن های *aphSR3* و *aphSR5* هنگام مشابه سازی در باکتری *E. coli* موجب مقاومت این باکتری در برابر آنتی بیوتیک های کانامایسین، نئومایسین، پارومومایسین و استرپتومایسین می شوند. پژوهش ها بر نحوه عملکرد ژن های شماره ۳ تا ۸ نشان داد مقاومت آنتی بیوتیکی پس از فسفریله شدن موتیف Ser146 سایت فعال آنزیم توسط پروتئین کینازهای سرین-ترئونین افزایش پیدا کرده است. بررسی های بیشتر نشان داد آنزیم پروتئین کیناز سرین-ترئونین در افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزید نقش مهمی دارد (۱۲).

"عی قرلو و همکاران، دورنمای موفقیت در مهار رشد باکتری‌های مقاوم به چند دارو با پارومومایسین"

۳- عوامل موثر در افزایش تولید

پارامومایسین

تولید این آنتی‌بیوتیک توسط *S. rimosus* در مقادیر ثابت و نتایج مشابه امکان‌پذیر نیست. عوامل مختلفی بر تولید پارومومایسین تاثیر دارند. با تغییر در فرآیند تخمیر یا تغییر در محیط کشت و یا حتی جهش‌های خودبه‌خودی (در نتیجه واکشت‌های پی‌درپی) ممکن است محصول نهایی افزایش یابد یا توانایی تولید سویه از دست برود (۱۵). اجزای محیط کشت و شرایط میکروارگانیسم‌ها اغلب بر تولید ترکیب‌های زیست فعال تاثیر می‌گذارند. محیط کشت مورد استفاده برای تولید، دمای گرمخانه‌گذاری، میزان هم‌زنی، حجم تلقیح، مدت زمان تخمیر و pH محیط در میزان تولید ترکیبات اولیه و ثانویه اثرگذار است. بنابراین، ژن‌های باکتری، ترکیب محیط کشت و شرایط محیطی مهمترین عوامل تاثیرگذار بر تولید این آنتی‌بیوتیک هستند.

۳-۱ جهش‌زایی

جهش یکی از روش‌های مفید برای افزایش تولید پارومومایسین توسط

باکتری‌ها است. بهبود تولید پارومومایسین توسط *S. rimosus* NRRL 2455 از طریق جهش‌زایی توسط تابش گاما امکان‌پذیر است. این جهش‌ها در جهت تغییر سویه و به‌منظور افزایش عملکرد ترکیب‌های ثانویه میکروبی و بر اساس غربالگری برای تولید بیشتر متابولیت توسط جهش‌یافته‌ها انجام شده است. سویه‌های جهش‌یافته با توانایی تولید بیشتر پارومومایسین هزینه‌های تولید را کاهش داده‌اند. پرکاربردترین عوامل جهش‌زا شامل متیل‌تان سولفونات (MMS)، هیدروکسی آمین (HA)، اتیل‌تان سولفونات (EMS)، متیل‌نیترو نیتروز گوآنیدین (MNNG) و اشعه ماوراء بنفش (UV) هستند (۱۶). در قرن اخیر روش‌های جهش‌زایی در اکتینومیسیت‌ها توسعه یافته است.

قرار دادن اسپورهای *Streptomyces* در برابر پرتو ماوراء بنفش و گاما در باکتری تغییرات ژنتیکی ایجاد می‌کند؛ این جهش‌ها تغییر در شکل کلنی و رنگدانه را به دنبال دارند (۱۷). می‌دانیم که دی.ان.ای /ستریتومایسس حاوی مقادیر زیادی از نوکلئیک اسیدهای سیتوزین (C) و گوانین

(G) و مقادیر کمتری از آدنین (A) و تیمین (T) است (۱۸). تبدیل AT به CG بهترین راه برای جهش و بهبود توان تولیدی در سویه است. تاکنون تبدیل AT به CG توسط هیچ ماده جهش‌زای شیمیایی گزارش نشده است (۱۶)؛ اما تبدیل AT به CG در سلول‌های تحت تابش پرتو گاما گزارش شده است (۱۹). پرتوهای گاما از طریق شکستن تک یا دو رشته دی.ان.ا و در نتیجه با حذف یا تغییر ساختار در دی.ان.ا عمل می‌کنند (۲۰). اثربخشی تابش گاما و دوز انتخابی به نوع ماده بیولوژیکی بستگی دارد. از دوزهای بالای تابش گاما برای استریلیزاسیون استفاده می‌شود، دوزهای متوسط برای رفع آلودگی و دوزهای پایین برای جهش‌زایی کاربرد دارند (۲۱).

