



## Isolation of ASR7 Actinomycete Isolated from S12 Demospongia Marine Sponge and Study of Its Antibacterial Activity

Razieh Pordel, Soheila Matroodi\*, Isaac Zamani

Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Sciences and Technology, Iran

### Article Information

#### Article history:

Received: 2017/10/21

Accepted: 2018/02/21

Available online: 2019/03/06

#### Article Subject:

Antimicrobial Substances

IJMM 2019; 12(6): 409-418

#### Corresponding author:

#### Soheila Matroodi

Department of Marine biology,  
Faculty of Marine Science and  
Oceanography, Khorramshahr  
University of Marine Science  
and Technology, Iran

#### Email:

[s.matroodi@kmsu.ac.ir](mailto:s.matroodi@kmsu.ac.ir)

Use your device to scan  
and read the article online



### Abstract

**Background and Aims:** Marine Actinomycetes are gram-positive bacteria that sometimes are free, saprophytic or plant and animal-associated, including marine sponges. More than 75% of antibiotics and antimicrobial compounds are produced by actinomycetes. In recent years, due to the need for new drugs, marine microorganisms have been considered as new sources of potential production of significant metabolites. The purpose of this study is isolation and identification of marine sponge-associated Actinomycete and investigation of its antibacterial activity.

**Materials and Methods:** The Actinomycete was isolated from the marine Sponge collected from the depths of coastal waters in Bushehr and screened for antibacterial activity on pathogenic microorganisms of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. and *Proteus* spp. using a Disk Diffusion Method. For molecular identification, genomic DNA was first extracted from isolate and then, the 16S rDNA gene was amplified by PCR and Sequenced. The results were analyzed using bioinformatic programs, Bioedit and MEGA6.

**Results:** In this study, based on phylogeny studies, it was determined that the isolate belonged to the genus *Streptomyces*, and biochemical studies showed that all tests except catalase and gram were negative; antibacterial activity study showed significant activity against three pathogenic bacteria, *E. coli*, *Bacillus cereus* and *Salmonella* spp. It was more active against *Salmonella* spp. (around 16mm inhibition zone diameter).

**Conclusions:** The results showed that depths of the Bushehr coastal waters have marine sponge associated actinomycetes, which are a source of secondary metabolites with biological activity.

**Keywords:** Actinomycete, Marine sponge, Antibacterial activity, Pathogenic bacteria, 16S rDNA

Copyright © 2019, Iran J Med Microbiol This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

### How to cite this article:

Pordel R, Matroodi S, Zamani I. Isolation of ASR7 Actinomycete Isolated from S12 Demospongia Marine Sponge and Study of Its Antibacterial Activity. Iran J Med Microbiol. 2019; 12 (6) :409-418



## جداسازی ایزوله اکتینومایست جدید ASR7 از اسفنج دریایی چندشکلی S12 و بررسی فعالیت ضدباکتریایی آن راضیه پردل، سهیلا مطرودی\*، اسحاق زمانی

گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

#### تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۲۹

پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۰۲

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۱۲/۲۵

موضوع:

مواد ضد میکروبی

IJMM1397;12(6): 409-418

نویسنده مسئول:

#### سهیلا مطرودی

گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

#### پست الکترونیک:

[s.matroodi@kmsu.ac.ir](mailto:s.matroodi@kmsu.ac.ir)

**زمینه و هدف:** اکتینومایست‌های دریایی باکتری‌هایی گرم مثبت هستند که به‌صورت آزاد، ساپروفیت یا هم‌زیست با گیاهان و جانوران از جمله اسفنج‌های دریایی دیده می‌شوند. اخیراً به‌دلیل نیاز به داروهای جدید، به میکروارگانیسم‌های دریایی به‌عنوان منبع جدیدی با پتانسیل تولید متابولیت‌های منحصربه‌فرد، توجه می‌شود. هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی اکتینومایست هم‌زیست با اسفنج دریایی چندشکلی S12، جمع‌آوری شده از اعماق آب‌های استان بوشهر و بررسی فعالیت ضدباکتریایی آن است.

**مواد و روش کار:** ایزوله اکتینومایست از اسفنج دریایی S12 جمع‌آوری شده از اعماق آب‌های بوشهر، جداسازی شدند. ژن 16SrDNA ایزوله مذکور با تکنیک PCR تکثیر و توالی‌یابی و نتایج حاصل با استفاده از برنامه‌های بیوانفورماتیک Bioedit و MEGA6 برای شناسایی و تأیید ایزوله ارزیابی شد. سپس فعالیت ضدباکتریایی عصاره ایزوله جداسازی شده با روش انتشار در دیسک روی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای *Escherichia coli*، *Bacillus cereus*، *Klebsiella spp.*، *Salmonella spp.* و *Proteus spp.* انجام شد.

**یافته‌ها:** در این تحقیق، براساس مطالعات فیلوژنی مشخص شد که ایزوله مدنظر متعلق به جنس *استرپتومایسس* است و با توجه به میزان هومولوژی با سایر گونه‌های *استرپتومایسس* می‌توان آن را گونه‌ای جدید معرفی کرد. مطالعات بیوشیمیایی نشان داد که تمام تست‌های انجام‌شده به استثنای تست‌های گرم و کاتالاز منفی است. ایزوله مطالعه‌شده فعالیت جالب توجهی علیه سه باکتری بیماری‌زای انسانی *Escherichia coli*، *Bacillus cereus* و *Salmonella spp.* نشان داد که بیشترین فعالیت ضدباکتریایی آن علیه باکتری *Salmonella spp.* با قطر هاله در حدود ۱۶ میلی‌متر بود.

