Archive of SID

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

حسن علی‌جانی: دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی دریا، دانشگاه علوم وفنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران. hasanaalijani@gmail.com
***سهیلا مطرودی**: استادیار و متخصص ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم وفنون 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 وفنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران. isaac.zfr@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۱۵

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 ضدمیکروبی به‌حساب می‌آیند. گونه‌های مختلف جنس استرپتومایسس از جمله منابع بلقوه تولید کننده ترکیبات ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی با استفاده از روش تشکیل هاله مهاری 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 فیلوژنی 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 ضدمیکروبی را دارند. نتایج مطالعات ضدمیکروبی 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 ولگاریس وگونه‌های کلبسیلافعالیت مهاری نداشته‌اند. بیشترین فعالیت مهار 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 بیماریزا فعالیت مهاری نشان داده‌اند. بیشترین هاله مهاری تشکیل شده مربوط به عصاره ایزوله AHA1 علیه قارچ تریکوفیتون منتاگروفیتس 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 ضدمیکروبی عمل کند.

کلیدواژه‌ها: اکتینومیست، استرپتومایسس، فعالیت ضدمیکروبی، رسوبات جزر ومدی

مقدمه

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 پزشکی به عنوان عوامل ضدتومور، آنتی بیوتیک‌ها، یا داروهای سرکوب کننده ایمنی هستند (۶-۴). این محصولات طبیعی از جمله: بلئومایسین، دوکسوروبیسین، راپامایسین، میترامایسین و C-1027 را تشکیل می‌دهندکه 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،

www.SID.ir

Archive of SID

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 ژن های پلی کتید سنتاز و فعالیت ضد میکروبی باکتری های جدا شده از اسفنج های دریای چین جنوبی پرداختند (۹). Gontang و همکاران، شصت باکتری اکتینومیست را از رسوبات دریایی جداسازی کردند و با استفاده از غربالگری PCR، ژن های مرتبط با بیوسنتز متابولیت های ثانویه را شناسایی کردند (۱۰).

Engelhardtو همکاران، به جداسازی و شناسایی کلاستر ژن بیوسنتزکننده آنتی بیوتیک تیوپپتید TP-1161پرداختند. در این بررسی آنتی بیوتیک تیوپپتید TP-1161، ازتخمیر محیط کشت مایع یک اکتینومیست دریایی از جنس Nocardiopsis 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 پیش نویس، ساختار توالی پپتیدی کلاستر ژنی TP-1161 پیش بینی شد. همین گروه تحقیقاتی تعداد ۲۷ اکتینوباکتر را از رسوبات دریایی و اسفنج ها جداسازیکردند و توانایی باکتری ها را برای تولید متابولیت های 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 اکتینومیست های ناحیه جزر و مدی از ساحل دیلم و بررسی فعالیت ضدمیکروبی ایزوله های جدا شده می‌باشد. در این تحقیق ۶ ایزوله استرپتومایسس از رسوبات بین جزرو مدی ساحل دیلم جداسازی و با استفاده از 16S rRNA شناسایی شدند. سپس فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی متابولیت‌های ثانویه القا شده توسط کشت ایزوله های جدا شده در محیط القایی ارزیابی شدند.

روش کار

نمونه‌برداری

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 انجا مشد. 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 رقتهای 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 F5´-AGAGTTTGA۲۷ TCCTGGCTCAG-3´ و 5´-GGTTACCTT R۱۴۹۲ GTTACGACTT-3´، مواد مورد استفاده و شرایط واکنش PCR مطابق مراحل زیرانجام شد.

DNA الگو ۱۰۰ نانوگرم، آنزیم Taq DNA Polymerase۲/۵ واحد برمیکرولیتر، بافر PCRx۱۰ ۲/۵ میکرولیتر، Mgcl2 ۵۰ میلی مولار، dNTP۱۰ میلی مولار ۰/۵ میکرولیتر، آغازگرهای F۲۷ و R۱۴۹۲ هرکدام ۲۰ پیکومول شرایط و مراحل واکنش PCR به ترتیب: واسرشت سازی اولیه ۹۵ **درجه‌سانتیگراد**به مدت ۲ دقیقه، برای ۳۵ سیکل واسرشت سازی ۹۵ درجه‌سانتیگرادبه 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.

www.SID.ir

Archive of SID

آنالیز داده‌های مولکولی

کروماتوگرام‌های به دست آمده از توالی یابی ابتدا به وسیله نرم‌افزار بررسی و ویرایش شدند.