در مطالعه Asmaa و همکاران، *S. rimosus* subsp. *paromomycinus* در معرض اشعه گاما قرار داده شد و شش کلنی با ریخت‌شناسی تغییر یافته بدست آمد. این باکتری برای یافتن بهترین دوز پرتو گاما، که منجر به کشتار ۹۹/۹۹٪ باکتری‌ها می‌شود، با دوزهای مختلف (3,4,5 KGy) تحت تابش قرار گرفت. دوز مطلوب

4KGy بود. شش نوع کلونی که به لحاظ ریخت‌شناسی تغییر کرده بودند بر محیط کشت tryptic soy agar ظاهر شدند. این کلنی‌ها برای تعیین فعالیت ضد میکروبی در برابر سویه استاندارد *S. aureus* ATCC 25923 با استفاده از روش انتشار در چاهک آگار زیست‌سنجی شدند. سویه جهش‌یافته کارآمد 5M نامگذاری شد. جهش‌یافته 5M پایداری ژنتیکی بالایی در کشت‌های بعدی داشت. این سویه جهش‌یافته نسبت به نوع وحشی ۱/۴۴ و ۲ برابر افزایش فعالیت را به ترتیب در محیط کشت پایه و بهینه‌سازی شده نشان داد. *S. rimosus* mutant-5M می‌تواند به عنوان یک سویه صنعتی بالقوه برای تولید پارومومایسین مورد استفاده قرار گیرد (۲۲).

نتایج مشابهی در مطالعات قبلی گزارش شده است، *Aspergillus niger* تولید کننده مهم بسیاری از آنزیم‌های صنعتی است که با قرار گرفتن در معرض تابش گاما از نظر ژنتیکی توسعه یافته است (۲۳). *A. niger* پس از قرار گرفتن در معرض تابش گاما و ایجاد جهش آنزیم‌های α و β گالاکتوزیداز را با افزایش دو برابری تولید کرد (۲۴).

"عی قزلو و همکاران، دورنمای موفقیت در مهار رشد باکتری‌های مقاوم به چند دارو با پارومومایسین"

همچنین افزایش تولید گلوکز اکسیداز توسط جهش‌یافته‌های این قارچ پس از دوز 0.8 KGy گزارش شده است (۲۳). البته جهش‌یافته تولیدکننده کربوکسی متیل سلولاز با دوز 2KGy پرتو گاما بدست آمده است (۲۵).

مورد دیگر افزایش قابل‌توجه در اکسی تتراسایکلین تولیدشده از یک جهش‌یافته *S. rimosus* CN08 است. این سویه *S. rimosus* γ -45 نامیده شد (۲۶). علاوه براین، افزایش دوازده برابری در تولید اپسیلون پیرومایسینون گلیکوزیدها در *S. galilaes* پس از تابش پرتو گاما گزارش شده است (۲۷). نتایج مشابه‌ای برای سویه جهش‌یافته *S. fradiae* NRRL-2702 توسط پرتو گاما گزارش شده است (۲۸). این نتایج تابش گاما را روشی مؤثر برای ایجاد جهش در مقایسه با دیگر روش‌های جهش‌زایی نشان می‌دهد.

۲-۳ بهینه‌سازی محیط کشت

برای دستیابی به حداکثر تولید آنتی‌بیوتیک توسط سویه تولیدکننده بهینه‌سازی شرایط تغذیه‌ای و محیطی نیز ضروری است.

برنامه بهینه‌سازی آماری بر اساس روش سطح پاسخ (RSM) به‌طور معمول برای ساده‌سازی فرآیند بهینه‌سازی استفاده می‌شود. این روش از نظر ریاضی ابزار آماری مفیدی برای یافتن طراحی آزمایش است و برای تعیین نسبت‌ها در میان متغیرها و بهترین ترکیب پارامترها بر اساس پاسخ‌ها استفاده می‌شود. این رویکرد به صنعت کمک می‌کند برای افزایش تولید آنتی‌بیوتیک‌ها بهترین محیط کشت‌های کم هزینه و سازگار با محیط زیست را طراحی کند (۲۹).

