تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی - ملکولی

دوره چهارم، شماره شانزدهم، پائیز ۱۳۹۳

Research Article
مقاله تحقیقی

جداسازی و شناسایی گونه‌های میکرومونوسپورآ از خاک و خواص ضد باکتریایی آن‌ها

سمیره آذرپیرا[۱]، احمد فرج زاده شیخ[۲]، عبدالرزاق هاشمی شهرکی[۳]

۱. کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، عضو کمیته تحقیقاتی دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، پژوهشکده سلامت، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران
۲. دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۳. استادیار، گروه اپیدمیولوژی، انیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: جنس میکرومونوسپورآ منبع پرکاربرد متابولیت‌های مختلف فعال زیستی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و مهارکننده‌های آنزیم است. اعضای میکرومونوسپورآ به طور گسترده در انواع زیستگاه‌ها، به ویژه خاک غنی توزیع شده‌اند. مطالعه حاضر با هدف جداسازی، شناسایی ایزوله‌ها توسط تکثیر ژن 16S rRNA تا سطح جنس و تعیین فعالیت ضد میکروبی آنها صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها: ۶۰ نمونه خاک از نقاط مختلف ایران جمع‌آوری شد. هر نمونه خاک تحت تیمار با فنل ۱۰٫۵درصد در محیط کشت‌های مختلف مناسب برای جداسازی میکرومونوسپورآ کشت داده شد. شناسایی جنس ایزوله‌های جدا شده با استفاده از تکثیر ژن 16S rRNA با پرایمرهای اختصاصی جنس صورت گرفت. سپس عصاره متعلق به میکرومونوسپورآ جدا شده، در برابر تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا برای تعیین فعالیت ضد میکروبی آنها مورد آزمایش قرار گرفت.

یافته‌ها: از ۶۰ نمونه خاک مورد بررسی ۲۰۰ اکتینومیست جدا شد، که ۱۵ ایزوله به عنوان میکرومونوسپورآ با استفاده از تکثیر ژن 16S rRNA با پرایمرهای اختصاصی جنس تأیید شدند. از عصاره جدا شده هر ایزوله ۵ ایزوله فعالیت ضد میکروبی روی سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین ATCC 33591 ، باسیلوس سرئوس ATCC 1399 داشتند.

نتیجه‌گیری: میکرومونوسپورآهای جدا شده در این مطالعه توان تولید آنتی باکتریال‌های مؤثر بر گونه‌های MRSA به عنوان یکی از معضلات سیستم‌های بهداشتی را دارا بودند.

واژه های کلیدی: میکرومونوسپورآ، آنتی‌بیوگرام

مقدمه

پدیدارشدن سویه‌های مقاوم در بین باکتری‌های بیماری‌زا و شایع شدن بیماری‌های نوظهور باعث تلاش روز افزون جهت جستجوی ترکیبات جدید بیولوژیکی و کشف آنتی‌بیوتیک‌ها شده است. سال‌های متوالی است که میکروارگانیسم‌های

نویسنده مسئول : سمیره آذرپیرا
پست الکترونیکی: Samiraazarpira@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۴/۱۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۷/۱۲

خاک‌زی به ویژه باکتری‌های موجود در خاک به‌صورت جدی در حال غربال‌گری می‌باشند (۱۴،۱).

میکرومونوسپورآ[1] جنسی از باکتری‌های گرم مثبت، کموارگانوتروف، هوازی، اسپور دار و به شکل یک میسیلیوم منشعب متعلق به خانواده میکرومونوسپورآسه‌آ و کلاس اکتینوباکترها و راسته اکتینومیستالس می‌باشد (۲۰)،که با محتوای بالای درصد G و C ژنوم معرفی شده است. اکثر گونه‌ها اغلب به شکل کلنی‌های تیره که می‌توانند با دیگر اکتینومیست‌ها اشتباه گرفته شود دیده می‌شوند. کلنی‌ها می‌توانند انواع رنگ‌ها، از جمله سفید، نارنجی، رز، یا قهوه ای دیده می‌شوند. (۶، ۱۰، ۲۴).

