

مطالعه تنوع و فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های استرپتومایسس جدا شده از رسوبات بین جزرومدی ساحل دیلم، ایران

حسن علی جانی: دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران. hasanaalijani@gmail.com
***سهیلا مطروودی:** استادیار و متخصص ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران (*نویسنده مسئول). s.matroodi@kmsu.ac.ir
علی شرفی: استادیار و متخصص ژنتیک مولکولی، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران. sharafi.a@gmail.com
اسحاق زمانی: استادیار و متخصص میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران. isaac.zfr@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: اکتینومیست‌ها به دلیل توانایی تولید ترکیبات ثانویه برای صنعت داروسازی بسیار ارزشمند هستند. این ترکیبات ثانویه از نظر فعالیت بیولوژیکی و ساختار شیمیایی بسیار متنوع هستند و از جمله منابع مواد ضد میکروبی به حساب می‌آیند. گونه‌های مختلف جنس استرپتومایسس از جمله منابع بلقوه تولید کننده ترکیبات ضد میکروبی می‌باشند. هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی اکتینومیست‌ها از رسوبات ساحل دیلم با استفاده از آغازگرهای یونیورسال 16S rDNA و جستجوی آنها برای تولید متابولیت‌های ثانویه با فعالیت ضد میکروبی با استفاده از روش تشکیل هاله مهاري رشد در پلیت است. روش کار: در یک مطالعه تجربی، شش ایزوله از نمونه‌های رسوب جمع‌آوری شده از ایستگاه‌های مختلف ساحل جداسازی شد. شش ایزوله جدا شده براساس مطالعات فیژوژنی با استفاده از ژن 16S rDNA متعلق به جنس استرپتومایسس بودند.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که ایزوله‌های به دست آمده توانایی تولید ترکیبات ثانویه با پتانسیل ضد میکروبی را دارند. نتایج مطالعات ضد میکروبی نشان می‌دهد که ایزوله‌های جدا شده نسبت به فعالیت ضدباکتریایی، فعالیت ضدقارچی بیشتری نشان داده‌اند. نتایج بررسی‌های ضدباکتریایی نشان می‌دهد که هیچ یک از ایزوله‌های مورد مطالعه علیه باکتری‌های پروتوس و لگاریس و گونه‌های کلسیلا فعالیت مهاري نداشته‌اند. بیشترین فعالیت مهاري رشد را ایزوله AHA5 علیه باکتری سالمونلا تیفی به قطر ۹/۲ میلی‌متر بوده است. در مجموع عصاره‌های گرفته شده از ایزوله‌های مورد مطالعه علیه تمام قارچ‌های بیماریزای فعالیت مهاري نشان داده‌اند. بیشترین هاله مهاري تشکیل شده مربوط به عصاره ایزوله AHA1 علیه قارچ تریکوفیتون متناگروفیتس به قطر ۲۱ میلی‌متر مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق نشان می‌دهد که رسوبات بین جزرومدی ساحل دیلم منبعی از اکتینوباکتری‌ها است که می‌تواند منبعی بلقوه از کشف ترکیبات ثانویه ضد میکروبی عمل کند.

کلیدواژه‌ها: اکتینومیست، استرپتومایسس، فعالیت ضد میکروبی، رسوبات جزرومدی

مقدمه

پزشکی به عنوان عوامل ضدتومور، آنتی بیوتیک‌ها، یا داروهای سرکوب کننده ایمنی هستند (۴-۶). این محصولات طبیعی از جمله: بلئومایسین، دوکسوروبیسیسین، راپامایسین، میترامایسین و C-1027 را تشکیل می‌دهند که درمان مهم ضد سرطان را القا داده‌اند (۷ و ۸). تقریباً ۵۰ درصد اکتینوباکتری‌ها از جنس استرپتومایسس هستند که در حدود ۷۵ درصد آنتی بیوتیک‌های مفید تجاری از این جنس مشتق شده‌اند (۳). باتوجه به اینکه تولید از طریق میکروارگانیسم‌ها به واسطه داشتن پتانسیل زیاد هم در مرحله بازده تولید و هم در مرحله تنوع گونه‌های مولکولی،

اکتینوباکتری‌ها بخش قابل توجهی از جمعیت باکتری‌های خاک و نواحی ساحلی را تشکیل می‌دهند. این شاخه باکتریایی به دلیل داشتن توانایی نامحدود در تولید ترکیبات ثانویه برای صنعت داروسازی بسیار ارزشمند هستند (۱). این ترکیبات ثانویه از نظر فعالیت بیولوژیکی و ساختار شیمیایی بسیار متنوع هستند (۲). اکتینومیست‌ها یک منبع بزرگ از محصولات طبیعی فعال زیستی هستند. بیش از ۱۰,۰۰۰ مواد با فعالیت زیستی تاکنون از اکتینومیست‌های زمینی و دریایی جدا شده است (۳). بسیاری از آنها مورد استفاده

روش کار نمونه برداری

نمونه برداری طی چندین مرتبه از نواحی بین جزرومدی ساحل دیلم صورت گرفت. رسوبات از عمق ۱۰ سانتیمتری جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها درون کیسه‌های پلی‌اتیلن استریل زیپ‌دار قرار داده و مجاور یخ‌خشک که دمای ۱۰-۴ درجه- سانتیگراد را تامین میکند به آزمایشگاه منتقل و تا زمان انجام آزمایش در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

غربالگری اولیه

برای جداسازی کلونی‌های باکتریایی ابتدا، رسوب به وسیله آب دریای محل نمونه برداری استریل رقیق سازی انجام شد. برای این منظور، ۱۰ گرم رسوب با آب دریای استریل به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شده و به مدت ۶۰ دقیقه بر روی شیکر و در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد همگن شد. پس از آن رفتهای مختلفی تا 10^{-7} و نیز لوله بدون رقت از سوسپانسیون مذکور تهیه شد. شناسایی بیوشیمیایی با استفاده از روش‌های استاندارد صورت گرفت (۱۳).