در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۹ انجام شد، افزایش تولید پارومومایسین توسط *S. rimosus* NRRL 2455 از طریق بهینه‌سازی مواد مغذی و محیطی توسط روش طراحی چند فاکتوری و RSM مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه تأثیر ترکیب پارومومایسین با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها در برابر برخی از عوامل بیماری‌زای MDR که از نظر بالینی مرتبط هستند، بررسی شد. محیط کشت‌های مختلفی در این مطالعه مورد آزمایش قرار گرفت. در پایان هر دوره کشت فعالیت ضد میکروبی پارومومایسین

در برابر *S. aureus* ATCC 25923 سنجش
شد. نتایج نشان داد که استفاده از کنجاله
سویا (A1) و محیط تولید
آمینوگلیکوزید (A6) بالاترین تولید
پارومومایسین را به همراه دارد که چندین
برابر بیشتر از سایر محیط‌های آزمایش شده
است. محاسبه فعالیت ضدباکتریایی
پارومومایسین در هر واحد تشکیل کلنی
یک امر ضروری برای یافتن بهترین محیط
تولید است. بر این اساس نتایج نشان داد که
بهترین گزینه محیط تولید آمینوگلیکوزید
(A6) است (۳۰).

جدول ۱- درصد ترکیب‌های مختلف در محیط کشت‌های بررسی شده در مطالعه ابراهیم و همکاران (۳۰).

ترکیبات محیط کشت	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
Soy bean meal(g/L)	۱۵	۱۵	-	-	-	۳۰	۳۰	-	-	۳۰	-	-
Yeast extract(g/L)	-	۱	۳	۱۰	-	-	-	۱۰	۳	-	-	-
Peptone(g/L)	-	-	-	۱۵	۱۰	-	-	۱۵	-	-	-	-
Tryptone(g/L)	-	-	۵	-	-	-	-	-	۵	-	-	-
Glucose(g/L)	۱۵	۱۵	۲۰	۱۵	۲۰	-	۲۰	-	-	-	-	-
Glycerol(ml/L)	-	۲/۵	-	-	-	۴۰	-	۴۰	۴۰	-	-	-
NaCl(g/L)	۵	۵	-	-	۵	-	-	-	-	-	-	-
CaCO ₃ (g/L)	۱	۱	-	-	-	۵	۵	-	-	۵	-	-
NH ₄ Cl(g/L)	-	-	-	-	-	۴	۴	-	-	۴	-	-
K ₂ HPO ₄ (g/L)	-	-	۱	-	-	-	-	-	۱	-	-	-
KH ₂ PO ₄ (g/L)	-	-	۰/۱	-	-	-	-	-	۰/۱	-	-	-
Beef extract(g/L)	-	-	-	-	۵	-	-	-	-	-	-	-
TSB(g/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۳۰	-
Soybean casein digest broth(g/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۳۰

۳-۳ بهینه‌سازی شرایط کشت
تأثیر دما بر زیست‌توده و تولید
پارومومایسین نیز مورد مطالعه قرار گرفته
است. حداکثر تولید پارومومایسین در دمای
۲۸ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود (۳۰).
این شرایط بر اساس آزمایش‌های سینگ و
همکاران در سال ۲۰۱۴ بدست آمده است.
در این مطالعه نشان داده شده که دمای
بهینه برای باکتری *S. sannanensis*
SU118 جهت بالاترین نرخ رشد و

"عی قزلو و همکاران، دورنمای موفقیت در مهار رشد باکتری‌های مقاوم به چند دارو با پارومومایسین"

همچنین حداکثر تولید ماده ضد میکروبی ۲۸ درجه سانتی‌گراد است (۳۱). تولید پارومومایسین در pH های متفاوت ۶، ۷/۵ و ۹ بررسی شده است. سایر فاکتورها از جمله حجم تلقیح و دوره انکوباسیون توسط RSM نیز بهینه‌سازی شده است. همچنین پژوهشی که به‌تازگی انجام شده نشان داد که افزایش سرعت چرخش به ۲۰۰ دور در دقیقه منجر به حداکثر تولید پارومومایسین و بالاترین رشد باکتری شد. در نهایت حداکثر تولید پارومومایسین در محیط کشت و شرایط محیطی بهینه با حجم تلقیح ۷/۷ v/v، اسیدیته برابر با ۶ و در یک دوره ۸/۵ روزه بدست آمده است (۳۰). در جستجوهای انجام شده توسط نویسندگان این مقاله گزارشی مبنی بر اثر شدت نور بر میزان تولید پارامومایسین یافت نشد.

جدول ۲- تأثیر اسیدیته، حجم تلقیح و دوره رشد بر نتایج آزمایش و مقادیر پیش‌بینی شده برای تولید پارامومایسین (۳۰).