**نتیجه‌گیری:** اسفنج‌های اعماق آب‌های استان بوشهر اکتینومایست‌های هم‌زیست با خود دارند که منبعی غنی از متابولیت‌های ثانویه با فعالیت زیستی هستند. نتایج نشان داد که سویه اکتینومایست جداسازی شده یک گونه *استرپتومایسس* جدید با فعالیت ضدباکتری جالب توجه است. این تحقیق اولین گزارش از جداسازی اکتینومایست دریایی هم‌زیست با اسفنج در ایران است.

**کلمات کلیدی:** اکتینومایست، اسفنج دریایی، فعالیت ضدباکتریایی، باکتری‌های بیماری‌زا، 16SrDNA

کپی‌رایت © مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

### مقدمه

اسفنج‌ها (شاخه پوریفرها) بی‌مهرگان ساده، چندسلولی و کفزی فیلترکننده تغذیه و در زیستگاه‌های بنتیک، متصل به سطوح جامد هستند. بیش از ۶۰۰۰ گونه توصیف‌شده از اسفنج‌ها در طیف گسترده‌ای از محیط دریایی و تازه ساکن هستند (۱، ۲). اهمیت اسفنج‌ها به‌دلیل وجود منابع چشمگیری از مواد زیست فعال دریایی است؛ به‌طوری که ۴۰ درصد از تمام محصولات طبیعی دریایی را به خود اختصاص داده‌اند (۳). مطالعات متعددی برای استخراج متابولیت‌های اسفنج‌ها که برای دفاع از خود در برابر انواع

خاصی از میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌کنند، انجام شده است (۴، ۵). از سوی دیگر، تولید طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه از سوی اکتینوباکتری‌های مرتبط با اسفنج شناسایی شده‌اند (۲). حدس زده می‌شود که باکتری‌های مرتبط با اسفنج‌ها تولیدکننده واقعی بخش زیادی از مواد زیست فعال مشتق‌شده از اسفنج‌ها هستند (۸-۶). زیست توده اسفنج شامل درصد جالب توجهی (بالا تر از ۶۰ درصد) از باکتری‌ها است که در سلول‌ها و ماتریکس اسفنج‌ها قرار دارند (۹). مطالعات وابسته به کشت و همچنین مطالعات

## مواد و روش‌ها

### نمونه برداری

در آبان ماه ۱۳۹۵، نمونه برداری با غواصی در اعماق دریای بوشهر انجام گرفت. نمونه اسفنج چندشکلی *S12* درون ظرف پلاستیکی استریل به آزمایشگاه میکروبیولوژی واقع در دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر منتقل و تا زمان استفاده در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد.

### جداسازی اکتینومایست همزیست با اسفنج

نمونه اسفنج ۵ بار با آب دریای استریل شست و شو و در آزمایشگاه درون هاون استریل، با تیغه اسکالپل به قطعات یک سانتی متر مکعبی برش داده شد. سپس با ۱۰ حجم از آب دریای استریل با استفاده از مخلوط کننده هموزن شد (۳۵-۳۳). آنگاه قطعات بافتی اضافی دور ریخته شد و از مایع یکدستی که به دست آمد، رقت‌های سریالی با آب دریای استریل (۱۰-۱ تا ۱۰-۱) تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت روی محیط‌های کشت  $M_1$  (نشاسته ۱۰ گرم، پپتون ۲ گرم، عصاره مخمر ۴ گرم، آگار ۱۸ گرم و آب دریا ۱ لیتر) (۳۴، ۲۵، ۱۷، ۳)، NA (Nutrient Agar)، SCA (Starch Casein Agar) و WA (Water Agar) که با آنتی بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید (۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر، فیشرساینترفیک، امریکا) و نیستاتین (۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر، شرکت عماد درمان پارس، ایران) (۲۵) که به ترتیب برای جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم منفی سریع‌الرشد و قارچ‌ها ضمیمه شده بودند، کشت داده و به مدت ۳۰ تا ۶۰ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس درون انکوباتور انکوبه شدند. پس از این مدت، کلنی‌های متفاوتی بر محیط‌های کشت نمایان شد و اکتینومایست براساس شکل ظاهری خشک، حالت پودری و گچی که داشت از محیط کشت NA جداسازی شد و چندین بار برای خالص‌سازی، به‌طور پی‌درپی به محیط کشت جدید انتقال یافت.

### شناسایی اکتینومایست

پس از شناسایی مورفولوژی و بیوشیمیایی با انواع تست‌های کاتالاز، MR-VP، سیمون سترات، SIM، TSI، لیزین دکربوکسیلاز و اورنیتین دکربوکسیلاز، شناسایی مولکولی ایزوله به ترتیب مراحل زیر انجام گرفت (۳۷).