میکرومونوسپورآ به طور گسترده‌ای در طبیعت توزیع شده، و ساکن چندین محیط مختلف به عنوان مثال رسوبات ساحلی، رسوبات دریایی، جنگل، باتلاق، مراتع، دشت سیلابی و ریزوسفر گیاهی است. این میکروب‌ها هم‌چنین در جوامع میکروبی پیچیده و خاک رشد می‌کنند(۱۲، ۱۳، ۲۳، ۲۵، ۲۷).

جنس میکرومونوسپورآ مدت زیادی است که به عنوان یک منبع قابل توجه از متابولیت‌های ثانویه برای تحقیقات زیست پزشکی به رسمیت شناخته شده و برخی از داده ها در مورد اهمیت این باکتری برای محیط زیست و خاک، هم‌چنین بر تأثیر گونه میکرومونوسپورآ در رشد و توسعه گیاه خبر می‌دهد.

هم‌چنین گونه‌های متعلق به جنس میکرومونسپورآ نقش بسیار بارزی در تولید آنتی‌بیوتیک‌های مختلف دارند به طوری که گونه‌های مختلف میکرومونسپورآ منشاء تولید تقریباً تمامی آمینوگلیکوزیدها[2] و تعدادی دیگر از ترکیبات ضد میکروبی می‌باشند که امروزه به صورت رایج در درمان‌های دارویی استفاده می‌شوند (۱، ۶، ۷، ۸، ۱۴، ۱۹، ۲۲).

از دیگر فعالیت بیولوژیکی میکرومونوسپورآ سنتز مولکول‌هایی از جمله ویتامین B۱۲ است و اخیراً شواهدی دال بر ارتباط استفاده از آن به عنوان پروبیوتیک مشاهده شده است (۳، ۶)

موفقیت جداسازی میکرومونوسپورآها بستگی به بهره‌برداری از توانایی‌های برتر اسپور آنها به دلیل مقاومت در برابر تیمار با فنل ۱،۵٪، که به شدت باعث کاهش تعداد باکتری‌ها و استرپتومایسس‌ها در محیط کشت‌های جداسازی میکرومونوسپورآ می‌شود دارد (۱۶).

هم‌چنین از آنتی‌بیوتیک‌های سیکلوهگزامید، نیستاتین، نالیدیکسیک اسید و نووبیوسین در محیط کشت‌ها که باعث تسهیل بازیابی جنس‌های اکتینومیست‌ها می‌شود استفاده می‌شود.

از مهم‌ترین کاربردهای روش‌های ذکر شده مورد استفاده در این مطالعه حذف باکتری‌های غیر میکرومونوسپورآ مانند، سودوموناس، باسیلوس و دیگر باکتری‌های اسپوردار و بدون اسپور بود.

با وجود اهمیت زیاد اقتصادی گونه‌های میکرومونوسپورآ، آنها به‌طور کامل بررسی نشده‌اند .این امر احتمالاً به دلیل شکل میسیلیومی، کند رشد بودن و مشکلاتی که در کشت اکثر گونه‌ها وجود دارد است (۲۱).

لذا با توجه به اهمیت این باکتری‌ها در زمینه تولید انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، مطالعه حاضر با هدف جداسازی و تعیین هویت مولکولی ایزوله‌های محیطی میکرومونوسپورآ از مناطق مختلف ایران بر اساس آنالیز توالی ژن 16S rRNA تا سطح جنس و تعیین خاصیت ضد میکروبی ایزوله‌های جدا شده بر اساس غربال‌گری اولیه و ثانویه به ترتیب با روش‌های خطی و انتشار در آگار بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

۶۰ نمونه خاک مورد بررسی در این مطالعه در فاصله زمانی بین سال‌های ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۳، از مناطق مختلف استان خوزستان شامل شهرهای اهواز، دزفول، شوشتر، آبادان، ایذه و خارج استان شامل ایلام، شهرکرد، خرم‌آباد، تهران، بابل، ساری، گیلان از عمق ۲۰-۱۰ سانتی‌متری در ظرف استریل جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه اهواز منتقل شد. بعد از انتقال به آزمایشگاه، مشخصات هر نمونه خاک شامل منطقه جغرافیایی آن ثبت گردیده و در آزمایشگاه در تاریکی و دمای اتاق به مدت ۱ ماه قرار داده شد تا کاملاً خشک شدند و بعد وارد فرآیند زیر برای جداسازی شدند.

