JAMS
Journal of Arak University of Medical Sciences
2019; 21(7)
Journal Homepage: http://jams.arakmu.ac.ir

ORIGINAL RESEARCH

Isolation and Identification Rare Actinobacteria from Persian Gulf and Oman Sea

Behnoosh Sadat Khalili [1], Javad Hamedi [2, 3*], Setareh Haghighat[1]

1. Department of Microbiology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Department of Microbial Biotechnology, School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran.

3. Microbial Technology and Products Research Center, University of Tehran, Tehran, Iran.

ARTICLE INFORMATION

Article history

Received: *12 May 2018*

Accepted: *24 October 2018*

Published online: *04 February 2019*

Keywords

Actinobacteria

Antibiotic resistance

Pseudomonas aeruginosa

*** Corresponding Author:**

Javad Hamedi; P.O. Box 14155-6455, Department of Microbial Biotechnology, School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran.

Fax: *+98 21 6641 5081*

Email: *jhamedi@ut.ac.ir*

ABSTRACT

Background and Aim: The widespread use of antibiotics has been led to increased emergence of antibiotic resistant bacteria and high mortality and morbidity rates due to infectious diseases. *Pseudomonas* aeruginosa is one of the most important causes of nosocomial infections, which shows high resistance to a wide range of antibiotics. So, finding new and effective antimicrobial compounds in order to overcome antibiotic resistant infectious diseases is so critical. Screening of native actinobacteria can be an effective strategy to find novel antimicrobial compounds. The aim of current study was isolation, screening and identification of rare actinobacteria to find the strains which produce antimicrobial compounds against *P. aeruginosa*.

Material and Methods: Thirty samples of water and sediments were collected from Persian Gulf and Oman Sea and used for isolation of actinobacterial strains. After isolation of actinobacteria, their metabolites were extracted and their anti-*P. aeruginosa* activities were investigated. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the most efficient extract was determined using broth microdilution method. Finally, the most efficient strain was identified.

Ethical Considerations: In this study, all principles of biosafety and bioethics have been considered.

Findngs: Fifty actinobacteria were isolated from water and sediments. Five isolates had considerable antimicrobial activity. MIC value of the most efficient extract against *P. aeruginosa* was 100 µg/ml. Molecular analysis of 16SrRNA showed that the most effective fermentation broth extract belongs to *Micromonospora* and has 99.8% similarity to *M. chalcea*.

Conclusion: The current study revealed that the water of southern Iran and their sediments are promising sources of potent rare Actinobacteria in the production of antimicrobial compounds against *P. aeruginosa*.

© Copyright (2019) Arak University of Medical Sciences

Use your device to scan and read this article online:

Khalili BS., Hamedi J., Haghighat S. Isolation and Identification Rare Actinobacteria from Persian Gulf and Oman Sea. J Arak Uni Med Sci. 2019; 21(7): 28-38.

This open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution NonCommercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).

www.SID.ir

JAMS

مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک

دوره بیست و یک، شماره هفت، بهمن و اسفند ۱۳۹۷

journal homepage: http://jams.arakmu.ac.ir

مقاله پژوهشی

جداسازی و شناسایی اکتینوباکترهای کمیاب از آب‌های خلیج فارس و دریای عمان

بهنوش سادات خلیلی[۱]، جواد حامدی[۲،۳*]، ستاره حقیقت[۱]

۱.گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فن‌آوری‌های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه زیست فن‌آوری میکروبی، دانشکده زیست شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۳. مرکز پژوهشی فن‌آوری‌ها و فرآورده‌های میکروبی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۲/۲۲

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۸/۰۲

تاریخ انتشار: ۹۷/۱۱/۱۵

واژگان کلیدی

اکتینوباکترها

مقاومت آنتی بیوتیکی

Pseudomonas aeruginosa

***نویسنده مسئول:**

جواد حامدی

آدرس پستی: ایران، تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، بخش زیست فن‌آوری میکروبی، صندوق پستی ۶۴۵۵-۱۴۱۵۵.

نمابر: +98 21 6641 5081

Email: jhamedi@ut.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: استفاده گسترده از آنتی بیوتیک‌ها منجر به افزایش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و نرخ بالای مرگ‌ومیر در اثر بیماری‌های عفونی شده است. *Pseudomonas aeruginosa* یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی است که به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک‌ها مقاوم است. بنابراین یافتن منبع جدید ترکیبات ضدمیکروبی برای غلبه بر بیماری‌های عفونی مقاوم به آنتی بیوتیک کاملاً حیاتی است. غربال‌گری اکتینوباکترهای بومی راهکاری موثر به منظور یافتن ترکیبات ضدمیکروبی جدید است. هدف پژوهش حاضر جداسازی، غربالگری و شناسایی اکتینوباکترهای نادر و بومی ایران به منظور یافتن سویه‌های اکتینوباکتر مولد ترکیبات ضدمیکروبی علیه *P. aeruginosa* است.