استخراج DNA ژنومی و PCR

DNA ژنومی با استفاده از روش Cheng و همکاران استخراج شد و واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای $5'-AGAGTTTGA27$ و $3'-GGTTACCTT$ و $5'-GGTACCTT$ و $3'-GTTACGACTT$ R۱۴۹۲، مواد مورد استفاده و شرایط واکنش PCR مطابق مراحل زیر انجام شد.

DNA الگو ۱۰۰ نانوگرم، آنزیم Taq DNA Polymerase ۲/۵ واحد بر میکرولیتر، بافر PCRx ۱۰ ۲/۵ میکرولیتر، Mgcl2 ۵۰ میلی مولار، dNTP ۱۰ میلی مولار ۰/۵ میکرولیتر، آغازگرهای F۲۷ و R۱۴۹۲ هر کدام ۲۰ پیکومول شرایط و مراحل واکنش PCR به ترتیب: واسرشت سازی اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، برای ۳۵ سیکل واسرشت سازی ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال ۳۰ ثانیه، بسط ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، بسط نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت.

مقرون به صرفه‌تر از سایر منابع زیستی است، امروزه غربالگری متابولیت‌های میکروبی دارای فعالیت‌های زیستی، توجه محققین زیادی را به خود جلب کرده است. Zhang و همکاران در سال ۲۰۰۸ به بررسی ژن‌های پلی‌کتید سنتاز و فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های جدا شده از اسفنج‌های دریای چین جنوبی پرداختند (۹).

Gontang و همکاران، شصت باکتری اکتینومیست را از رسوبات دریایی جداسازی کردند و با استفاده از غربالگری PCR، ژن‌های مرتبط با بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه را شناسایی کردند (۱۰). Engelhardt و همکاران، به جداسازی و شناسایی کلاستر ژن بیوسنتزکننده آنتی‌بیوتیک تیوپتید TP-1161 پرداختند. در این بررسی آنتی‌بیوتیک تیوپتید TP-1161، از تخمیر محیط کشت مایع یک اکتینومیست دریایی از جنس *Nocardiosis* سنتز شد. در این گزارش شناسایی، جداسازی و تجزیه و تحلیل کلاستر ژنی بیوسنتزکننده TP-1161 از این گونه صورت گرفت. با استفاده از توالی ژنوم پیش‌نویس، ساختار توالی پتیدی کلاستر ژنی TP-1161 پیش‌بینی شد. همین گروه تحقیقاتی تعداد ۲۷ اکتینوباکتر را از رسوبات دریایی و اسفنج‌ها جداسازی کردند و توانایی باکتری‌ها را برای تولید متابولیت‌های ثانویه فعال بررسی کردند (۱۱). Moran و همکاران با استفاده از پروب‌های 16S rRNA برای اولین بار جمعیت استرپتومایسس را به عنوان بخشی از اجتماعات میکروبی دریایی گزارش کردند (۱۲).

هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی اکتینومیست‌های ناحیه جزر و مدی از ساحل دیلم و بررسی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های جدا شده می‌باشد. در این تحقیق ۶ ایزوله استرپتومایسس از رسوبات بین جزرومدی ساحل دیلم جداسازی و با استفاده از 16S rRNA شناسایی شدند. سپس فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی متابولیت‌های ثانویه القا شده توسط کشت ایزوله‌های جدا شده در محیط القایی ارزیابی شدند.

آنالیز داده‌های مولکولی

کروماتوگرام‌های به دست آمده از توالی یابی ابتدا به وسیله نرم‌افزار بررسی و ویرایش شدند. پس از آن توالی‌های به دست آمده در داده پایگاه‌های ژنتیکی (NCBI) با استفاده از برنامه Blast با توالی‌های ثبت شده در پایگاه همردیف و شناسایی شد. برای رسم درخت فیلوژنی از نرم افزار MEGA6 استفاده گردید.

بررسی فعالیت ضدباکتریایی و ضد قارچی

فعالیت ضدباکتری عصاره باکتریایی به روش انتشار دیسک، با استفاده از باکتری گرم مثبت باسیلوس سرئوس و باکتری‌های گرم منفی اشرشیا کولی، گونه‌های سالمونلا، گونه‌های پروتئوسو گونه‌های کلبسیلا انجام گرفت. فعالیت ضد قارچی علیه قارچ‌های بیماری‌زای تریکوفیتون منتاگروفیتس، آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس نایجر، میکروسپوروم جیپسوم، کاندیدا البیکانز و پنسیلیوم انجام گرفت. باکتریها و قارچ‌های مورد استفاده از کلکسیون باکتری دانشگاه علوم پزشکی زنجان تهیه شده اند. جهت اینکار ابتدا باکتری در محیط القایی کشت شده و مطابق روش Alijani و همکاران محیط کشت حاوی متابولیت‌های ترش‌چی جهت بررسی فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی استفاده شد (۱۴). برای آنالیز داده‌های آماری از نرم‌افزار SPSS v.16 استفاده شد.