Run order	pH	Inoculum siz (%)	Incubation period (days)	Observed response	Predicted response
۱	۹	۱	۶	۱۴	۱۷/۶
۲	۷/۵	۵/۵	۶	۲۸	۲۶/۸
۳	۹	۵/۵	۳	۰	۲/۰
۴	۷/۵	۵/۵	۶	۲۸	۲۶/۸
۵	۶	۵/۵	۹	۳۴	۳۴/۵
۶	۷/۵	۱	۹	۲۷	۲۵/۱
۷	۷/۵	۵/۵	۶	۲۸	۲۶/۸
۸	۹	۱۰	۶	۲۲	۲۲/۱
۹	۷/۵	۵/۵	۶	۲۸	۲۶/۸
۱۰	۶	۱	۶	۲۰	۲۲/۴
۱۱	۶	۱۰	۶	۲۵	۲۳/۹
۱۲	۷/۵	۱۰	۳	۰	-۱/۱
۱۳	۷/۵	۱	۳	۰	-۴/۱
۱۴	۶	۵/۵	۳	۰	۳/۳
۱۵	۷/۵	۵/۵	۶	۲۷	۲۶/۸
۱۶	۷/۵	۱۰	۹	۲۶	۲۸/۱
۱۷	۹	۵/۵	۹	۳۰	۲۹/۳

۴- بهینه‌سازی شرایط تولید پارامومایسین در

مقیاس صنعتی

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۱ انجام شد، روش تخمیر حالت جامد برای تولید پارامومایسین توسط *S. rimosus* NRRL 2455 و با استفاده از سبوس ذرت به عنوان یک بستر عالی و ارزان ارزیابی شد (۳۲). تخمیر حالت جامد (SSF: solid state fermentation) یک فرآیند بیوتکنولوژی است که در آن میکروارگانیسم‌ها بر روی لایه‌های جامد و بدون آب آزاد رشد می‌کنند (۳۳). بستر رشد ممکن است یک ماده پشتیبانی‌کننده بی‌اثر یا یک منبع غذایی مانند دانه‌های غلات، مواد لیگنوسلولزی و طیف وسیعی از مواد گیاهی یا حیوانی باشد (۳۴). تخمیر حالت جامد به دلیل سادگی نسبی آن، استفاده از مواد زیستی ارزان قیمت با حداقل پیش‌تصفیه، تولید کم پساب و توانایی شبیه‌سازی ریز محیط‌های مناسب برای رشد میکروبی مورد توجه است. تخمیر حالت جامد در مقایسه با تخمیر مایع غوطه‌ور (SLF: submerged liquid fermentation) پیامدهای مخرب کمتری در تخمیر صنعتی دارد (۳۵).

از ۶ نوع بستر جامد انتخابی، سبوس ذرت و کنجاله سویا بیشترین کارایی را نشان دادند. بنابراین مخلوطی از این دو بستر مورد آزمایش‌های بیشتر قرار گرفت. در این بستر ۰/۵۱ میلی گرم پارامومایسین در هر گرم ماده جامد خشک اولیه (IDS: initial dry solids) تولید شد. بهینه‌سازی شرایط محیطی با استفاده از طراحی بهینه DOD باعث افزایش ۴/۳ برابری در غلظت نهایی پارامومایسین شد. سویه منتخب در شرایط بهینه شامل اسیدیته ۸/۵، حجم تلقیح ۵۷/۵٪، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در یک دوره ۹ روزه ۲/۲۱ میلی گرم پارامومایسین در هر گرم ماده جامد خشک اولیه تولید کرد. این نتایج نشان داد *S. rimosus* NRRL 2455 می‌تواند به عنوان یک سویه مناسب برای مطالعات بیشتر در مقیاس صنعتی در نظر گرفته شود (۳۲).

۵- فعالیت همزمان پارامومایسین با دیگر

آنتی‌بیوتیک‌ها

برای بررسی تأثیر هم‌افزایی احتمالی ترکیب پارامومایسین با عوامل ضد میکروبی مختلف از روش شطرنجی استفاده شده است. در این مطالعه کمترین غلظت

"عی قرلو و همکاران، دورنمای موفقیت در مهار رشد باکتری‌های مقاوم به چند دارو با پارومومایسین"

بازدارنده (MIC) از هر کدام از مواد ضد میکروبی آمپی‌سیلین (ampicillin)، سولباکتام (sulbactam)، سفتریاکسون (ceftriaxone)، سیپروفلوکساسین (ciprofloxacin)، آزیترومایسین (azithromycin)، کلیندامایسین (clindamycin) و داکسی‌سایکلین (doxycycline) با استفاده از روش براث میکرو دایلوشن تعیین شد (۳۰). مطابق با دستورالعمل CLSI، MIC کمترین غلظت ماده ضد میکروبی است که مانع رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شود و توسط چشم غیر مسلح قابل مشاهده است (۳۶).