مواد و روش‌ها: ۳۰ نمونه آب و رسوب از خلیج‌فارس و دریای‌عمان جمع‌آوری و برای جداسازی اکتینوباکترها در محیط مناسب کشت شد. جدایه‌های اکتینوباکتر تخلیص شدند و پس از استخراج متابولیت‌ها، فعالیت آن‌ها بر علیه *P. aeruginosa* بررسی شد. حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) عصاره برتر با روش میکرودایلوشن براث تعیین و در نهایت سویه برتر شناسایی شد.

ملاحظات اخلاقی: در مطالعه حاضر، تمامی اصول ایمنی زیستی و اخلاق زیستی رعایت شده است.

یافته‌ها: ۵۰ اکتینوباکتر از رسوبات مورد بررسی جداسازی شدند. نتایج نشان داد که ۵ جدایه دارای فعالیت ضدمیکروبی قابل‌توجهی هستند. MIC عصاره برتر علیه *P. aeruginosa*، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. آنالیز مولکولی ژن ۱۶SrRNA نشان داد که جدایه دارای موثرترین عصاره متعلق به جنس *Micromonospora* بوده و ۹۹/۸ درصد شباهت به *M. chalcea* دارد.

نتیجه‌گیری: این پژوهش نشان داد که آب‌های جنوب ایران و رسوبات موجود در آن‌ها منابع نویدبخشی از اکتینوباکترهای نادر توانمند در تولید ترکیبات میکروبی علیه *P. aeruginosa* می‌باشند.

تمامی حقوق انتشار این اثر، متعلق به دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد.

www.SID.ir

۱. مقدمه

آنتی بیوتیک‌ها اثرات دوگانه ای داشته و از یک سو از رشد باکتری‌های حساس ممانعت کرده و یا آن‌ها را می‌کشند و از سوی دیگر سبب انتخاب و بقای گونه‌های جهش یافته جدید دارای مکانیسم‌های مقاومتی می‌شوند. در طول سال‌ها، استفاده گسترده از آنتی بیوتیک‌ها منجر به افزایش باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها شده است که اثرات منفی بر درمان عفونت‌های باکتریایی دارد (۱).

مقاومت چند دارویی سویه‌های بالینی به تدریج در بسیاری از کشورها در حال افزایش است. در سال ۲۰۱۷ سازمان جهانی بهداشت، اسامی دوازده خانواده میکروبی مقاوم به آنتی بیوتیک‌های رایج را اعلام کرد که درمان موثر عفونت‌های ایجاد شده توسط آن‌ها تنها با کشف آنتی بیوتیک‌های جدید ممکن خواهد بود. در این فهرست *Pseudomonas aeruginosa* رتبه دوم را پس از *Acinetobacter baumannii* کسب کرده است (۲).

Pseudomonas یکی از جنس‌های بزرگ باکتری‌ها است و صدها گونه از آن شناخته شده است. جنس. *Pseudomonas aeruginosa* باکتری بیماری‌زای فرصت‌طلب بیمارستانی است که سبب عفونت‌های مجاری ادراری، سیستم تنفسی، التهاب و آماس پوست، عفونت‌های بافت‌های نرم، باکتریمی، عفونت‌های استخوان و مفاصل، عفونت‌های معده و روده‌ای و عفونت‌های منتشر گوناگون به ویژه در بیماران با سوختگی‌های شدید و بیماران دچار سرطان و ایدز که سیستم ایمنی آن‌ها سرکوب شده است، می‌شود (۳). در این بین کراتیت سودوموناسی نیز یک عفونت چشمی خطرناک بوده و در صورت عدم درمان سریع منجر به ناتوانی شدید در دید و زخم قرنیه می‌شود (۴).

استفاده بی‌رویه یا نابجای آنتی‌بیوتیک‌های ضد *Pseudomonas* مانند سفتازیدیم، پیپراسیلین-تازوباکتام، ایمی پنم، مروپنم، آمیکاسین و سیپروفلوکساسین منجر به ایجاد سویه‌های با مقاومت چند دارویی شده است (۵). مقاومت آنتی بیوتیکی *Pseudomonas* به عوامل مختلفی مانند نفوذپذیری غشای خارجی، حضور بتالاکتاماز AmpC، بتالاکتاماز کروموزومی و فعالیت ناشی از سیستم‌های افلاکس چند دارویی وابسته است (۶). به این ترتیب تلاش برای غربال‌گری، کشف و ارایه آنتی بیوتیک جدید و موثر برای درمان بیماری‌های ناشی از این باکتری در حال انجام است.