جداسازی و کشت دادن نمونه‌ها

---

[1] *Micromonospora*

[2] Aminoglycoside

یک گرم از خاک با ۱۰میلی لیتر آب مقطر استریل در یک لوله مخلوط گردید و سپس ۵. میلی‌لیتر از آن وارد یک لوله فالکون استریل حاوی ۴٫۵ میلی لیتر فسفات بافر ۵ میلی مولار دارای ۱٫۵٪ فنل شد.

سپس مخلوط خاک و فسفات بافر به مدت ۳۰دقیقه در آزمایشگاه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت(۹).

بعد از اتمام زمان مورد اشاره، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه بر روی محیط کشت‌های ISP2[3]، Humic acid agar، Gause`s No.1 که حاوی ترکیبات ضد میکروبی نالیدیکسیک اسید، نیستاتین، نوویوسین و سیکلوهگزامید با مقادیر ۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر بود تلقیح شد و در دمای ۳۰درجه سانتی‌گراد به مدت ۳هفته قرار داده شد (۵، ۲۶).

بعد از نمایان‌شدن کلنی‌ها، عمل رنگ‌آمیزی گرم صورت گرفت و در صورت مشاهده هایف‌های منشعب گرم مثبت، و تعیین تعلق آنها به اکتینومیست‌ها و احتمالاً میکرومونسپورآها، ایزوله‌ها به صورت تک‌کلون در در محیط TSB حاوی گلیسرول در دمای ۸۰- نگهداری شد.

تعیین هویت ایزوله‌ها

در مقایسه با روش‌های خسته کننده مرسوم، روش‌های مولکولی مناسبی برای شناسایی دقیق جنس و گونه این گروه از باکتری‌های ارزشمند طبیعت توسعه پیدا کرده است (۶).

به دلیل اینکه ممکن است از نمونه‌های خاک جنس‌های دیگری از اکتینومایست‌ها نیز جدا گردد لازم است با یک روش ساده ایزوله‌های متعلق به جنس میکرومونوسپورا را از بقیه جدا نمود، لذا بر اساس ژن 16S rRNA اختصاصی جنس در میکرومونوسپورآها، ایزوله‌های میکرومونوسپورآ از سایر جنس‌ها تفکیک شد.

استخراج DNA ایزوله‌های میکرومونسپورآ و PCR[4]:

جداسازی و تهیه DNA از ایزوله‌های مورد نظر بر اساس روش رایج جوشاندن کلنی‌ها به مدت ۱۵ دقیقه و سانتریفیوژ با دور بالا (۱۳۰۰۰ rpm) به مدت ۲-۱ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و استفاده از مایع روئی به‌دست‌آمده صورت پذیرفت (۱۶).

ژن 16S rRNA با استفاده از پرایمرهای مختص جنس (پرایمرهای یاد شده از شرکت سیناژن تهیه شدند) با نام‌های M558F 5-CGGCTTGTCGCGTCGACT-3 و C1028R 5-ATGCACCACCTGTAGCCGA-3 (۱۶) با استفاده از برنامه زیر طی ۳۰ چرخه تکثیر شد.

واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر:

PCR reagent	Volume µl	Final concentration
10X PCR buffer	5 µl	1X
$MgCl_2$ (50 mM)	1.5 µl	1.5 mM
dNTP mix (10 mM)	1 µl	0.2 mM
Each Primer (10 Mm)	1 µl	0.4 µM
Taq DNA polymerase	0.25 µl	0.04 unit
DNA template	5 µl	-
Distilled Water	36.25 µl	-

برنامه دمایی که برای تکثیر ژن 16S rRNA انجام شد به شکل زیر بود

جداسازی اولیه رشته‌های DNA در ۹۴°C به‌مدت ۲ دقیقه: (یک چرخه)، تکثیر ژن مورد اشاره با استفاده از شرایط جداسازی در ۹۴°C یک دقیقه، اتصال ۶۰°C یک دقیقه، گسترش C ۷۲° یک دقیقه: (۳۰ چرخه)، گسترش نهایی در حرارت ۷۲°C ده دقیقه: (یک چرخه).