### استخراج DNA

استخراج DNA براساس پروتکل استخراج DNA، از باکتری‌های گرم مثبت و قارچ‌ها، طبق مراحل گفته شده انجام شد (۳۶). پس از سنجش کیفیت DNA استخراجی روی ژل آگارز ۱٪

مولکولی نشان دادند که اکتینوباکتريا همزیستی میکروبی جالب‌توجهی با اسفنج‌های دریایی دارند (۱۳-۱۰). اکتینوباکتريا، گرم مثبت، عمدتاً هوازی و در درجه اول موجودات زنده خاک و تولیدکننده بسیاری از داروهای خاص هستند. با این حال، مطالعات اخیر نشان داد که برخی از گونه‌های اکتینوباکتريا، ساکنان طبیعی محیط‌های دریایی هستند. این باکتری‌ها به دلیل پتانسیل زیاد خود در تولید آنزیم‌های خارج سلولی و همچنین در سنتز انواع زیادی از متابولیت‌های فعال زیستی، درخور توجه هستند. میکرو ارگانسیم‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک، تقریباً ۷۰ درصد اکتینوباکتری‌ها را تشکیل داده‌اند (۱۴). استرپتومایسس منبع غالب این آنتی‌بیوتیک‌ها میان جنس‌های دیگر اکتینوباکتری‌ها است. Moran و همکاران (۱۹۹۵) با استفاده از کاوشگرهای ژن *16SrRNA* گزارش دادند که اولین جمعیت طبیعی استرپتومایسس، بخشی از جمعیت باکتریایی دریایی بود (۱۶). همچنین نخستین بار Mincer و همکاران (۲۰۰۲) توزیع گسترده و پایدار اکتینوباکتری‌ها در محیط دریایی را گزارش کردند (۱۷). مطالعات روی اکتینوباکتری‌های مرتبط با اسفنج‌ها، به چند اسفنج محدود شده است (۳). مطالعات مستقل از کشت در اسفنج *Rhopaloeide odorabile* (۱۰)، گونه‌های *Xestospongia* (۹)، *Theonella swinhoei*، *aerophoba Aplysina*، *Pseudoceratina clavata* اسفنج‌های *Craniella australiensis* (۱۹)، *Hymeni acidonperleve* (۳)، *Halichondria* spp. (۲۰)، *Iotrochota* spp. (۲۱)، *Halichondria arugosa* و *Stelletta tenuis* (۲۲) وجود اکتینوباکتری‌های مرتبط با اسفنج‌ها را نشان داده‌اند. با این حال، این مطالعات به درک کلی از تنوع، توزیع و اکولوژی آنها محدود شده است (۳۳).

این گروه تحقیقاتی مدت ۵ سال است که روی اکتینومایست‌های دریایی از جمله ایزوله اکتینومایست جدید ASR7 کار می‌کند. برای سهولت در نامگذاری از این سیستم استفاده شده است: A مخفف حرف اول اکتینومایست است و دو حرف بعدی ابتدای اسم و فامیل دانشجو و شماره ۷ نیز ایزوله‌هایی هستند که از سوی این دانشجو جداسازی شده‌اند.

هدف از این مطالعه که برای اولین بار در کشور انجام می‌شود، جداسازی و شناسایی اکتینوباکتری همزیست با اسفنج دریایی جمع‌آوری شده از اعماق آب‌های بوشهر و بررسی فعالیت ضدباکتریایی آن علیه باکتری‌های بیماری‌زای انسانی است.

به کار رفت. در واکنش PCR واسرشته سازی اولیه ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه برای یک سیکل، برای ۳۰ سیکل واسرشته سازی، الحاق و بسط به ترتیب ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۰ درجه ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه ۴۵ ثانیه، بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه برای یک سیکل انجام شد.

وزنی/حجمی با الکتروفورز افقی، برای تکثیر ژن *16S rDNA*، با PCR برنامه زیر و مواد و مقادیر آورده شده در «جدول ۱» استفاده از آغازگرهای F27 و R1492 «جدول ۲» (۳۴) که اختصاصی ژن *16S rDNA* هستند، انجام شد. برای اطمینان از عدم آلودگی در واکنش PCR و برای کنترل منفی از تمام مقادیر جدول ۱ استفاده شد؛ به استثنای DNA ژنومی که به جای آن آب

جدول ۱. مواد استفاده شده برای انجام واکنش PCR

مواد	مقدار مصرفی برای حجم ۲۵ میکرولیتری
DNA استخراجی (۱۰۰ نانوگرم/ میکرولیتر)	۲ میکرولیتر
آنزیم تک پلی مرز	۰/۵ میکرولیتر
PCR Buffer (10x)	۲/۵ میکرولیتر
MgCl <sub>2</sub> (۵۰ میلی مولار/ میکرولیتر)	۱ میکرولیتر
dNTP (۱ میلی مولار/ میکرولیتر)	۰/۵ میکرولیتر
آغازگر ۱ (۱۰ پیکومول/ میکرولیتر)	۲ میکرولیتر
آغازگر ۲ (۱۰ پیکومول/ میکرولیتر)	۲ میکرولیتر
آب تزریقی	۱۴/۵ میکرولیتر

جدول ۲. آغازگرهای استفاده شده در تحقیق حاضر

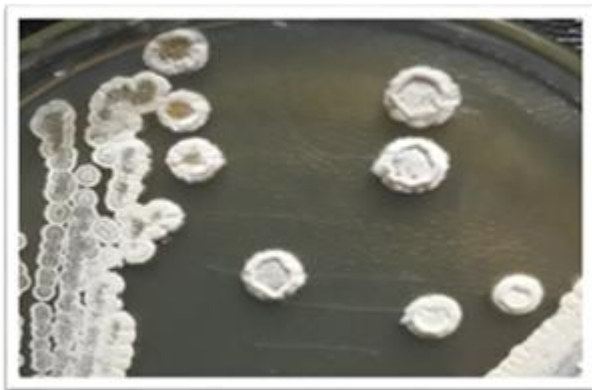
نام پرایمر	توالی آغازگر	دمای اتصال
F27	F: 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	۵۰ درجه سلسیوس
R1492	R: 5'- GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	۵۰ درجه سلسیوس