سه اثر مختلف بر فعالیت پارومومایسین به همراه ترکیبات سفتریاکسون، سیپروفلوکساسین، آزیترومایسین، آمپی‌سیلین، سولباکتام، کلیندامایسین و داکسی‌سایکلین بر باکتری *S. aureus* ATCC25923 تعیین شد: هم‌افزایی ($S; \Sigma FIC < 0.5$)، اثر افزودنی ($A; \Sigma FIC > 0.5$ ، < 1) و اثر بی‌تفاوت ($I; \Sigma FIC > 1$ ، < 4). ترکیبات آزمایش شده در ۴۶٪ از جدایه‌ها اثر هم‌افزایی، در ۴۲٪ اثر افزودنی و در ۱۳٪ اثر بی‌تفاوت موارد

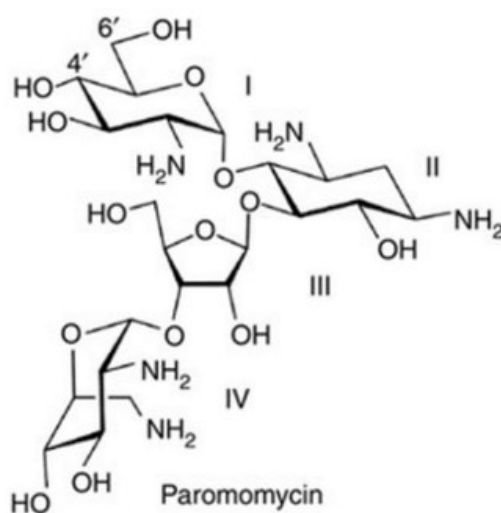
را نشان دادند. همه این ترکیبات اثرات هم‌افزایی و افزایشی قابل توجهی داشتند که برای جدایه‌های مقاوم به دارو مطلوب بود. باید توجه داشت که استفاده از چند ترکیب ضد میکروبی همزمان باید بر مبنای مطالعات دقیق در مورد تأثیر دو یا چند دارو به صورت ترکیبی باشد تا از اثرات احتمالی مانند تضاد جلوگیری شود (۳۰).

۶- تغییر ساختار پارومومایسین جهت بهبود عملکرد آن

پژوهشگران با اصلاح گروه‌های اصلی عملکردی، تلاش قابل توجهی در تولید آنالوگ‌های جدید پارومومایسین انجام داده‌اند. تغییرات حلقه I پارومومایسین (شکل ۱) برای تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید بررسی شده است. اصلاح پارومومایسین برای اولین بار با سنتز 2-N-ethyl paromomycin در دهه ۱۹۸۰ انجام شد. پس از آن 6-tetra-N-acetyl paromomycin 118 ساخته شد. برخی از این ترکیبات در برابر میکروارگانیسم‌های انتخاب شده MDR فعالیت بیشتری نسبت به پارومومایسین والد نشان می‌دهند. تمام مشتقات پارومومایسین، پارومومایسین والد

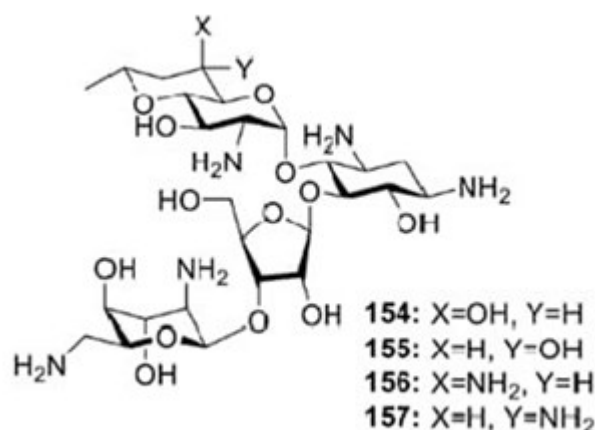
افزایش فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی در برابر تمام سویه‌های *S. aureus* و *E. coli* در مقایسه با ترکیب والد شد. در حالی که ایزومر محوری ۱۵۷ فعالیت ضد میکروبی بسیار کمتری را نشان داد. به طور کلی، به استثنای ترکیب ۱۵۷، تمام مشتقات دو حلقه‌ای (۱۵۴، ۱۵۵ و ۱۵۶) فعالیت خوبی در برابر دو سویه بالینی MRSA شامل AG039 و AG042 نشان دادند (این سویه‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک والد مقاوم هستند). این افزایش فعالیت در نتیجه تداخل در مکانیسم مقاومت دو سویه MRSA پس از اصلاح دارو بود.