سپس محصول pcr بر روی ژل آگارز ۱٪ و استفاده از اتیدیوم بروماید الکتوفورز شد.

بررسی خواص ضدمیکروبی ایزوله‌ها:

برای جداسازی میکرومونسپورآهای فعال از نظر تولید مواد آنتی‌باکتریال از روش‌های متفاوتی استفاده شد، مانند روش خطی[5] و انتشار در آگار[6]. که برای هردو روش از پاتوژ های استانداردی همچون سویه‌های استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین[7] ATCC 33591 ، باسیلوس سرئوس ATCC 1399 ، اشریشیاکلی PTCC 1533، کلبسیلا

---

[3] International Streptomyces Project

[4] Polymerase Chain Reaction

[5] Line method

[6] disc diffusion method

[7] Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

پنومونیه و باکتری‌های پاتوژن دیگر تهیه شده از آزمایشگاه‌های بیمارستان‌ها مانند شیگلا فلکسنری، پرتئوس ولگاریس وسودوموناس آئروژینوزا، استفاده شد.

ایزوله‌های جدا شده در محیط کشت تریپتیکاز سوی آگار در دمایC ° ۲۸ و به مدت ۱۲ روز کشت داده شد، سپس محیط کشت حاوی باکتری‌های رشد یافته به دو روش جهت استخراج مواد ضد میکروبی مورد آزمایش قرار گرفت.

۱. **روش خطی:** در روش خطی از محیط کشت خالص حاوی باکتری رشد یافته مستقیماً بر روی باکتری‌های هدف پاتوژن تأثیرگذاری گردید، به این صورت که ایزوله میکرومونوسپورآی انتخاب شده به صورت یک خط میانی روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد، سپس باکتری‌های پاتوژن استاندارد به صورت جانبی به سمت این خط میانی کشت داده شدند، و پلیت‌های کشت داده شده در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ -۷ روز انکوبه شدند. پس از این مدت در صورت فعال بودن میکرومونوسپوراَ برای تولید آنتی‌بیوتیک، خط رشد پاتوژن‌ها محدود شد که این حالت را میکرومونوسپورآ مثبت گویند (۱۵ ، ۱۷).

۲. **روش انتشار در آگار**: در این روش ایزوله میکرومونوسپورآ را به محیط کشت مایع تریپتیک سوی براث انتقال داده و در انکوباتور شیکر دار با دور rpm ۱۵۰ به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه انکوبه گردید. پس از ۷ روز محیط کشت را سانتریفوژ و مایع رویی جدا شد. سپس مایع رویی با حجم برابر با حلا لی نظیر اتیل استات، مخلوط گردید و با دور rpm ۲۵۰ به مدت۲ ساعت به شدت هم زده شد تا متابولیت یا همان آنتی‌بیوتک احتمالی وارد فاز حلال شوند، نهایتاً مایع رویی آن که حاوی عصاره باکتری و اتیل استات بود به‌وسیله قیف جدا کننده مجزا شد و بعد از قرار دادن در داخل پلیت شیشه‌ای و خشک‌شدن تحت تأثیر حررات ۴۰ درجه باقی‌مانده جهت خالص‌سازی با متانول حل شد (۲ ، ۱۵، ۱۷).

پس از عصاره‌گیری حلال‌های تغلیظ شده به کاغذهای ۶ میلی‌متری مخصوص، به نام دیسک انتقال و پس از تبخیر حلال و جذب محتویات آن به کاغذهای دیسک، این دیسک‌ها با پنس استریل روی باکتری‌های پاتوژن کشت داده شده در محیط جامدمولر هینتون آگار (M.H.A) قرار داده شدند، سپس پلیت‌ها به مدت ۳۶ ساعت در انکوباتور C° ۳۷ انکوبه شدند و خاصیت ضدمیکروبی برای هر ایزوله جدا شده پایش گردید. برای تعیین حساسیت دارویی برای هر ایزوله روش دیسک دیفیوژن ۳ بار تکرار شد. ایزوله‌هایی که حتی کمترین اندازه قطر هاله عدم رشد را داشتند با ارزش تلقی شده و برای مطالعات بعدی ذخیره شدند. برای گزارش فعالیت ضد میکروبی به صورت مقدماتی وجود هاله عدم رشد بر حسب mm اندازه گیری شد.