یافته‌ها

همانگونه که در جدول ۱ و همچنین در شکل ۱ مشاهده می‌شود در این تحقیق شش ایزوله مختلف با توجه به شکل کلونی، رنگ میسلیم و رنگیزه‌هایی که تولید می‌کنند، جداسازی شدند. اکثر ایزوله‌ها کلونی‌های چتری شکل تولید

می‌کنند. غالباً رنگ میسلیم‌های هوایی و زمینی متفاوتی ایجاد می‌کنند و رنگیزه‌هایی که توسط این ایزوله‌ها تولید می‌شود معمولاً به رنگ سفید، زرد و خاکستری می‌باشد.

نتایج تست‌های بیوشیمیایی ایزوله‌های اکتینومیست‌های دریایی جدا شده

نتایج حاصل از تست گرم نشان می‌دهد که همه ایزوله‌ها گرم مثبت می‌باشند. نتایج حاصل از آنالیزهای بیوشیمیایی نشان می‌دهد که تمام ایزوله‌ها کاتالاز مثبت و برای تست‌های VP، TSI، لایزین دکربوکسیلاز و ایندول منفی می‌باشند. همچنین برای تست MR تنها ایزوله AHA1 مثبت بوده و برای سیمون سیترات ایزوله‌های AHA5 و AHA7 مثبت می‌باشند. نتایج حاصل از تست اورنیتین دکربوکسیلاز نشان می‌دهد که ایزوله‌های AHA1، AHA4 و AHA5 مثبت می‌باشند. نتایج حاصل از تست SIM که شامل H₂S و تحرک ایزوله‌ها می‌باشد نشان می‌دهد که تمامی ایزوله‌ها برای این آزمون منفی می‌باشند (جدول ۲).

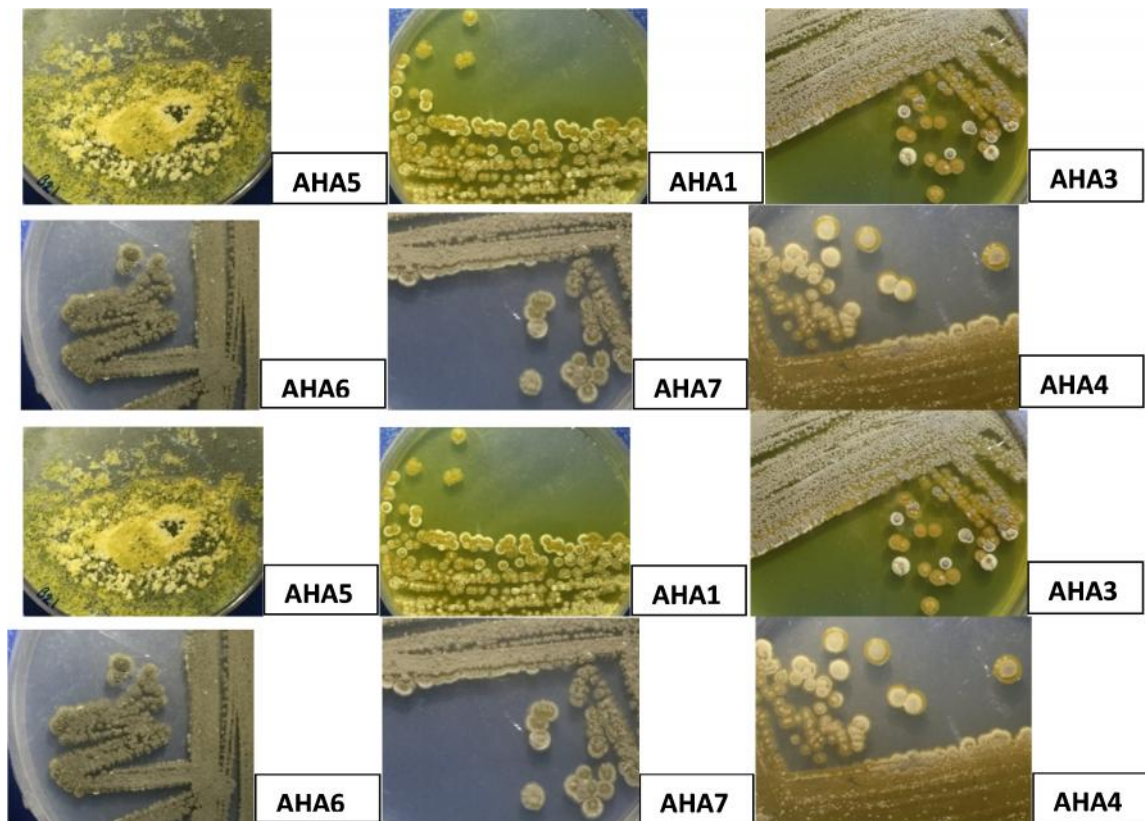
نتایج و کیفیت DNA استخراج شده

DNA اکتینومیست‌ها با استفاده از کیت DNA Cinna Pure (PR881614) که برای استخراج DNA باکتری‌های گرم مثبت است استخراج گردید. DNA به دست آمده با استفاده از ژل آگارز ۱٪ ارزیابی شد. وجود باندهای واضح و شفاف و نداشتن اسمیر نشانگر کیفیت مناسب و قابل قبول DNA استخراجی برای استفاده در روند PCR بود (شکل ۲).