اولیه و بقیه آنتی‌بیوتیک‌هایی که برای مقایسه انتخاب شده بودند مانند آپرامایسین (apramycin) و نئومایسین بیشترین فعالیت ضد میکروبی را در برابر جدایه‌های بالینی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین باکتری گرم مثبت *S. aureus* یا همان MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) داشتند. اما ترکیب حلقوی 6-epi paromomycin بیشترین فعالیت ضد میکروبی را در برابر تمام سویه‌های بالینی MRSA و *E. coli* نشان داد. جایگزینی گروه هیدروکسیل با یک آمین در ترکیب شماره ۱۵۶ (شکل ۲)، منجر به



شکل ۱- حلقه I پارومومایسین. ساختار اصلی و تغییر پیدا نکرده پارومومایسین (۳۷).

"عی قزلو و همکاران، دورنمای موفقیت در مهار رشد باکتری‌های مقاوم به چند دارو با پارومومایسین"



شکل ۲- ساختارهای گوناگون مشتقات پارومومایسین (۳۷).

نتیجه‌گیری

ظهور باکتری‌های مقاوم به چند دارو در سال‌های گذشته نگرانی‌های بسیاری درمورد آینده بیماری‌های عفونی ایجاد کرده است. در طی این مدت تحقیقات و برنامه‌ریزی‌های متعددی در رابطه با پیشگیری از کسب مقاومت در باکتری‌ها و درمان باکتری‌های مقاوم‌شده انجام شده است. یکی از راه‌های پیشنهاد شده در درمان باکتری‌های مقاوم به چند دارو استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های جدید، آنتی‌بیوتیک‌های کمتر استفاده شده و مصرف همزمان چند آنتی‌بیوتیک است. پارومومایسین از جمله آنتی‌بیوتیک‌هایی است که کاربرد گسترده‌ای در درمان بیماری‌های عفونی باکتریایی ندارد و

به‌تازگی کلاس جدیدی از آنتی‌بیوتیک‌های پارومومایسین براساس کتابخانه مولکولی فعال طراحی شده است. این طراحی جدید بر تغییر حلقه I در موقعیت 4' و 6' تاکید دارد. این کلاس متشکل از یک داربست دو حلقه‌ای شبیه آپرامایسین و یک گروه کلیدی هیدروکسی یا آمین در موقعیت 6' است تا به بازهای آر.ان.ا متصل شود. این مشتقات جدید از آنتی‌بیوتیک پارومومایسین ساخته شده و از نظر فعالیت آنتی‌ریبوزومی در فرآیند ترجمه بدون سلول (هر دو مدل ریبوزوم میتوکندری و سیتوزولی) و همچنین برای فعالیت ضدباکتریایی بر علیه جدایه‌های بالینی *E. coli* و *S. aureus* مقاوم به متی‌سیلین بررسی شده‌اند (۳۷).

باکتری‌های بیماری‌زا هنوز به آن مقاوم نشده‌اند. همچنین مطالعات نشان داده است که مصرف پارومومایسین به همراه دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها قدرت آن را در مهار رشد باکتری *S. aureus* افزایش می‌دهد. این آنتی‌بیوتیک پتانسیل خوبی برای تغییرات ساختاری جهت بهبود عملکرد ضد میکروبی دارد. با انجام مطالعات بیشتر در زمینه عملکرد پارومومایسین این آنتی‌بیوتیک می‌تواند از گزینه‌های مؤثر در درمان عفونت‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها در آینده باشد.