### بررسی فعالیت ضدباکتریایی

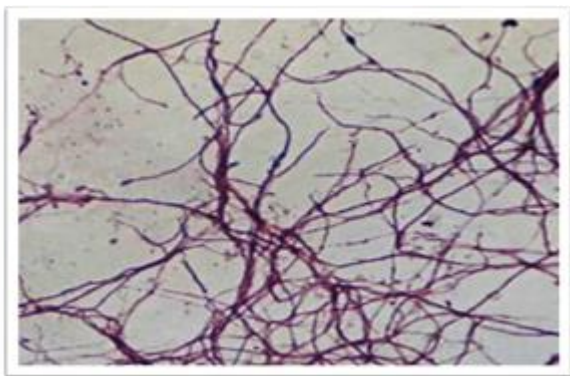
برای این هدف ابتدا ایزوله اکتینومایست روی محیط کشت جامد M<sub>1</sub> در دمای ۲۸ درجه سلسیوس رشد داده شد. پس از آن، تک کلنی های تازه ایزوله از محیط کشت جامد برداشته شد و در ارلن ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت مایع M<sub>1</sub> کشت داده شد و در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ و دمای ۲۸ درجه سلسیوس، به مدت ۱۰ روز برای تحریک تولید متابولیت های ثانویه قرار گرفت. پس از دوره انکوباسیون، برای حذف زیست توده های میسلیمی از کشت، محیط کشت مایع حاوی باکتری در میکرتیوپ های ۱/۵ میلی لیتری ریخته، با ۷۰۰ دور در دقیقه (rpm) به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی با حلال هایاتیل استات (۱:۱) (۳۴) و متانول (۱:۱) (۲۵) استخراج شد. در ادامه برای به دست آمدن عصاره خام، حلال با تبخیرکننده

### تجزیه و تحلیل داده های مولکولی

کروماتوگرام توالی به دست آمده از شرکت ژن فناوریان ابتدا با نرم افزار Chromas بررسی و ویرایش شد. به منظور مقایسه توالی نمونه با دیگر توالی های موجود در پایگاه اطلاعات داده های ژنتیکی (NCBI) از برنامه Blast (۳۴) که یکی از ابزارهای هم ردیفی توالی های DNA است، استفاده شد که میزان تشابه نمونه و شناسایی اولیه به دست آمد. برای رسم درخت فیلوژنتیکی نیز نرم افزار MEGA6 به کار رفت؛ به این صورت که توالی DNA گونه های مشابه یا نزدیک با نمونه مطالعه شده از پایگاه داده های ژنتیکی استخراج و به همراه توالی DNA مطالعه شده وارد این نرم افزار شدند. از توالی مربوط به ژن *16SrDNA* جنس *Nocardia* برای برون گروه یا outgroup استفاده و درخت فیلوژنی به روش پیوند هم جواری (Neighbor joining) ترسیم شد (۳۴).



شکل ۱. کلنی های ASR7 پس از یک هفته رشد روی محیط کشت M<sub>1</sub>



شکل ۲. رنگ آمیزی گرم ایزوله ASR7 زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰

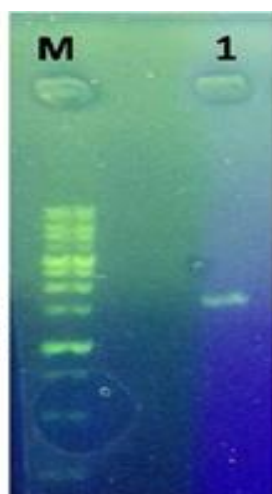
جدول ۳. نتایج تست های بیوشیمیایی برای ایزوله ASR7

نتایج	تست ها
+	کاتالاز
-	سیمون سیترات
-	لایزین دکربوکسیلاز
-	ارنیتین دکربوکسیلاز
-	MR
-	VP
-	TSI
-	SIM
-	تولید H <sub>2</sub> S
-	حرکت
-	ایندول
+	گرم

دمای کمتر از ۳۵ درجه سلسیوس تبخیر داده شد. روش انتشار در دیسک نیز با توجه به استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی برای سنجش فعالیت ضد میکروبی انجام گرفت (۲۸)؛ به این طریق که سوآپ استریل به سوسپانسیون باکتری های بیماری زا (هرکدام جداگانه) که پس از رشد در محیط کشت LB مایع به غلظت استاندارد نیم مک فارلند ( $10^8 \text{ cfu/mL} \times 1/5$ ) رسیده بودند آغشته و روی محیط کشت مولر هینتون آگار (MHA) ۳۰ میکرولیتر عصاره باکتریایی به دیسک های بلانک (بیشترین حجمی که توسط دیسک قابل جذب است) استریل ۶ میلی متری تلقیح شد و روی محیط کشت MHA حاوی باکتری های بیماری زا با فاصله های معین قرار گرفت (۳۴) و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند (۳۴). پس از انکوباسیون هاله فقدان رشد اندازه گیری شد. باکتری های بیماری زا استفاده شده در مطالعه حاضر، *Escherichia coli*، *Bacillus cereus*، *typhimurium Salmonella* هستند. همچنین در این آزمایش، از نالیدیکسیک اسید برای کنترل مثبت علیه باکتری های بیماری زا گرم منفی، از آمپی سیلین علیه باکتری گرم مثبت باسیلوس سرئوس و از محیط کشت بدون باکتری برای کنترل منفی استفاده شد.