مشاهدات حاصل از الکتروفورز ژل آگارز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز، جایگاه قطعه‌ی تکثیر شده را در محل مورد نظر (محدوده

جدول ۱- ویژگی‌های ظاهری اکتینومیست‌های جدا شده

مشخصات	جدایه‌ها
رنگ روی کلونی‌ها سفید، پشت کلونی‌ها زرد، میسلیم زمینی خاکستری، میسلیم هوایی سفید تولید رنگیزه‌های زرد، تک کلونی چتری شکل.	AHA1
رنگ روی کلونی‌ها سفید، پشت کلونی‌ها زرد، میسلیم زمینی خاکستری، میسلیم هوایی خاکستری، تولید رنگیزه‌های زرد، تک کلونی‌های چتری شکل.	AHA3
میسلیم زمینی زرد رنگ، میسلیم هوایی سفید، رنگ تک کلونی سفید و پشت کلونی زرد کم‌رنگ.	AHA4
دارای هیف‌های زیاد، میسلیم‌های هوایی خاکستری تا سبز رنگ، رنگ روی کلونی سبز مایل به زرد و دارای اسپورهای خاکستری رنگ.	AHA5
تک کلونی‌های این سویه به صورت خاکستری پرنگ هستند. اسپور هوایی خاکستری رنگ تولید می‌کنند و فاقد رنگیزه.	AHA6
دارای کلونی‌های سفید رنگ با میسلیم‌های هوایی خاکستری، پشت کلونی آجری	AHA7



شکل ۱- اکتینومیست‌های جدا شده در این تحقیق به ترتیب، AHA1, AHA3, AHA4, AHA5, AHA6 و AHA7 می‌باشند

سرئوس، اشرشیا کولی، سالمونلاتیفی، پروتوس ولگاریس و گونه‌های کلبسیلا با اندازه‌گیری قطر هاله حاصل از عدم رشد باکتری بررسی شد (جدول ۲).

بر اساس نتایج به دست آمده حساس‌ترین باکتری نسبت به عصاره *AHA1*، سالمونلا با قطر هاله $8/61 \pm 0/5$ میلی‌متر بود در حالی که باکتری‌های دیگر نسبت به عصاره *AHA1*، مقاومت نشان دادند. فعالیت عصاره *AHA3* بر باکتری‌ها نشان داد که عصاره مذکور تنها بر باکتری‌های باسیلوس سرئوس و سالمونلاتیفی اثر مهاری داشتند که هاله‌هایی به ترتیب با قطر $7/8 \pm 0/5$ و $7/8 \pm 0/1$ میلی‌متر اثر مهاری نشان داده است و بر سایر باکتری‌ها بی‌تاثیر بوده است. بر اساس نتایج به دست آمده حساس‌ترین باکتری نسبت به عصاره *AHA4*، سالمونلا با قطر هاله ۹ بود در حالی که باکتری‌های دیگر نسبت به عصاره *AHA4*، مقاومت نشان دادند. نتایج حاصل نشان داد که عصاره *AHA5* نسبت به دیگر عصاره‌ها

(۱۵۰۰ bp) با استفاده از مارکر تائید کرد. نتایج در شکل ۳ نشان داده شده است.

نتایج رسم درخت فیلوژنی گونه‌های مورد مطالعه و مقایسه با گونه‌های مشابه

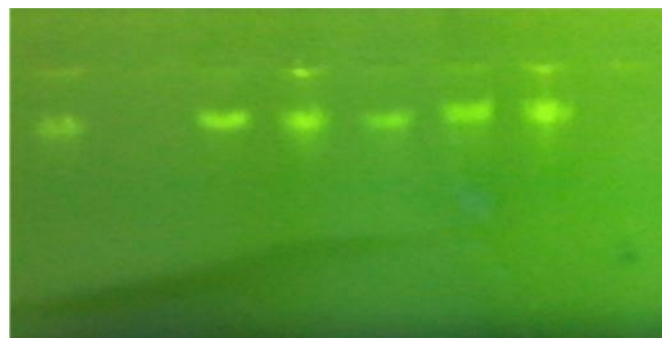
در بخشی از تحقیق حاضر، روابط فیلوژنتیکی بین گونه‌های اکتینومیست با استفاده از ژن 16S rDNA مورد بررسی قرار گرفت. نتایج درخت فیلوژنتیکی به روش پیوند همجواری (NJ) نشان می‌دهد که گونه‌های استرپتومایسس *AHA1*، *AHA3* و *AHA5* با بوت استرپ بالای ۹۹٪ و *AHA4*، *AHA6* و *AHA7* با بوت استرپ بالای ۵۰٪ و همچنین گونه *AHA2* و *Nocardiopsis sp.* و *B2(KJ470122)* با بوت استرپ بالای ۹۹٪ در یک کلاد (خوشه) قرار گرفتند که بیانگر رابطه خویشاوندی نزدیک آن‌ها با هم بود (شکل ۴).

آزمون ضد میکروبی عصاره اکتینومیست‌های جدا شده

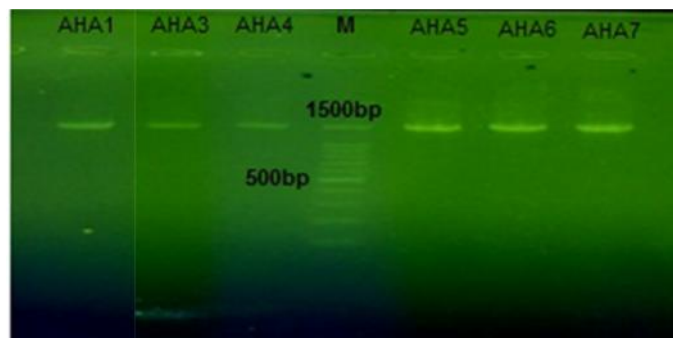
فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های اکتینومیست علیه پنج باکتری بیماری‌زای انسان باسیلوس

جدول ۲- نتایج تست‌های بیوشیمیایی اکتینومیست‌ها

Test	AHA1	AHA3	AHA4	AHA5	AHA6	AHA7
Catalase	+	+	+	+	+	+
MR	+	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-
TSI	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-
Simmon citrate	-	-	-	+	-	+
Ornithine decarboxylase	+	-	+	+	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	-	-	-
SIM						
H ₂ S	-	-	-	-	-	-
motility	-	-	-	-	-	-
Gram	+	+	+	+	+	+



شکل ۲- DNA استخراج شده از ایزوله‌های اکتینومیست بر روی ژل آگارز ۱٪



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR سویه‌های اکتینومیست بر روی ژل آگارز ۱٪. ستون M: مارکر ۱۰۰bp و محصولات PCR AHA1, AHA3, AHA4, AHA5, AHA6 و AHA7 هستند

ایزوله، اثری روی باکتری‌های بیماری‌زای مورد استفاده نشان نداده است.