References

فهرست منابع

1. Wasserman M.R., Pulk A., Zhou Z., Altman R.B., Zinder J.C., Green K.D., Garneau-Tsodikova S., Doudna-Cate J.H. and Blanchard S.C. (2015). Chemically related 4,5-linked aminoglycoside antibiotics drive subunit rotation in opposite directions. *Nature Communications*. 6:7896.
2. Krause K.M., Serio A.W., Kane T.R. and Connolly L.E. (2016). Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 6: a 027029.
3. Ishikawa M., García-Mateo N., Čusak A., López-Hernández I., Fernández-Martínez M., Müller M., Rüttiger L., Singer W., Löwenheim H., Kosec G., Fujs Š., Martínez-Martínez L., Schimmang T., Petković H., Knipper M. and Durán-Alonso M.B. (2019). Lower ototoxicity and absence of hidden hearing loss point to gentamicin C1a and apramycin as promising antibiotics for clinical use. *Nature Medicine*. 9:2410.
4. Poulidakos P. and Falagas M.E. (2013). Aminoglycoside therapy in infectious diseases. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 14:1585–1597.
5. Aboshanab K.M.A. (2010). Isolation, recombinant expression and characterization of the dprA gene product in *Streptomyces rimosus* NRRL 2455. *African Journal of Microbiology Research*. 4:915–922.
6. Lalle M. and Hanevik K. (2018). Treatment-refractory giardiasis: challenges and solutions. *Infection and Drug Resistance*. 11: 1921–1933.
7. Davies J. (2014). Antibiotic resistance and the golden age of microbiology. *Uppsala Journal of Medical Sciences*. 119: 65–67.
8. Gerard D. and Wright G.D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology*. 5:175–186.
9. Davies J. and Wright G.D. (1997). Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. Elsevier Science Ltd. 56:234–240.
10. Wright G.D. (2011). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chemical Communications*. 47:4055–4061.
11. Anderson A.S., Clark D.J., Gibbons P.H. and Sigmund J.M. (2002). The detection of diverse aminoglycoside phosphotransferases within natural populations of Actinomycetes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 29:60–69.
12. Rudakovaa N.N., Alekseevaa M.G., Zakharevicha N.V., Mavletovaa D.A. and Danilenkoa V.N. (2019). Aminoglycoside phosphotransferase AphSR2 from *Streptomyces rimosus* ATCC 10970: dependence of antibiotic resistance on serine-threonine protein kinases PkSR1 and PkSR2. *Russian Journal of Genetics*. 56:112–117.
13. Batt C.A. and Tortorello M.L. (2014). *Encyclopedia of food microbiology* (Second Edition). Oxford: Academic Press, New York, USA. 560–566.