پس از آ نتوالی‌های 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، گونه های سالمونلا، گونه‌های پروتئوسو گونه های کلبسیلا انجام گرفت. فعالیت ضد قارچی علیه قارچ‌های بیماریزایتریکوفیتون 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 ترشحی 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 میسلیوم و رنگیزه‌هایی که تولید می‌کنند، جداسازی شدند. اکثر ایزوله‌ها کلونی‌های چتری شکل تولید می‌کنند. غالباً رنگ میسلیوم‌های 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 می‌باشد. نتایج حاصل از آنالیزهای بیوشیمیایی نشان می‌دهد که تمام ایزوله‌ها کاتالاز مثبت و برای تست‌های TSI، VP، 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 H_2S و تحرک ایزوله‌ها می باشد 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).

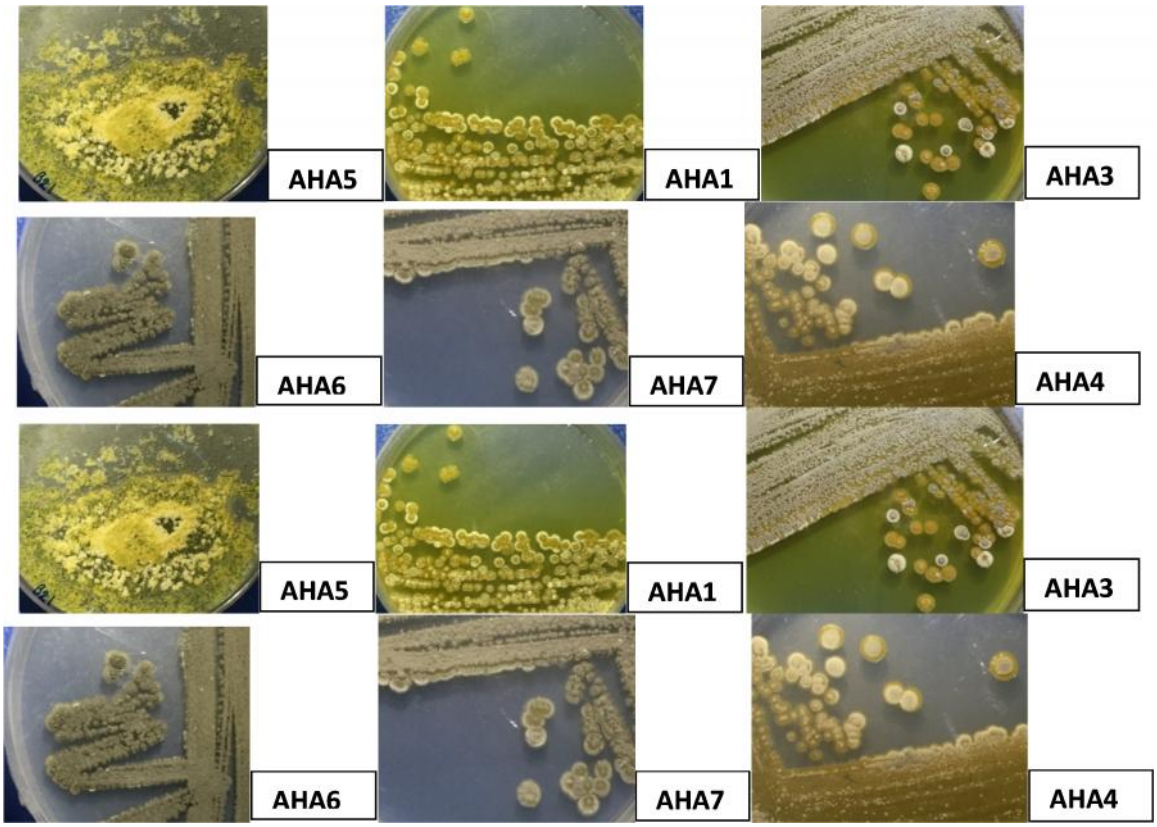
مشاهدات حاصل از الکتروفورز ژل آگارز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، جایگاه قطعه‌ی تکثیر شده را در محل مورد نظر (محدوده