نتایج

الف. جداسازی باکتری بر اساس آزمونهای فنوتیپی و ژنوتیپی

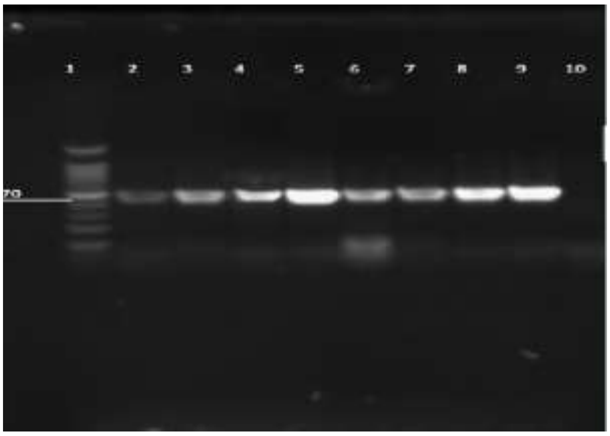
در این مطالعه کلیه نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده با استفاده از روش تیمار خاک با فنل ۱.۵ ٪ و محیط کشت‌های ذکر شده در این مطالعه کشت داده شد. (تصویر شماره۱)

از ۶۰ نمونه خاک مورد بررسی ۲۰۰ اکتینومیست بر اساس روش‌های استفاده شده در این مطالعه بر اساس ویژگی‌های فنوتیپیک و رنگ‌آمیزی گرم جدا شد.

شکل شماره۱ : کشت نمونه‌های خاک بر روی محیط کشت‌هایISP2، Humic acid agar، Gause`s No.1

تشخیص اولیه جنس میکرومونوسپورآ بر اساس روش‌های مولکولی

برای بررسی اولیه جنس میکرومونوسپورآ از 16S rRNA اختصاصی جنس و سویه استاندارد **Micromonospora chalcea IBRC-M10660** تهیه شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، استفاده گردید. نتایج نشان داد که از ۲۰۰ ایزوله مشکوک به میکرومونوسپورآ (۷,۵ ٪) ۱۵ ایزوله باند bp ۴۷۰ را تکثیر نمودند و به عنوان جنس میکرومونوسپورآ تأیید گردیدند (شکل شماره ۲).



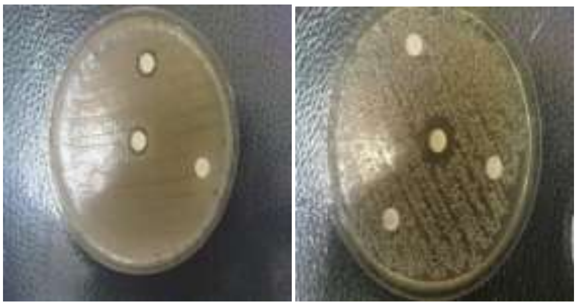
شکل شماره ۲: نتایج PCR ژن 16S rRNA در نمونه‌های میکرومونوسپورآ. شماره ۱ سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی، شماره‌های ۸-۲ نمونه‌ها شماره ۹ کنترل مثبت (Micromonospora chalcea IBRC-M10660)، شماره ۱۰ کنترل منفی (آب مقطر).

بررسی ایزوله‌هایی که به عنوان میکرومونوسپورآ با استفاده از تکثیر این ژن جدا شدند نشان داد که این ایزوله‌ها به صورت کلنی‌های نارنجی، پرتقالی تیره و سفید که بعداً سیاه رنگ می‌شدند در محیط کشت تریپتیکاز سوی آگار دیده شدند. (شکل شماره۳).