### یافته ها

از نمونه اسفنج S12 جمع آوری شده، ایزوله اکتینومایست ASR7، جداسازی شد. این ایزوله ابتدا براساس ریخت زایی و رنگ آمیزی گرم شناسایی شد، شکل ظاهری و رنگ آمیزی گرم ایزوله به ترتیب، در «شکل ۱» و «شکل ۲» قابل مشاهده است. این نتایج نشان داد که ایزوله ASR7، گرم مثبت و رشته ای شکل است و از نظر ریخت زایی، پس از یک هفته کشت روی محیط کشت M<sub>1</sub>، تک کلنی های گرد، چروکیده و متوسط با پشت و روی شیری رنگ و اسپورهای سفید دارد. همچنین کانی های در وسط تورفتگی و در اطراف و نیز هاله برآمدگی دارند. نتایج بیوشیمیایی ایزوله ASR7 در «جدول ۳» آمده است. همان گونه که مشاهده می شود، ایزوله اکتینومایست جدا شده از اسفنج دریایی S12 برای همه تست های انجام شده در این مطالعه، به غیر از تست کاتالاز منفی است. نتیجه رنگ آمیزی گرم نیز مثبت بود.



شکل ۳. محصول PCR ژن *16S rDNA* ایزوله اکتینومایست بر ژل آگارز ۱ درصد. ستون ۱: محصول تکثیرشده، M: سایز مارکر 1kb

جدول ۴. گونه‌هایی که بیشترین شباهت را با گونه مطالعه شده در سطح توالی نوکلئوتیدی *16S rDNA* دارند

گونه	درصد شباهت
<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	۹۵
<i>Streptomyces</i> spp. A-202	۹۴
<i>Streptomyces</i> spp. strain WA12-1-1	۹۴
<i>Streptomyces</i> spp. strain WA10-4-1	۹۴
<i>Streptomyces</i> spp. strain ZTSt13	۹۴
<i>Streptomyces</i> spp. strain JCS9	۹۴
<i>Streptomyces</i> spp. strain JCS8	۹۴

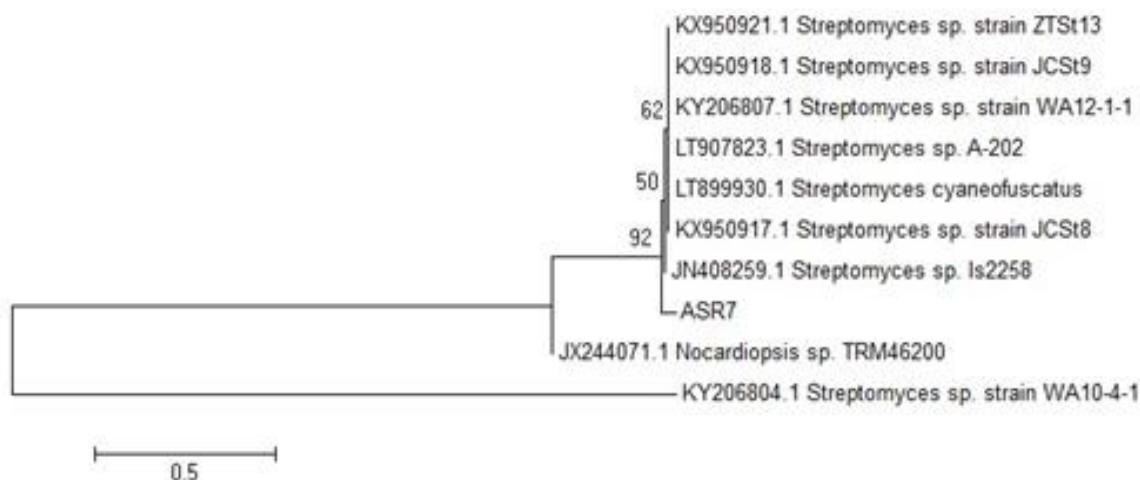
### شناسایی مولکولی

ژن *16S rDNA* ایزوله ASR7 به طول تقریباً ۱۵۰۰ جفت باز تکثیر شد. (شکل ۳) نتایج حاصل از توالی‌یابی صحت باند تکثیرشده را تأیید کرد.

نتایج به دست آمده از بلاست توالی نوکلئوتیدی حاصل از توالی‌یابی ژن *16S rDNA* در پایگاه داده‌های اطلاعات ژنتیکی (NCBI) نشان داد که این توالی بیشترین شباهت (۹۵٪) را با گونه *Streptomyces cyaneofuscatus* دارد و با بقیه گونه‌های ثبت شده این شباهت ۹۴٪ و کمتر است (جدول ۴). این نتیجه از نظر مولکولی تأیید می‌کند که ایزوله مطالعه شده از جنس *استریتومایسس* است. همچنین نشان می‌دهد که ایزوله مطالعه شده گونه جدید است.

نتایج حاصل از رسم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم افزار MEGA6 به روش پیوند هم‌جواری (NJ) و بوت استرپ ۱۰۰۰، نشان می‌دهد که ایزوله ASR7 با هیچ یک از گونه‌های مشابه ثبت شده در یک کلاد خواهری قرار نمی‌گیرد (شکل ۴).