آزمون ضد قارچی قارچ‌های بیماری‌زا به روش چاهک

نتایج آزمایش ضد قارچی عصاره اکتینومیست‌ها به روش‌چاهک در جدول ۳ ارائه شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود همه ایزوله‌های به دست آمده حداقل علیه یک قارچ بیماری‌زای مورد استفاده اثر مهاری نشان داده‌اند.

براساس نتایج به دست آمده، عصاره AHA1 بر تمامی قارچ‌های مورد آزمایش به جز قارچ

فعالیت ضد باکتریایی بیشتری داشته و بر روی سه باکتری اشرشیا کولی، باسیلوس سرئوس، سالمونلاتیفیه ترتیب با قطر هاله $8/2 \pm 0/2$ ، $8/7 \pm 0/5$ و $9/2 \pm 1$ میلی‌متر اثر مهاری داشته و پروتوسولگاریسگونه‌های کلبسیلا نسبت به این عصاره مقاومت نشان دادند. حساس‌ترین باکتری نسبت به عصاره AHA6 بر اساس نتایج به دست آمده، سرئوس با قطر هاله $8/2 \pm 0/2$ میلی‌متر بود در حالی که باکتری‌های دیگر نسبت به عصاره AHA6 حساسیتی نشان ندادند. همانگونه که در جدول ۲ مشاهده می‌شود عصاره حاصل از این

جدول ۲- فعالیت ضد میکروبی عصاره اکتینومیسیت‌ها علیه باکتری‌های بیماری‌زای انسانی به روش انتشار دیسک (mean± S.D(mm))

پنی سیلین	محیط کشت	AHA7	AHA6	AHA5	AHA4	AHA3	AHA1	باکتری‌ها
-	-	-	-	۸/۲±۰/۲ ^b	-	-	-	<i>E. coli</i>
۱۳/۶ ^a	-	-	-	-	-	-	-	<i>P. vulgaris</i>
۱۳/۳۷ ^b	-	-	۸/۲±۰/۲ ^a	۸/۷±۰/۵ ^{ab}	-	۷/۸±۰/۵ ^a	-	<i>B. cereus</i>
-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Klebsiella</i>
-	-	-	-	-	-	-	-	sp.
۱۰/۰۲ ^c	-	-	-	۹/۲±۱ ^a	۹ ^a	۷/۸±۰/۱ ^a	۸/۶۱±۰/۵۸ ^a	<i>S. typhi</i>

- بدون فعالیت

حروف a, b, c و در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است.

جدول ۳- فعالیت ضد میکروبی عصاره اکتینومیسیت‌ها علیه قارچ‌های بیماری‌زای انسانی به روش چاهک (mean± S.D(mm))

محیط کشت	AHA7	AHA6	AHA5	AHA4	AHA3	AHA1	قارچ‌ها
-	-	-	۱۹±۰/۱ ^a	۸/۶۲±۰/۰۴ ^b	۶/۹±۰/۳ ^d	۵/۸۴±۰/۲ ^e	<i>A. flavus</i>
-	-	-	-	۹/۰۲±۰/۱ ^b	۹/۶±۰/۲ ^b	۱۰/۱۳±۰/۳ ^c	<i>A. niger</i>
-	-	۹±۱ ^a	-	-	۱۸±۰/۲ ^a	۲۱±۰/۲ ^a	<i>T. mentagrophytes</i>
-	۱۸±۱ ^a	-	-	۱۵±۰/۰۱ ^a	۱۸±۰/۳ ^a	۱۶±۰/۱ ^b	<i>M. gypseum</i>
-	-	-	-	۸/۰۲±۰/۰۶ ^c	۸/۹±۰/۱ ^c	۹/۰۷±۰/۰۳ ^d	<i>C. albicans</i>
-	۱۳±۱ ^b	-	۱۴±۰/۰۱ ^b	-	-	-	sp. <i>Penicillium</i>

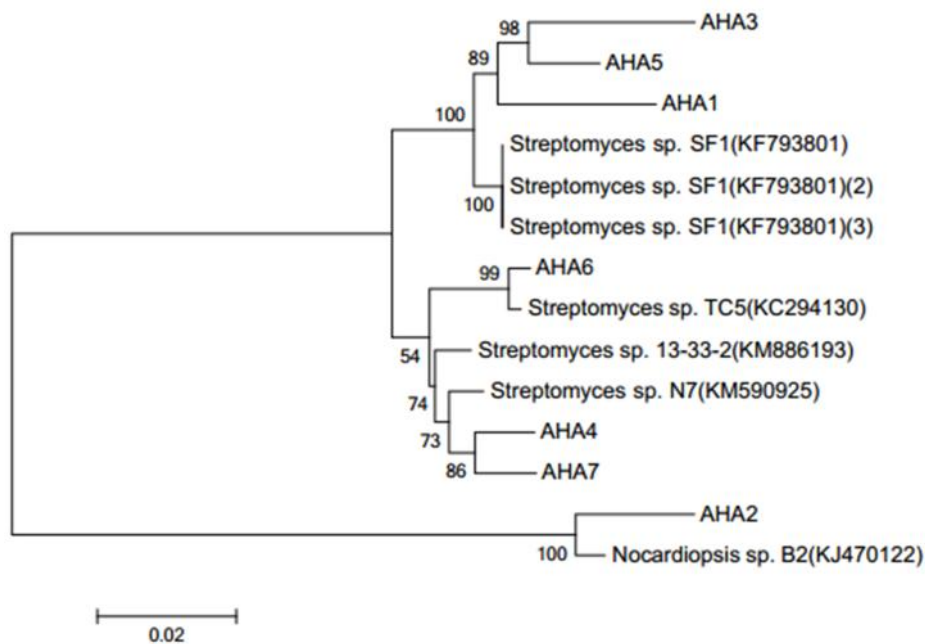
- بدون فعالیت. حروف a, b, c, d و e در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است.