شکل شماره ۳: کلنی‌های میکرومونوسپورآ در محیط کشت تریپتیکاز سوی آگار

بررسی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های میکرومونوسپورآ

از مجموع ۱۵ ایزوله میکرومونوسپورآ جداشده ۵ ایزوله دارای اثرات ضد میکروبی روی سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین[8] ATCC 33591 ، باسیلوس سرئوس ATCC 1399 با قطر هاله عدم رشد به ترتیب ۱۸ و ۱۰ سانتی‌متر در روش انتشار در آگار بودند، هم‌چنین در روش خطی هاله عدم رشد در اطراف خط رشد میکرومونوسپورآ با اندازه زون کمتر از روش انتشار در آگار بر روی ۲ باکتری مذکور مشاهده گردید. و روی سایر باکتری‌های مورد آزمایش هیچ‌گونه اثری مشاهده نگردید (شکل شماره ۴).



شکل شماره۴: فعالیت ضد میکروبی عصاره خام استخراج شده از ایزوله‌های میکرومونوسپورآی جدا شده از خاک به صورت هاله ممانعت از رشد علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و باسیلوس سرئوس

بحث

تقاضا برای آنتی‌بیوتیک‌های جدید با توجه به ظهور سریع پاتوژن‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک که عامل عفونت‌های تهدیدکننده زندگی به حساب می‌آیند به رغم پیشرفت‌های قابل توجه در زمینه سنتز شیمیایی و مهندسی از ترکیبات ضد میکروبی هم‌چنان رو به افزایش است این تغییر الگوی بیماری و ظهور باکتری مقاوم به آنتی‌بیوتیک در حال حاضر به طور مداوم دانشمندان را برای جستجوی آنتی‌بیوتیک جدید ترغیب می‌کند. از هزاران متابولیت میکروبی شناخته شده حدود ۱۶۰ -۱۵۰۰ ترکیب (۰/۲ الی ۰/۳ درصد) عملاً به‌طور موفق به اثبات رسیده‌اند (۱۸).

جنس میکرومونوسپورآ یکی از اعضای اکتینومیست‌ها دارای رشد آهسته از ساکنان عادی خاک و محیط‌های آبی است، که برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها که از لحاظ اقتصادی مهم هستند را تولید می‌کند(۴).

به‌طور کلی اعضاء جنس میکرومونوسپورآ بر اساس مورفولوژی، ویژگی‌های بیوشیمیایی و فعالیت‌های آنزیمی به خوبی از همدیگر متمایز نمی‌شوند و حتی با سایر جنس‌های دیگر خانواده میکرومونسپورآسه‌آ نیز اشتباه می‌شوند. علاوه بر این شناسایی بر اساس روش‌های مرسوم مورد اشاره، نیازمند آزمایشگاه‌های مجهز بوده و باید وقت و هزینه گزافی صرف گردد (۶، ۱۶). در نتیجه در این مطالعه شناسایی و تمایز

---

[8] Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

ایزوله‌های جنس میکرومونوسپورآ از بقیه اکتینومیست‌ها مبتنی روش‌های مولکولی انجام شد.

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی نشان داد که ایزوله‌های جدا شده اثر مهاری بر رشد باکتری‌های گرم مثبت داشتند ولی بر باکتری‌های گرم منفی اثری نداشتند که این موضوع را می‌توان به تفاوت‌های مورفولوژیکی بین این میکروارگانیسم‌ها نسبت داد که باکتری‌های گرم منفی با داشتن یک غشای پلی ساکاریدی بیرونی حاوی اجزای لیپوپلی ساکارید ممکن است دیواره سلولی نفوذناپذیرتری نسبت به باکتری‌های گرم مثبت که تنها دارای یک لایه پپتیدوگلیکان خارجی هستند داشته باشند (۱۵).

در مطالعه مشابه مگاروی[9] و همکاران در سال ۲۰۰۴ بر اساس ترکیبی از پارامترهای فیزیولوژیک، ویژگی‌های کموتاکسونومیک و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک بر اساس ژن16S rRNA دو جنس جدید به نامهای سویه PNG1 و سویه UMM518 که درخانواده میکرومونوسپوراسه آ قرار گرفتند را جدا کردند که با تست فعالیت بیولوژیکی تخمیر محصولات این اکتینومیست‌ها چندین فعالیت بر علیه پاتوژن‌های گرم مثبت مقاوم به چند دارو، سلول‌های بدخیم و تکثیر ویروس واکسینا نشان دادند (۱۱).