جدول ۱- ویژگی‌های ظاهری اکتینومیست‌های جدا شده

جدایه ها	مشخصات
AHA1	رنگ روی کلونی‌ها سفید، پشت کلونی‌ها زرد، میسلیوم زمینی خاکستری، میسلیوم هوایی سفید تولید رنگیزه های زرد، تک کلونی چتری شکل.
AHA3	رنگ روی کلونی‌ها سفید، پشت کلونی‌ها زرد، میسلیوم زمینی خاکستری، میسلیوم هوایی خاکستری، تولید رنگیزه های زرد، تک کلونی‌های چتری شکل.
AHA4	میسلیوم زمینی زرد رنگ، میسلیوم هوایی سفید، رنگ تک کلونی سفید و پشت کلونی زرد کم‌رنگ.
AHA5	دارای هیف‌های زیاد، میسلیوم‌های هوایی خاکستری تا سبز رنگ، رنگ روی کلونی سبز مایل به زرد و داری اسپورهای خاکستری رنگ.
AHA6	تک کلونی‌های این سویه به‌صورت خاکستری پرنگ هستند. اسپور هوایی خاکستری رنگ تولید می‌کنند و فاقد رنگیزه.
AHA7	دارای کلونی‌های سفید رنگ با میسلیوم‌های هوایی خاکستری،پشت کلونی آجری

www.SID.ir

Archive of SID



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

bp ۱۵۰۰) 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*، *AHA5* با بوت استرپ بالای ۹۹٪ و AHA4، *AHA6*، *AHA7* با بوت استرپ بالای ۵۰٪ و همچنین گونه *AHA2* و *Nocardiopsis sp. 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 انسانیباسیلوس سرئوس، اشرشیا کولی، سالمونلاتیفی، پروتوس ولگاریس و گونه های کلبسیلابا اندازه‌گیری قطر هاله حاصل از عدم رشد باکتری بررسی شد (جدول ۲).

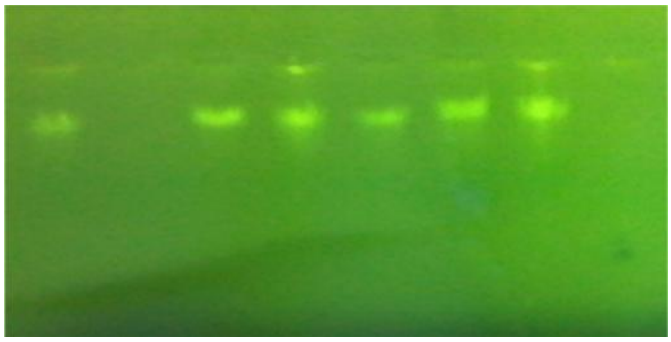
بر اساس نتایج به دست آمده حساس‌ترین باکتری نسبت به عصاره *AHA1*، سالمونلا با قطر هاله ۸/۶۱±۰/۵ میلی‌متر بود در حالی که باکتری‌های دیگر نسبت به عصاره *AHA1*، مقاومت نشان دادند. فعالیت عصاره *AHA3* بر باکتری‌ها نشان داد که عصاره مذکور تنها بر باکتری‌های باسیلوس سرئوس و سالمونلاتیفی اثر مهاری داشتند که هاله‌هایی به ترتیب با قطر ۷/۸±۰/۵ و ۷/۸±۰/۱ میلی‌متر اثر مهاری نشان داده است و بر سایر باکتری‌ها بی تاثیر 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

www.SID.ir

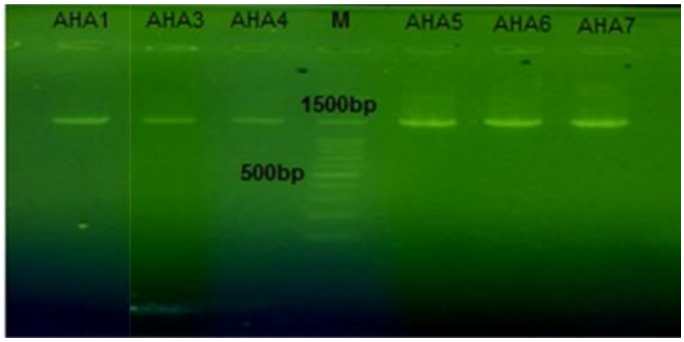
Archive of SID

جدول۲- نتایج تست‌های بیوشیمیایی اکتینومیست‌ها

Test		*AHA1*	*AHA3*	*AHA4*	*AHA5*	*AHA6*	*AHA7*
Catalase		+	+	+	+	+	+
MR		+	-	-	-	-	-
VP		–	-	-	-	-	-
TSI		-	-	-	-	-	-
Indol		-	-	-	-	-	-
Simmon citrate		-	-	-	+	-	+
Ornithine decarboxylase		+	-	+	+	-	-
Lysine decarboxylase		–	–	–	–	–	–
SIM	H_2S	-	-	-	-	-	-
	motility	-	-	-	-	-	-
Gram		+	+	+	+	+	+