میلی‌متر اثر ضد قارچی داشت و نسبت به دیگر قارچ‌ها هیچ فعالیت ضد قارچی مشاهده نشد. نتایج به دست آمده نشان داد که تمامی قارچ‌های مورد آزمایش به جز تریکوفیتون منتاگروفیتس نسبت به عصاره AHA6 مقاومت نشان دادند. قطر هاله مهارى مشاهده شده برای تریکوفیتون منتاگروفیتس ۹±۱ میلی‌متر بود. نتایج حاصل نشان داد که به جز میکروسپوروم جیپسوم و پنسیلیوم به ترتیب با قطر هاله ۱±۱ و ۱۳±۱ میلی‌متر بقیه قارچ‌ها نسبت به عصاره AHA7 مقاوم بودند.

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه اغلب آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده از ترکیبات جدا شده از باکترها و قارچ‌ها توسعه یافته‌اند که همچنان اکتینومیسیت‌ها منبع غالب و دائمی هستند (۱۵). اکتینومیسیت‌های مشتق از رسوبات یکی از منابع جدید مواد ضد میکروبی می‌باشند (۱۱). عمده داروهای بیماری‌بهای عفونی از محصولات طبیعی الهام گرفته‌اند (۱۶). یکی از منابع امیدوار کننده حصول مواد ضد میکروبی

پنسیلیوم فعالیت ضد قارچی نشان داده است. این عصاره بر قارچ‌های بیماری‌زای اسپریژیلوس فلاووس، اسپریژیلوس نایجر، تریکوفیتون منتاگروفیتس، میکروسپوروم جیپسوم و کاندیدا/البیکانز به ترتیب با قطر هاله ۵/۸۴±۰/۲، ۱۰/۱۳±۰/۳، ۲۱±۰/۲، ۱۶±۰/۱ و ۹/۰۷±۰/۰۳ میلی‌متر فعالیت ضد قارچی نشان داد. بیش‌ترین فعالیت ضد قارچی این عصاره بر روی قارچ تریکوفیتون منتاگروفیتس بود. عصاره حاصل از ایزوله AHA3 علیه تمام قارچ‌های بیماری‌زای مورد استفاده به استثنای قارچ پنسیلیوم اثر مهارى داشته است. بیش‌ترین اثر ضد قارچی این عصاره روی قارچ‌های تریکوفیتون منتاگروفیتس و میکروسپوروم جیپسوم به ترتیب با قطر هاله ۱۸±۰/۲ و ۱۸±۰/۳ میلی‌متر بود. عصاره AHA4 روی تمامی قارچ‌های مورد آزمایش به جز تریکوفیتون منتاگروفیتس و پنسیلیوم اثر ضد قارچی داشته و بیش‌ترین فعالیت ضد قارچی را روی میکروسپوروم جیپسوم با قطر هاله ۱۵±۰/۰۱ میلی‌متر نشان داده است. عصاره AHA5 تنها روی قارچ‌های اسپریژیلوس فلاووس و پنسیلیوم پنسیلیوم به ترتیب با قطر هاله ۱۹±۰/۱ و ۱۴±۰/۰۱



شکل ۴- درختچه NJ گونه‌های اکتینومیست بر اساس توالی ژن 16S rDNA

باشد که علیه سه سویه باسیلوس سرئوس، اشرشیا کولی، سالمونلاتیفی، فعالیت مهار رشد نشان داده است. بیشترین هاله مهار رشد تشکیل شده علیه باکتری و سالمونلاتیفی به قطر ۹/۲ میلی متر بوده است. در مطالعات گذشته گزارش شده که از ۴۲ ایزوله جدا شده از رسوبات مانگرو جزایر Andaman و Nicobar در هند، ۲۲ ایزوله فعالیت انتاگونیستی علیه استافیلوکوک اورئوس، باسیلوس سابتیلیس، سالمونلاتیفی و کلبسیلا پنومونی نشان داده‌اند (۲۴). در تحقیق دیگری نشان داده شده که اکتینومیست‌های جدا شده از خاک جنگل مانگرو Guangxi Beihai چین ایزوله BH0954 که از جنس استریپتومایسس می‌باشد علیه ایزوله‌های استافیلوکوک اورئوس، استافیلوکوک اپیدرمیدیس، اشرشیا کولی و پروتوس ولگاریس اثر مهاری داشته و هیچ اثری علیه سودوموناس آئروژینوزا و کاندیدا/البیکانز نداشته است (۲۵). Deepthi و همکاران نشان دادند متابولیت‌های ایزوله استریپتومایسس جدا شده از جنگل مانگرو Andhra Pradesh هند علیه سویه‌های بیماری‌زای استافیلوکوک اورئوس، سودوموناس فلوروسنس، سودوموناس آئروژینوزا، لاکتوباسیلوس

متنوع جستجوی میکرب‌های متنوع می‌باشد (۱۱). غالب این ترکیبات ضد میکروبی جدا شده از اکتینومیست‌های مشتق شده از خاک، از جنس استریپتومایسس جدا سازی شده‌اند؛ بنابراین در سال‌های اخیر استراتژی‌ها به سمت منابع شناخته نشده مانند منابع دریایی هدایت شده‌اند (۱۷). چندین اکتینومیست از نمونه‌های دریایی جدا سازی شده‌اند (۲۰-۱۸).