پاندی[10] و همکاران در سال ۲۰۰۴ فعالیت ضد میکروبی اکتینومیست‌های جدا شده از خاک را در منطقه کابو[11] مورد مطالعه دادند که از مجموع ۱۰۶ اکتینومیست جدا شده دو نمونه در برابر باکتری‌های گرم منفی، ۸ نمونه در برابر باکتری‌های گرم مثبت و ۲۶ نمونه در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی فعال بودند (۱۵) که بررسی فعالیت ضد میکروبی تمام ایزوله‌های اکتینومیست جدا شده یکی از تفاوت‌های این مطالعه با مطالعه ما که فقط روی میکرومونوسپورآها بود است.

هم‌چنین از مقایسه داده‌های خاصیت ضد میکروبی با دو روش خطی و انتشار در آگار مشاهده شد که در روش خطی ایزوله‌ها ممانعت کمتری نسبت به رشد پاتوژنهای مورد بررسی نسبت به روش انتشار در آگار داشتند که می‌تواند ناشی از آزادسازی کم متابولیت ایزوله‌ها بر روی محیط کشت باشد، در حالی‌که در روش استخراج با اتیل استات متابولیت‌های باکتری جدا و مورد آزمایش قرار می‌گرفتند. در نتیجه می‌توان گفت روش انتشار در آگار روش بهتری برای تشخیص فعالیت ضدمیکروبی در ایزوله‌هایی که فعالیت مشخصی ندارند است.

در مطالعات قبلی، اغلب ایزوله‌های اکتینومیست از خاک‌های مناطق مختلف جدا شدند. که این مطالعه به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی میکرومونوسپورآهای بومی ایران، برای اولین بار صورت گرفت.

نتایج این مطالعه نشان داد که خاک مناطق مختلف ایران می‌تواند به عنوان منبعی از میکرومونوسپورآهای فعال که توانایی تولید متابولیت‌های ضد میکروبی دارند، مورد مطالعه دقیق‌تری قرار گیرد. چنانچه در این مطالعه متابولیت‌های استخراج شده از این ایزوله‌ها بر گونه‌های MRSA که یکی از معضلات جامعه پزشکی است اثر داشتند بنابراین می‌توان گفت با استخراج، خالص‌سازی و مطالعه دقیق‌تر متابولی‌های فعال میکرومونوسپورآهای ساکن در خاک مناطق مختلف کشورمان شاید بتوان آنتی‌بیوتیک‌های جدید و مناسب برای درمان بیماری‌های عفونی ناشی از میکروارگانیسم‌های مقاوم، را معرفی نمود.

---

[9] Magarvey
[10] Pandey
[11] Khumbu

منابع

1. Berdy J. Bioactive microbial metabolites. J Antibiot (Tokyo). 2005;58(1):1-26.
2. Carlson S, Marler L, Nam S-J, Santarsiero BD, Pezzuto JM, Murphy BT. Potential Chemopreventive Activity of a New Macrolide Antibiotic from a Marine-Derived Micromonospora sp. Mar drugs. 2013;11(4):1152-61.
3. Das S, Ward LR, Burke C. Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. Appl Microbiol Biotechnol. 2008; 81(3):419-29.
4. de Menezes AB, McDonald JE, Allison HE, McCarthy AJ. Importance of Micromonospora spp. as Colonizers of Cellulose in Freshwater Lakes as Demonstrated by Quantitative Reverse Transcriptase PCR of 16S rRNA. Appl Environ Microbiol. 2012;78(9):3495-9.
5. Hayakawa M, Nonomura H . Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. J Ferment Technol. 1987; 65 (5): 501–509.
6. Hirsch AM, Valdés M. Micromonospora: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. Soil Biol Biochem. 2010;42(4):536-42.
7. Igarashi Y, Trujillo ME, Martínez-Molina E, Yanase S, Miyanaga S, Obata T, Sakurai H, Saiki I, Fujita T, Furumai T. Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete Micromonospora lupini sp. nov. Bioorg Med Chem Lett. 2007; 17(13):3702-5.
8. Ismet A, Vikineswary S, Paramaswari S, Wong WH, Ward A, Seki T, Fiedler HP, Goodfellow M. Production and Chemical Characterization of Antifungal Metabolites From Micromonosporasp. M39 Isolated From Mangrove Rhizosphere Soil. World J Microbiol Biotechnol. 2004; 20(5): 523-528.
9. Kim KS, Pai HS, Lee SY, Ryu DD. Effect of intercalating dyes on the production of antibiotics by Micromonospora rosaria and Micromonospora purpurea. Enzyme Microb Technol. 1990;12(8):564-70.
10. Li X, Zhou X, Deng Z. Isolation and characterization of Micromonospora phage ΦHAU8 and development into a phasmid. Appl Environ Microbiol. 2004;70(7):3893-7.