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



شکل۳ – الکتروفورز محصول PCR سویه‌های اکتینومیست بر روی ژل آگارز ۱٪.
ستون M : مارکر ۱۰۰bp. و محصولات PCRAHA1، AHA3، AHA4، AHA5، AHA6 و AHA7 هستند

فعالیت ضد باکتریایی بیشتری داشته و بر روی سه باکتری اشرشیا کولی، باسیلوس سرئوس، سالمونلاتیفیبه ترتیب با قطر هاله ۸/۲±۰/۲، ۸/۷±۰/۵ و ۹/۲±۱ میلی‌متر اثر مهاری داشته وپروتوسولگاریسوگونه های کلبسیلا نسبت به این عصاره مقاومت نشان دادند. حساس‌ترین باکتری نسبت به عصاره *AHA6* بر اساس نتایج به دست آمده، سرئوس با قطر هاله ۸/۲±۰/۲ 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 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

www.SID.ir

Archive of SID

جدو ل۲- فعالیت ضد میکروبی عصاره اکتینومیست‌ها علیه باکتری‌های بیماری‌زای انسانی به روش انتشار دیسک ((mean± S.D(mm)

باکتری‌ها	*AHA1*	*AHA3*	*AHA4*	*AHA5*	*AHA6*	*AHA7*	محیط کشت	پنی‌سیلین
E. coli	–	–	–	۸/۲±۰/۲^{b}	–	–	–	–
P. volgaris	–	–	–	–	–	–	–	۱۳/۶^{a}
B. cereus	–	۷/۸±۰/۵^{a}	–	۸/۷±۰/۵^{ab}	۸/۲±۰/۲^{a}	–	–	۱۳/۳۷^{b}
Klebsiella sp.	–	–	–	–	–	–	–	–
S. typhi	۸/۶۱±۰/۵۸^{a}	۷/۸±۰/۱^{a}	۹^{a}	۹/۲±۱^{a}	–	–	–	۱۰/۰۲^{c}

–بدون فعالیت

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

جدول۳- فعالیت ضد میکروبی عصاره اکتینومیست‌ها علیه قارچ‌های بیماری‌زای انسانی به روش چاهک ((mean± S.D(mm)

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

– بدون فعالیت. حروف a، b، c، d و eدر هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است.