در این تحقیق شش ایزوله اکتینومیست از رسوبات بین جزر و مدی ساحل دیلم جدا سازی شدند مطالعات فیلوژنتیکی نشان می‌دهد که هر شش ایزوله متعلق به جنس استریپتومایسس می‌باشند که جنس غالب اکتینومیست می‌باشد (۲۱ و ۲۲). این گروه از اکتینومیست‌ها برای چندین دهه مرکز توجه محققان زیادی است، علت آن توانایی این گروه در تولید ترکیبات بسیار متنوع از ترکیبات فعال زیستی با فعالیت وسیع الطیف می‌باشد (۲۳). عصاره حاصل از اکتینومیست‌ها توانایی مهار رشد باکتری‌های و قارچ‌های بیماری‌زا با درجات مختلف را دارند. نتایج نشان می‌دهند که فعال‌ترین ایزوله علیه باکتری‌های بیماری‌زای مورد مطالعه، ایزوله AHA5 می‌-

discovery: 80 years of progress. J Antibiot (Tokyo) 2009;62: 5-16.

2. Arasu MV, Duraipandiyar V, Agastian P, and Ignacimuthu S. Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. Journal de Mycologie Medicale 2008; 18(3):147-53.

3. Berdy J. Bioactive microbial metabolites. J Antibiot 2005;58(4):1-26.

4. Berdy J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. J Antibiot 2012;65:385-95.

5. Newman DJ, Hill RT. New drugs from marine microbes: the tide is turning. J Ind Microbiol Biotechnol 2006;33:539-544.

6. Mahajan GB, Balachandran L. Antibacterial agents from actinomycetes—a review. Front Biosci (Elite Ed) 2012;1:240-53.

7. Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim SK. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. Microbiol Res 2014;169(4):262-78.

8. Rashad F M, Fathy HM, El-Zayat AS, Elghonaimy AM. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematocidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. Microbiol Res 2015;175:34-47.

9. Zhang H, Zhang W, Jin Y, Jin M, Yu X. A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species. Antonie Van Leeuwenhoek 2008; 93(3):241-8.

10. Gontang EA, Gaudêncio SP, Fenical W, Jensen PR. Sequence-based analysis of secondary-metabolite biosynthesis in marine actinobacteria. Appl Environ Microbiol 2010;76(8):2487-99.

11. Engelhardt K, Degnes KF, Zotchev SB. Isolation and characterization of the gene cluster for biosynthesis of the thiopeptide antibiotic TP-1161. Appl Environ Microbiol 2010;76:7093-101.

12. Moran MA, Rutherford LT, Hodson RE. Evidence for Indigenous *Streptomyces* Populations in a Marine Environment Determined with a 16S rRNA Probe. Appl Environ Microbiol 1995;61:3695-700.

13. Shrilling EB, Gittlieb D. methods for characterization of *streptomyces* sp. Int J syst Bacteriol 1966;16:313-340.

14. Alijani H, Matroodi S, Sharafi A, Zamani I. Antimicrobial activity of marine actinomycete *Nocardopsis* sp. AHA2 synthesized silver nanoparticles against microbial pathogens. RJMS. 2016; 23 (147) :74-81.

15. Magarvey NA, Keller JM, Berman V, Dworkin M, Sherman DH. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. Appl Environ Microbiol

اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کزئوس، کاندیدا/البیکانز استرپتوکوکوس موتانز، باسیلوس سرئوس و زانتوموناس اثر مهارتی داشته است (۲۶).

همانگونه که در جدول ۳ مشاهده می‌شود رشد میسلیوم پنج قارچ بیماری‌زای مورد مطالعه در حضور عصاره‌های AHA1 و AHA3 کاهش یافته است و عصاره‌های این دو ایزوله علیه قارچ بیماری‌زای پنسیلیوم نداشته‌اند. بیشترین هاله تشکیل شده مربوط به عصاره ایزوله AHA1 علیه قارچ تریکوفیتون متاگروفیتس به قطر ۲۱ میلی‌متر مشاهده شد. تنها ایزوله‌های AHA5 و AHA7 رشد قارچ پنسیلیوم مهار کرده‌اند. Khamna نشان داد عصاره خام ترکیبات ضد قارچی علیه رایزوکتونیا استولونیفیر، آسپرژیلوس فلاووس، فوزاریوم اوکسیسیپوروم و التراریا فعال است (۲۷). Lim و همکاران ۳۲ ایزوله اکتینومیست که فعالیت مهارتی علیه رشد میسلیوم قارچ‌های پاتوژن مانند کولتروتریکوم گلوکوسپورید، التراریا مالی، رایزوکتونیا سولانی، فیتوفتورا کیسیسی، مگناپورت گراسیا، اکسیسیپوروم کوکومرینیوم را انتخاب کردند (۲۸). این نتایج نشان می‌دهد که فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌ها به دلیل تولید ترکیبات فعال بیولوژیک برون سلولی می‌باشد.