نتایج حاصل نشان داد که عصاره اتیل استاتی فعالیت ضدباکتریایی خوبی علیه باکتری‌های بیماری‌زا دارد، در حالی که عصاره متانولی روی باکتری‌های بیماری‌زا مؤثر نبود. قطر هاله رشدنیافتگی باکتری‌های *Escherichia*، *Salmonella* spp.، *Bacillus cereus* و *coli* در مواجهه با عصاره اتیل استاتی به ترتیب ۱۵/۹، ۱۴/۵۹ و ۱۳/۰۹ میلی‌متر بود و روی دو باکتری بیماری‌زای *Proteuse* spp. و *Klebsiella* spp. اثر ضدباکتریایی مشاهده نشد. (شکل ۵).



شکل ۴. درخت فیلوژنی ایزوله ASR7 بر اساس توالی ژن *16S rDNA*. گونه *Nocardiosis* TRM4620 به عنوان برون گروه در نظر گرفته شده است.

در ایزوله تحت مطالعه با حداکثر ۹۵٪ شباهت با گونه *Streptomyces cyaneofuscatus* یک گونه استرپتومایسس دریایی جدید به حساب می‌آید.

Mahmoud و همکاران (۲۰۰۹)، مطالعه‌ای روی جداسازی و شناسایی باکتری‌های همزیست با اسفنج *Haliclona simulans* انجام دادند (۳۸). آنها نشان دادند که ترکیبات جدا شده از جدایه‌ها/استرپتومایسس SM2 و SM4 فعالیت‌های آنتی‌بیوتیکی وسیع‌الطیف دارند. این مطالعه نشان می‌دهد که میکروب‌های همزیست با اسفنج‌های دریایی قابل کشت منبع مهم ترکیبات فعال بیولوژیکی هستند. ایزوله مطالعه‌شده در این تحقیق فعالیت ضد میکروبی جالب توجهی علیه سه باکتری بیماری‌زای *Bacillus cereus*، *Escherichia coli* و *Salmonella sp.* نشان داد. Zhang و همکاران (۲۰۰۹) مطالعه‌ای درباره جداسازی و شناسایی باکتری‌های همزیست با اسفنج‌های دریایی چین جنوبی و همچنین فعالیت ضدباکتریایی آنها را علیه باکتری‌های بیماری‌زای مختلف، با روش انتشار در دیسک مشابه روش به کار برده شده در تحقیق حاضر انجام دادند (۴۲). آنها نشان دادند که از میان ۸۰ جدایه، ۱۸ جدایه فعالیت ضد میکروبی گسترده‌ای علیه قارچ‌ها، باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارند. مطالعات گزارش شده و نیز نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان‌دهنده فعالیت ضد میکروبی متابولیت‌های مرتبط با باکتری‌های همزیست با اسفنج‌های دریایی به‌ویژه استرپتومایسس‌های متعلق به شاخه اکتینوباکتیریا است. این نتایج اهمیت گونه‌های این جنس را در صنعت داروسازی و بیوتکنولوژی بالا می‌برد.

### نتیجه‌گیری

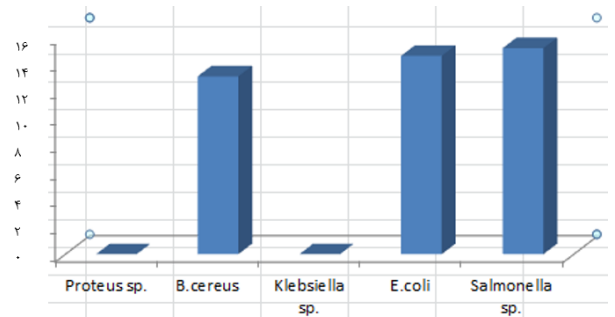
این مطالعه نشان داد که اسفنج *SI2* جمع‌آوری شده از اعماق آب‌های بوشهر باکتری همزیست با خود دارد که فعالیت ضد میکروبی جالب توجهی علیه باکتری‌های بیماری‌زای انسانی انجام می‌دهد. به نظر می‌رسد اسفنج‌های دریایی خلیج فارس یک منبع بالقوه از اکتینومیست‌های دریایی ارزشمند از نظر بیوتکنولوژی دارویی هستند که لازم است در این راستا مطالعات بیشتری صورت گیرد.

### سپاسگزاری

از دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر که امکان انجام این پروژه تحقیقاتی را فراهم کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

### تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.



شکل ۵. نمودار میله ای قطر هاله‌های مهارشده فعالیت ضد باکتریایی ایزوله ASR7 علیه ۵ باکتری بیماری‌زا

### بحث

در حال حاضر برای جداسازی اکتینومیست‌ها، روی صخره‌های مرجانی و اسفنج‌های دریایی تمرکز شده است، زیرا بهترین محیط‌های شناخته‌شده اکتینومیست‌های دریایی هستند. مطالعات مختلفی تنوع و فراوانی اکتینوباکتری‌های همزیست را اندازه‌گیری کرده و دریافته‌اند که در سیستم‌های نامبرده، این باکتری‌ها به‌طور گسترده و پایداری در ارتباط هستند (۳۸-۴۰). بین گونه‌های اسفنجی متفاوت، وجود، فراوانی و تنوع اکتینوباکتری‌های قابل کشت متفاوت است (۲۳). با این حال، میکرومونیوسپورا، رودوکوکوس و استرپتومایسس از گروه‌های غالب در محیط دریایی گزارش شده‌اند (۳۳). فراوانی جنس استرپتومایسس نیز قبلاً گزارش شده است (۲۲، ۲۱)؛ به طوری که روش‌های وابسته به کشت و مستقل از کشت برای استرپتومایسس‌های همزیست با اسفنج *Haliclona spp.* نشان داد که اعضای استرپتومایسس‌ها غالب هستند (۲۵). به‌طور مشابه بیش از ۸۰٪ از جدایه‌های *Iotrochota spp.* متعلق به جنس استرپتومایسس است (۲۱). بیشترین فراوانی جنس به عنوان استرپتومایسس (۷۴٪) از میان جدایه‌های *Hymenia cidonperlev* جمع‌آوری شده از دریای زرد (چین) گزارش شده است (۳) که این گزارش‌ها با مطالعه حاضر همخوانی داشتند.