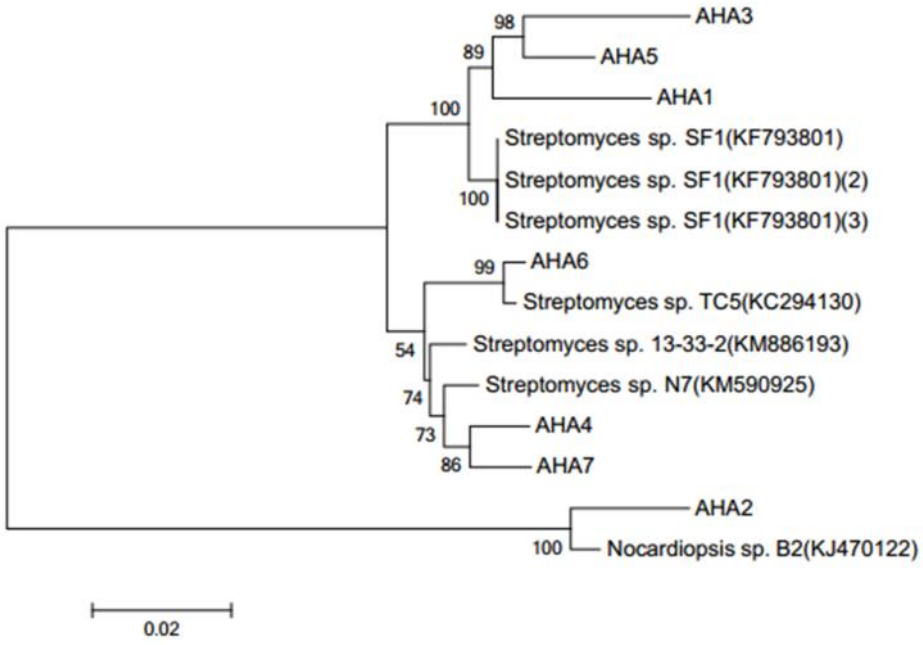
پنسیلیومفعالیت ضدقارچی نشان داده است. این عصاره بر قارچ‌های بیماری‌زاآسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس نایجر، تریکوفیتون منتاگروفیتس، میکروسپوروم جیپسوم*وکاندیدا البیکانز* به ترتیب با قطر هاله ۵/۸۴±۰/۲، ۱۰/۱۳±۰/۳، ۲۱±۰/۲، ۱۶/±۰/۱ و ۹/۰۷±۰/۰۳ میلی‌متر فعالیت ضد قارچی نشان داد. بیش‌ترین فعالیت ضد قارچی این عصاره بر روی قارچتریکوفیتون منتاگروفیتس بود. عصاره حاصل از ایزوله *AHA3* علیه تمام قارچ‌های بیماری‌زای مورد استفاده به استثنای قارچ پنسیلیوم اثر مهاری داشته است. بیشترین اثر ضد قارچی این عصاره روی قارچ‌هایتریکوفیتون 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 جزتریکوفیتون منتاگروفیتس و پنسیلیوم اثر ضد قارچی داشته و بیشترین فعالیت ضد قارچی را رویمیکروسپوروم جیپسوم با قطر هاله ۱۵±۰/۰۱ میلی‌متر نشان داده است. عصاره AHA5 تنها روی قارچ‌هایآسپرژیلوس فلاووس و پنسیلیومپنسیلیوم به ترتیب با قطر هاله ۱۹±۰/۱ و ۱۴±۰/۰۱ 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 جزتریکوفیتون منتاگروفیتس نسبت به عصاره AHA6 مقاومت نشان دادند. قطر هاله مهاری مشاهده شده برایتریکوفیتون منتاگروفیتس ۹±۱ میلی‌متر بود. نتایج حاصل نشان داد که به جزمیکروسپوروم جیپسوم و پنسیلیوم به ترتیب با قطر هاله ۱۸±۱ و ۱۳±۱ میلی‌متر بقیه قارچ‌ها نسبت به عصاره AHA7 مقاوم بودند.

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه اغلب انتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده از ترکیبات جدا شده از باکترها و قارچ‌ها توسعه یافته‌اند که همچنان اکتینومیست‌ها منبع غالب و دائمی هستند (۱۵). اکتینومیست‌های مشتق از رسوبات یکی از منابع جدید مواد ضدمیکروبی می‌باشند (۱۱). عمده داروهای بیماریهای عفونی از محصولات طبیعی الهام گرفته‌اند (۱۶). یکی از منابع امیدوار کننده حصول مواد ضدمیکروبی

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۴- درختچه NJ گونه‌های اکتینومیست بر اساس توالی ژن 16S rDNA

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

در این تحقیق شش ایزوله اکتینومیست از رسوبات بین جزر و مدی ساحل دیلم جداسازی شدند مطالعات فیلوژنتیکی نشان می‌دهد که هر شش ایزوله متعلق به جنس استرپتومایسس 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 باکتری-های بیماری‌زای مورد مطالعه، ایزوله AHA5 می-باشد که علیه سه سویهباسیلوس سرئوس، اشرشیا کولی، سالمونلاتیفی، فعالیت مهار رشد نشان داده-است. بیشترین هاله مهار رشد تشکیل شده علیه باکتری و سالمونلا تیفی به قطر ۹/۲ میلی‌متر 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 استرپتومایسس می‌باشد علیه ایزوله‌های استافیلوکوک اورئوس، استافیلوکوک اپیدرمیدیس، اشرشیا کولی وپروتوس ولگاریس اثر مهاری داشته و هیچ اثری علیهسودوموناس آئروژینوزا *و کاندیدا البیکانز نداشته است* (۲۵). Deepthi و همکاران نشان دادند متابولیت‌های ایزوله. استرپتومایسیس جدا شده از جنگل مانگرو Andhra Pradesh هند علیه سویه‌های بیماری‌زای استافیلوکوک اورئوس، سودوموناس فلوروسنس، سودوموناس آئروژینوزا، لاکتوباسیلوس