14. Lee N., Hwang S., Lee Y., Cho S., Palsson B. and Cho B.K. (2010). Synthetic biology tools for novel secondary metabolite discovery in *Streptomyces*. Journal of Microbiology and Biotechnology. 29:667–686.
15. Thakur D., Bora T.C., Bordoloi G.N. and Mazumdar S. (2009). Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. Journal de Mycologie Médicale. 19:161–167.
16. Baltz R.H. (2001). Genetic methods and strategies for secondary metabolite yield improvement in Actinomycetes. Antonie van Leeuwenhoek. 79:251–259.
17. Guravaiah M. (2016). Production of alkaline protease by *Streptomyces indicus*. Darshan Publishers, India. 27–28.
18. Surajit D., Lyla P.S. and seyed K. (2008). Distribution and generic composition of culturable marine Actinomycetes from the sediments of Indian continental slope of Bay of Bengal. Chinese Journal of Oceanology and Limnology. 26:166–177.
19. Xie C.X., Xu A., Wu L.J., Yao J.M., Yang J.B. and Yu Z.L. (2004). Comparison of base substitutions in response to nitrogen ion implantation and ⁶⁰Co-gamma-ray irradiation in *Escherichia coli*. Genetics and Molecular Biology. 27:284–290.
20. Huma T., Rashid M.H., Javed M.R. and Ashraf A. (2012). Gamma-ray mediated mutagenesis of *Phialocephala humicola*: Effect on kinetics and thermodynamics of A-amylase production. African Journal of Microbiology Research. 6:4639–4646.
21. Hoe P.C.K., Rahim K.A. and Saud H.M. (2016). A review on microbial mutagenesis through gamma irradiation for agricultural applications. Jurnal Sains Nuklear Malaysia. 28:20–29.
22. Asmaa A.I., Khaled M.A., Mahmoud A.Y. and Nadia A.H. (2017). Improvement of paromomycin production by *Streptomyces rimosus* subsp *paromomycinus* NRRL 2455 using gamma irradiation mutagenesis. Archives of Pharmaceutical Sciences Ain Shams University. 1:26–30.
23. Zia M.A., Rasul S. and Iftikhar T. (2012). Effect of gamma irradiation on *Aspergillus niger* for enhanced production of glucose oxidase. Pakistan Journal of Botany. 44: 1575–1580.
24. Awan M.S., Tabbasam N., Ayub N., Babar M.E., Rahman M., Rana S.M. and Rajoka M.I. (2011). Gamma radiation-induced mutagenesis in *Aspergillus niger* to enhance its microbial fermentation activity for industrial enzyme production. Molecular Biology Reports. 38:1367–1374.
25. Mostafa A. (2014). Effect of gamma irradiation on *Aspergillus niger* DNA and production of cellulases enzymes. The Journal of American Science. 10:152–160.
26. Lazim H., Slama N., Mankai H., Barkallah I. and Limam F. (2010). Enhancement of oxytetracycline production after gamma irradiation-induced mutagenesis of *Streptomyces rimosus* CN08 strain. Journal of Microbiology and Biotechnology. 26:1317–1322.
27. Královcová E., Blumauerová M. and Vaněk Z. (1977). Strain improvement in *Streptomyces galilaeus*, a producer of anthracycline antibiotics galirubins. Folia Microbiologica. 22:321–328.
28. Khaliq S., Akhtar K., Ghauri M.A., Iqbal R., Khalid A.M. and Muddassar M. (2009). Change in colony morphology and kinetics of tylosin production after UV and gamma irradiation mutagenesis of *Streptomyces fradiae* NRRL-2702. Microbiological Research. 164:469–477.
29. Ibrahim H.M. and Elkhidir E.E. (2011). Response surface method as an efficient tool for medium optimization. Trends in Applied Sciences Research. 6:121–9.
30. Ibrahim A.A., El-Housseiny G.S., Aboshanab K.M., Yassien M.A. and Hassouna N.A. (2019). Paromomycin production from *Streptomyces rimosus* NRRL 2455: statistical optimization and new synergistic antibiotic combinations against multidrug resistant Pathogens. BMC Microbiology. 19:18.
31. Singh L.S., Sharma H. and Talukdar N.C. (2014). Production of potent antimicrobial agent by Actinomycete, *Streptomyces sannanensis* strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India. BMC Microbiology. 14:287.
32. Bhargav S., Panda B. P., Ali M. and Javed S. (2013). Solid-state fermentation: an overview. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly. 22: 49–70.

33. Leya T., Christian L. and Ashok P. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 81: 146–161.
34. Singhania R.R., Patel A.K., Soccol C.R., Pandey A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 44: 13–18.
35. El-Housseiny G.S., Ibrahim A.A., Yassien M.A. and Aboshanab K. M. (2021). Production and statistical optimization of Paromomycin by *Streptomyces rimosus* NRRL 2455 in solid state fermentation. *BMC Microbiology*. 21: 1–13.
36. CLSI. (2015). Clinical and laboratory standards institute. methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 10th edition. Clinical and Laboratory Standards Institute. 27-29.
37. Mandhapati A.R. (2016). Synthesis of apramycin and paromomycin derivatives as potential next generation aminoglycoside antibiotics and chemistry of isothiocyanato sialyl donors. Wayne State University, Michigan, USA. 62-85.

Prospects for Success in Inhibiting the Growth of Multidrug-resistant Bacteria with Paromomycin

Mahsa Eigharlou¹, Ali Mohammadi¹, Akram Sadeghi^{2*}

1- Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran.

2- Department of Microbial Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

aksadeghi@abrii.ac.ir

Abstract

Streptomyces is the most important bacterial genus known to produce secondary antibiotic compounds. Considering the speed of bacterial resistance spread, it becomes more important to study less used compounds. Aminoglycosides disrupt the function of the target microorganism by acting on the protein-synthesis process. Paromomycin is an aminoglycoside that acts on a wide range of gram-positive, gram-negative bacteria and protozoa. Today, this antibiotic is mostly used in the treatment of visceral leishmaniasis. The main producer of paromomycin is *S. rimosus* NRRL 2455. Taking these antibiotics in high doses can cause widespread complications in the heart, kidneys, and auditory system, but in low doses and in combination with other types of antibiotics, it can significantly inhibit the growth of multidrug-resistant (MDR) bacteria. According to this information, it is important to know the factors that increase production and to understand the relationship between the structure and performance of this antibiotic. The aim of this study was to collect useful and up-to-date information about paromomycin, production conditions and the importance of this antibiotic in the treatment of bacterial MDR infections.

Keywords: Aminoglycoside, Drug-resistance, Optimization, Paromomycin, *Streptomyces*.