11. 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. 2004;70(12):7520-9.

12. Maldonado LA, Fragoso-Yáñez D, Pérez-García A, Rosellón-Druker J, Quintana ET. Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. Antonie van Leeuwenhoek. 2009;95(2):111-20.

13. Merzaeva O, Shirokikh I. Colonization of plant rhizosphere by actinomycetes of different genera. Microbiology. 2006;75(2):226-30.

14. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years⊥. J Nat Prod 2007;70(3):461-77.

15. Pandey B, Ghimire P, Agrawal VP. Studies on the antibacterial activity of the actinomycetes isolated from the Khumbu region of Nepal. J Biol Sci. 2004;23:44-53.

16. Qiu D, Ruan J, Huang Y. Selective isolation and rapid identification of members of the genus Micromonospora. Appl Environ Microbiol. 2008;74(17):5593-7.

17. Saraswathi M, Mallikarjuna N. Antibacterial activity of actinomycetes against bacterial pathogens of diabetic foot ulcers. Journal of Applied and Natural Science. 2013;5(2):335-7.

18. Selvameenal L, Radhakrishnan M, Balagurunathan R. Antibiotic pigment from desert soil actinomycetes; biological activity, purification and chemical screening. Indian J Pharm Sci. 2009;71(5):499.

19. Shomura T, Nishizawa N, Iwata M, Yoshida J, Ito M, Amano S, Koyama M, Kojima M, Inouye S. Studies on a new nucleoside antibiotic, dapiramicin. I. Producing organism, assay method and fermentation. J Antibiot. 1983; 36(10):1300-4.

20. Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. Int J Syst Evol Microbiol. 1997;47(2):479-91.

21. Suarez JE, Hardisson C. Morphological characteristics of colony development in Micromonospora chalcea. J Bacteriol. 1985;162(3):1342-4.

22. Taechowisan T, Peberdy JF, Lumyong S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. World J Microbiol Biotechnol, , 2003; 19(4):381-85.

23. Thawai C, Tanasupawat S, Itoh T, Suwanborirux K, Suzuki K-i, Kudo T. Micromonospora eburnea sp. nov., isolated from a Thai peat swamp forest. Int J Syst Evol Microbiol. 2005;55(1):417-22.

24. Xie Q-y, Qu Z, Lin H-p, Li L, Hong K. Micromonospora haikouensis sp. nov., isolated from mangrove soil. Antonie van Leeuwenhoek. 2012;101(3):649-55.

25. Zenova G, Zvyagintsev D. Actinomycetes of the genus Micromonospora in meadow ecosystems. Microbiology. 2002;71(5):570-4.

26. *Zhang J, Zhang L*. Improvement of an Isolation Medium for Actinomycetes. Modern Applied Science. 2011; 5(2).

27. Zhao H, Kassama Y, Young M, Kell DB, Goodacre R. Differentiation of Micromonospora isolates from a coastal sediment in Wales on the basis of Fourier transform infrared spectroscopy, 16S rRNA sequence analysis, and the amplified fragment length polymorphism technique. Appl Environ Microbiol.2004;70(11):6619-27.