www.SID.ir

Archive of SID

اسیدوفیلس، لاکتوباسیلوس کزئوس، *کاندیدا البیکانز استرپتوکوکوس موتانز*، *باسیلوس سرئوس* و زانتوموناس *اثر مهاری 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 بیمای‌زای پنسیلیوم نداشته‌اند. بیشترین هاله تشکیل شده مربوط به عصاره ایزوله AHA1 علیه قارچتریکوفیتون منتاگروفیتس به قطر ۲۱ میلی‌متر مشاهده شد. تنها ایزوله‌های AHA5 و AHA7 رشد قارچ پنسیلیوم مهار کرده‌اند. Khamna نشان داد عصاره خام ترکیبات ضدقارچی علیه *رایزوکتونیا استولونیفر*، *آسپرژیلوس فلاووس*، *فوزاریوم اوکسیسپوروم* و *التناریا* فعال است (۲۷). Lim و همکاران ۳۲ ایزوله اکتینومیست که فعالیت مهاری علیه رشد میسلیوم قارچ‌های پاتوژن مانند *کولتروتریکوم گلئوسپورید*، *التناریا مالی*، *رایزوکنونیا سولانی*، *فیتوفتورا کپسیسی*، *مگناپورت گراسیا*، *اکسیسپوروم کوکومرینیوم* را انتخاب کردند (۲۸). این نتایج نشان می‌دهد که فعالیت ضدمیکروبی ایزوله‌ها به دلیل تولید ترکیبات فعال بیولوژیک برون سلولی می‌باشد.

تحقیقات نشان می دهد که در طبیعت اغلب آنتی‌بیوتیک‌ها در اکتینومیست‌ها برون سلولی هستند (۲). عدم شناسایی ترکیبات فعال زیستی از جمله محدودیت های این تحقیق است که به دلیل محدودیت امکانات موجود صورت نگرفت. نتایج تحقیق نشان می دهد که رسوبات جزر و مدی ساحل دیلم منبعی بلقوه از اکتینومیستهای با پتانسیل تولید ترکیبات ضدمیکروبی است که ضرورت دارد با مطالعات بیوشیمیایی این ترکیبات فعال زیستی تخلیص و شناسایی شوند و پتانسیل تولید این ایزوله ها 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 discovery: 80 years of progress. J Antibiot (Tokyo) 2009;62: 5-16.
2. Arasu MV, Duraipandiyan V, Agastian P, andIgnacimuthu 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. Antibacterialagentsfrom actinomycetes–areview. Front Biosci (EliteEd) 2012;1:240-53.
7. Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, KimSK. 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, nematicidal 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 Leeuwenhoek2008; 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 Microbial 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 Microbiol1995;61:3695-700.
13. Shrilling EB, Gittlieb D. methods for characterization of *streptomycetes* sp. Int J syst Bacteriol 1966;16:313-340.
14. Alijani H, Matroodi S, Sharafi A, Zamani I. Antimicrobial activity of marine actinomycete Nocardiopsis sp. AHA2 synthesized silver nanoparticles against microbial pathogens. RJMS. 2016; 23 (147) :74-81.
15. Magarvey NA, Keller JM, Bernan V, Dworkin M, Sherman DH. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. Appl Environ Microbiol

www.SID.ir

Archive of SID

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 Micr2009;59(3):472-6.

19. Valli S, Suvathi Sugasini S, Aysha OS, Nirmala P, Vinoth Kumar P, Reena A. Antimicrobial potential ofactinomycetes species isolated from marine environment. Asian Pac J Trop Biomed2012: 469-473.

20. Becerril-Espinosa A, Freel KC, Jensen PR, Soria-Mercado IE. Marine Actinobacteria from the Gulf of California: diversity, abundanceand secondary metabolite biosynthetic potential. Antonie VanLeeuwenhoek2013;103:809-19.

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

22. Zaburannyi N, Rabyk M, Ostash B, Fedorenko V, Luzhetskyy A. Insights into naturally minimised Streptomyces albus J1074 genome. BMCGenomics 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 Lett1999;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 Microbiol2011;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 Bull2010;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.

www.SID.ir

Archive of SID

Original Article http://rjms.iums.ac.ir

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
Isac 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 metabolitesare diverse in biological, chemical structures and functions and the most prolific source of antimicrobial compounds. Most of these antimicrobial have beenisolated 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 palate assay.
Methods: Six isolates were isolated from soil samples collected from different sites. Allsix isolates were considered as *Streptomyces* sp. according to phylogentic 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 thatmangrove Deylam intertidal sediments represented a reservoir for isolation of *Actinobacteria*, which are potential sources for discovery of antimicrobial secondarymetabolites.

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

www.SID.ir