به نظر می‌رسد که استرپتومایسس‌ها جنس غالب اکتینوباکتری‌های مرتبط با اسفنج‌های جمع‌آوری شده از شرق دریای مدیترانه هستند. در تحقیق حاضر، ایزوله جدا شده از اسفنج دریایی چندشکلی *SI2* از جنس استرپتومایسس بود. مطالعات حاصل از بلاست توالی ژن *16S rDNA* نشان داد که ایزوله ASR7 یک گونه جدید از جنس استرپتومایسس است. تمام گونه‌هایی که براساس توالی ژن‌های *16S rDNA* ۹۸٪ و کمتر از آن با توالی ژن‌های ثبت شده از گونه‌های موجود در بانک اطلاعات ژنی شباهت داشته باشند، گونه‌ای جدید شناخته می‌شوند (۳۵) که توالی ژنی

## References

- Fieseler L, Horn M, Wagner M, Hentschel U. Discovery of the Novel Candidate Phylum "Poribacteria" in Marine Sponges. *J Appl Environ Microbiol.* 2004;70(6):3724-32. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3724-3732.2004> PMID:15184179 PMID:15184179
- Taylor MW, Radax R, Steger D, Wagner M. Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007;71(2):295-347. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-06> PMID:17554047 PMID:17554047
- Zhang H, Lee YK, Zhang W, Lee HK. Culturable actinobacteria from the marine sponge *Hymeniacidon perlevei*: isolation and phylogenetic diversity by 16S rRNA gene-RFLP analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2006;90(2):159-69. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9070-1> PMID:16871424
- Christensen A, Martin GD. Identification and bioactive potential of marine microorganisms from selected Florida coastal areas. *Microbiologyopen.* 2017;6(4):1-10. <https://doi.org/10.1002/mbo3.448> PMID:28127894 PMID:28127894
- Thakur NL, Müller WE. Biotechnological potential of marine sponges. *Curr Sci.* 2004;86(11):1506-12.
- Brinkmann CM, Marker A., Kurtboke Dİ. An Overview on Marine Sponge-Symbiotic Bacteria as Unexploited Sources for Natural Product Discovery. *Diversity.* 2017;9(40):1-31.
- Indraningrat AA, Smidt H, Sipkema D. Bioprospecting Sponge-Associated Microbes for Antimicrobial Compounds. *Marine Drugs.* 2016;14(5):87. <https://doi.org/10.3390/md14050087> PMID:27144573 PMID:27144573
- Sathyanarayanan G, Saibaba G, Kiran GS, Yang YH, Selvin J. Marine sponge-associated bacteria as a potential source for polyhydroxyalkanoates. *Crit Rev Microbiol.* 2017;43(3):294-312. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1206060> PMID:27824282
- Montalvo NF, Mohamed NM, Enticknap JJ, Hill RT. Novel actinobacteria from marine sponges. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2005;87(1):29-36. <https://doi.org/10.1007/s10482-004-6536-x> PMID:15726288
- Webster NS, Wilson KJ, Blackall LL, Hill RT. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(1):434-44. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.434-444.2001> PMID:11133476 PMID:11133476
- Hentschel U, Hopke J, Horn M, Friedrich AB, Wagner M, Hacker J, Moore BS. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(9):4431-40. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4431-4440.2002> PMID:12200297 PMID:12200297
- Kamke J, Taylor MW, Schmitt S. Activity profiles for marine sponge-associated bacteria obtained by 16S rRNAs 16S rRNA gene comparisons. *ISME J.* 2010;4(4):498-508. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.143> PMID:20054355
- Webster NS, Taylor MW, Behnam F, Lückner S, Rattet T, Whalan S, Horn M, Wagner M. Deep sequencing reveals exceptional diversity and modes of transmission for bacterial sponge symbionts. *Environ Microbiol.* 2010;12(8):2070-82 PMID:21966903 PMID:21966903
- Miyadoh S. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: a producing microorganism approach. *Actinomycetologica.* 1993;7(2):100-6. [https://doi.org/10.3209/saj.7\\_100](https://doi.org/10.3209/saj.7_100)
- Kämpfer P. The family Streptomycetaceae, part I: taxonomy. New York: Springer, The Prokaryotes; 2006, p. 538-604.
- 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(10):3695-700. PMID:7487005 PMID:7487005
- Mincer TJ, Jensen PR, Kauffman CA, Fenical W. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(10):5005-11. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.5005-5011.2002> PMID:12324350 PMID:12324350
- Kim TK, Garson MJ, Fuerst JA. Marine actinomycetes related to the 'Salinospora' group from the Great Barrier Reef sponge *Pseudoceratina clavata*. *Environ Microbiol.* 2005;7(4):509-18. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00716.x> PMID:15816928
- Li ZY, Liu Y. Marine sponge *Craniellaaustriensis*-associated bacterial diversity revelation based on 16S rDNA library and biologically active Actinomycetes screening, phylogenetic analysis. *Lett Appl Microbiol.* 2006;43(4):410-6. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01976.x> PMID:16965372