تحقیقات نشان می‌دهد که در طبیعت اغلب آنتی‌بیوتیک‌ها در اکتینومیست‌ها برون سلولی هستند (۲). عدم شناسایی ترکیبات فعال زیستی از جمله محدودیت‌های این تحقیق است که به دلیل محدودیت امکانات موجود صورت نگرفت. نتایج تحقیق نشان می‌دهد که رسوبات جزر و مدی ساحل دیلم منبعی بلقوه از اکتینومیست‌های با پتانسیل تولید ترکیبات ضد میکروبی است که ضرورت دارد با مطالعات بیوشیمیایی این ترکیبات فعال زیستی تخلیص و شناسایی شوند و پتانسیل تولید این ایزوله‌ها با مطالعه ژنوم آنها بطور کامل شناسایی شود و در راستای تولید ترکیبات دارویی مورد استفاده قرار گیرند.

منابع

1. Demain AL, Sanchez S. Microbial drug

2004; 70:7520-9.

16. Cragg G M, Grothaus P G, Newman D J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem Rev* 2009;109:3012-43.

17. Sheridan, C. Antibiotics au naturel. *Na. Biotechnol* 2006;24:1494-6.

18. Xu J, Wang Y, Xie S, Xu J, Xiao J, Ruan J. *Streptomyces xiamenensis* sp. nov. isolated from mangrove sediment. *Int J Syst Evol Micr* 2009;59(3):472-6.

19. Valli S, Suvathi Sugasini S, Aysha OS, Nirmala P, Vinoth Kumar P, Reena A. Antimicrobial potential of actinomycetes species isolated from marine environment. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 469-473.

20. Becerril-Espinosa A, Freel KC, Jensen PR, Soria-Mercado IE. Marine Actinobacteria from the Gulf of California: diversity, abundance and secondary metabolite biosynthetic potential. *Antonie VanLeeuwenhoek* 2013;103:809-19.

21. Sanchez S, Demain AL. *Antibiotics: Current Innovations and Future Trends*: Caister Academic Press; 2015.

22. Zaburanyi N, Rabyk M, Ostash B, Fedorenko V, Luzhetskyy A. Insights into naturally minimised *Streptomyces albus* J1074 genome. *BMC Genomics* 2014; 15(1):97-97

23. Metsa-Ketela M, Salo V, Halo L, Hautala A, Hakala J, Mantsala P, et al. An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* 1999;180:1-6.

24. Baskaran R, Vijayakumar R, Mohan PM. Enrichment method for the isolation of bioactive actinomycetes from mangrove sediments of Andaman Islands, India. *Mal J Microbiol* 2011;7(1):26-32.

25. Dalin H, Guifeng Y, Yajuan X, Naixiang L, Jianhong C, Jiang Lianxiu L, Senzhou C. Isolation and identification of *Actinomycetes* sp. BH0954 from the mangrove forest soil of Guangxi Beihai. *Chin Agric Sci Bull* 2010;26(18):406-9.

26. Deepthi MK, Sudhakar MS, Devamma MN. Isolation and screening of *Streptomyces* sp. from Coringa mangrove soils for enzyme production and antimicrobial activity. *Int J Pharmaceut Chem Biol Sci* 2012;2(1):110-6.

27. Khamna S, Yokota A, Peberdy JF, Lumyong S. Antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants. *Int J Integr Biol* 2009;6(3):143-7.

28. Lim SW, Kim JD, Kim BS, Hwang B. Isolation and numerical identification of *Streptomyces humidus* strain S5-55 antagonistic to plant pathogenic fungi. *Plant Pathol J* 2000;16(4):189-99.

Diversity and antimicrobial activities of streptomyces isolated from intertidal sediments of Deylam, Iran

Hassan Alijani, MSc, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science, Khoramshahr University of Marine Science and Technology, Khoramshahr, Iran. hasanaalijani@gmail.com

***Soheila Matroodi**, PhD, Assistant Professor of molecular genetics, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science, Khoramshahr University of Marine Science and Technology, Khoramshahr, Iran (*Corresponding author). s.matroodi@kmsu.ac.ir

Ali Sharafi, PhD, Assistant Professor of Molecular Genetics, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran. sharafi.a@gmail.com

Isaac Zamani, PhD, Assistant Professor of microbiology, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science, Khoramshahr University of Marine Science and Technology, Khoramshahr, Iran. isaac.zfr@gmail.com

Abstract

Background: Actinomycetes have significant biosynthetic potential of secondary metabolites and promising resource for drug industry. These secondary metabolites are diverse in biological, chemical structures and functions and the most prolific source of antimicrobial compounds. Most of these antimicrobials have been isolated from soil-derived actinomycetes of the genus *Streptomyces*. The aim of this study was to isolate and identify Actinobacteria from Deylam intertidal sediments using 16S rDNA universal primers and screening of isolates for production of antimicrobial secondary metabolites by using disk plate assay.

Methods: Six isolates were isolated from soil samples collected from different sites. All six isolates were considered as *Streptomyces* sp. according to phylogenetic study based on 16S rDNA gene. Isolates were analyzed for production of potent antimicrobial secondary metabolites using standard disk and well assay.

Results: Results showed that none of isolates supernatant had inhibitory effect on *P. vulgaris* and *Klebsilla* sp. the most inhibition zone of pathogenic bacteria was shown by AHA5 against *S. typhi* (9.2 mm). Altogether isolates supernatant showed more antifungal activity in comparison with antibacterial activity and the most inhibition zone was demonstrated by AHA1 supernatant against *T. mentagrophytes* pathogenic fungi with 21 mm diameters of zone of inhibition.

Conclusion: Our results highlighted that mangrove Deylam intertidal sediments represented a reservoir for isolation of *Actinobacteria*, which are potential sources for discovery of antimicrobial secondary metabolites.

Keywords: Actinomycetes, Antimicrobial activity, *Streptomyces*, Intertidal sediments