20. Jiang S, Sun W, Chen M, Dai S, Zhang L, Liu Y, Lee KJ, Li X. Diversity of culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Haliclona* sp. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2007;92(4):405-16. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9169-z> PMID:17566868
21. Baskaran R, Subramanian T, Zuo W, Qian J, Wu G, Kumar A. Major Source of Marine Actinobacteria and Its Biomedical Application. *New York: Springer, Microbial Applications Vol.2*; 2017, p. 55-82. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-52669-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-52669-0_3)
22. Schneemann I, Ohlendorf B, Zinecker H, Nagel K, Wiese J, Imhoff JF. Nocapyrones A–D,  $\gamma$ -pyrones from a *Nocardiopsis* strain isolated from the marine sponge *Halichondriapanicea*. *J Nat Prod*. 2010;73(8):1444-7. <https://doi.org/10.1021/np100312f> PMID:20695474
23. 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. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9196-9> PMID:17717723
24. Selvin J, Shanmughapriya S, Gandhimathi R, Kiran GS, Ravji TR, Natarajaseenivasan K, Hema TA. Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardiopsis dassonvillei* MAD08. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;83(3):435-45. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1878-y> PMID:19190903
25. Abdelmohsen UR, Pimentel-Elardo SM, Hanora A, Radwan M, Abou-El-Ela SH, Ahmed S, et al. Isolation, phylogenetic analysis and anti-infective activity screening of marine sponge-associated actinomycetes. *Mar drugs*. 2010;8(3):399-412. <https://doi.org/10.3390/md8030399> PMID:20411105 PMCID:PMC2857355
26. Jensen PR, Gontang E, Mafnas C, Mincer TJ, Fenical W. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environ Microbiol*. 2005;7(7):1039-48. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00785.x> PMID:15946301
27. Cannon SA, Giovannoni SJ. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(8):3878-85. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3878-3885.2002> PMCID:PMC124033
28. Wikler MA, editor. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Seventeenth informational supplement. Wayne, PA: Approved Standards CLSI; 2007.
29. Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J. Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *J Clin Microbiol*. 2000;38(1):471. PMID:10681211 PMCID:PMC88759
30. Hameş-Kocabaş EE, Ataç UZ. Isolation strategies of marine-derived actinomycetes from sponge and sediment samples. *J Microbiol Methods*. 2012;88(3):342-7. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.01.010> PMID:22285852
31. Jensen PR, Dwight R, Fenical W. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl Environ Microbiol*. 1991;57(4):1102-8. PMID:2059035 PMCID:PMC182852
32. 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. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9196-9> PMID:17717723
33. Selvin J, Shanmughapriya S, Gandhimathi R, Kiran GS, Ravji TR, Natarajaseenivasan K, Hema TA. Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardiopsis dassonvillei* MAD08. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;83(3):435.
34. Öner Ö, Ekiz G, Hameş EE, Demir V, Gübe Ö, Özkaya FC, et al. Cultivable sponge-associated actinobacteria from coastal area of Eastern Mediterranean Sea. *Advances in Microbiology*. 2014;4(06):306. <https://doi.org/10.4236/aim.2014.46037>
35. Prieto-Davó A, Fenical W, Jensen PR. Comparative actinomycete diversity in marine sediments. *Aquat Microb Ecol*. 2008;52(1):1-1. <https://doi.org/10.3354/ame01211>
36. Cheng HR, Jiang N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnol Lett*. 2006;28(1):55-9. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-4688-z> PMID:16369876
37. Salami F. Isolation and determination of *Streptomyces* that produce antibiotic from soil. *Pajouhesh va Sazandegi*. 2004;17(3):41-7.
38. Mahmoud HM, Kalendar AA. Coral-associated Actinobacteria: diversity, abundance, and biotechnological potentials. *Front Microbiol*. 2016;7:204. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00204> PMID:26973601 PMCID:PMC4770044
39. Abdelmohsen UR, Yang C, Horn H, Hajjar D, Ravasi T, Hentschel U. Actinomycetes from Red Sea sponges: sources for chemical and phylogenetic diversity. *Mar Drugs*. 2014;12(5):2771-89. <https://doi.org/10.3390/md12052771> PMID:24824024 PMCID:PMC4052315
40. Braña AF, Fiedler H-P, Nava H, González V, Sarmiento-Vizcaíno A, Molina A, et al. Two

Streptomyces species producing antibiotic, antitumor, and anti-inflammatory compounds are widespread among intertidal macroalgae and deep-sea coral reef invertebrates from the central Cantabrian Sea. Microb Ecol. 2015;69(3):512-24. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0508-0> PMID:25319239

41. Kennedy J, Baker P, Piper C, Cotter PD, Walsh M, Mooij MJ, et al. Isolation and analysis of bacteria with antimicrobial activities from the marine sponge *Haliclona simulans* collected from Irish waters. Mar Biotechnol (NY). 2009;11(3):384-96. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9154-1> PMID:18953608

42. Zhang W, Zhang F, Li Z, Miao X, Meng Q, Zhang X. Investigation of bacteria with polyketide synthase genes and antimicrobial activity isolated from South China Sea sponges. J Appl Microbiol. 2009;107(2):567-75. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04241.x> PMID:19302490