اکتینومیست‌ها طی سالیان متمادی مهم‌ترین منبع برای تولید آنتی بیوتیک‌ها بوده‌اند. این باکتری‌ها گروه بزرگی از پروکاریوت‌ها هستند و به صورت گسترده در محیط‌های مختلف از جمله خاک، مواد آلی و هم‌چنین اکوسیستم‌های دریایی وجود دارند که به صورت ساپروفیت زندگی می‌کنند. این گروه از باکتری‌های گرم مثبت به خاطر توانایی در تولید مواد فعال زیستی متنوع به صورت اقتصادی مورد توجه قرار گرفته‌اند. اکتینومیست‌ها توانایی سنتز متابولیت‌های ثانویه‌ی مختلفی مانند ترکیبات ضدباکتریایی، ترکیبات ضدقارچی، علف‌کش‌ها، آفت‌کش‌ها و آنزیم‌هایی مانند کیتیناز، سلولاز، گلوکوناز و زایلاناز را دارا می‌باشند (۷).

از میان متابولیت‌های میکروبی که تاکنون شناخته شده است ۸۵ درصد (حدود ۱۰ هزار ترکیب) از راسته اکتینومایستال‌ها جداسازی گردیده است. از این میان، سهم استرپتومایسس‌ها ۷۵ درصد و سهم بقیه اکتینومایست‌های نادر ۲۵ درصد بوده است (۸). از جمله آنتی بیوتیک‌های مهم جدا شده از استرپتومایسس‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: استرپتومیسین و اسپکتینومایسین از *Streptomyces griseus*، تتراسایکلین از *Streptomyces auerofaciens*، کلروتتراسیکلین و اریترومایسین از گونه‌های *Kitasatospora auereofaciens* و *Saccharopolyspora erythraea* و نیز نیستاتین و آمفوتریسین B از *Streptomyces noursei* و *Streptomyces nodosus* جدا شده است (۹).

در میان انواع تولیدات جدید مشتق شده از اکتینومیست‌های دریایی، ترکیبات فعال زیستی ضدسرطان و ضدباکتری بیشتر بوده است. برای مثال Butastyn، Gutinjimycin، Himalomycin و Lajolamucin ترکیبات تولید شده توسط

Archive of SID
www.SID.ir

گونه‌های *Streptomyces* دریایی با فعالیت ضدباکتری و Kaprolacton، Chinikomycin و Salinosporamide از جمله ترکیبات ضدسرطان تولید شده توسط اکتینومیست‌های دریایی است (۱۰).

به طور کلی اکتینوباکترها تقریبا ۱۷ درصد از مجموع کلنی باکتری‌های دریایی را تشکیل می‌دهند و می‌توان آن‌ها را به راحتی از رسوبات دریایی جداسازی نمود. بسیاری از اکتینوباکترهای جداسازی شده از اقیانوس‌های عمیقی حاوی مسیرهای سنتز پلی کتاید سنتاز غیر ریبوزومی هستند. حضور این آنزیم‌ها نشانه ای از تولید متابولیت ثانویه می‌باشد (۱۱).

با توجه به اهمیت مقاومت آنتی بیوتیکی *Pseudomonas aeruginosa* و به جهت توانمندی اکتینوباکترهای دریایی، این پژوهش با هدف جداسازی و شناسایی اکتینوباکتر کمیاب جدا شده از خلیج فارس و دریای عمان و و ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها انجام گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر، مطالعه ای کاربردی با هدف یافتن و شناسایی اکتینوباکترهای بومی مولد ترکیبات ضدمیکروبی علیه *Pseudomonas aeruginosa* از آب‌های خلیج فارس و دریای عمان بوده است. نمونه آب‌های جمع آوری شده متغیر مستقل و اکتینوباکتر جدا و غربال شده و فعالیت ضد میکروبی آن‌ها متغیر وابسته هستند. به منظور شناسایی جدایه‌های اکتینوباکتریایی و بررسی فعالیت‌های ضدمیکروبی آن‌ها از آزمون‌های کمی و کیفی که در ادامه به آن پرداخته می‌شود، استفاده شده است.

نمونه‌برداری

تعداد ۳۰ نمونه رسوب و آب از عمق حدود ۱۰ متری از دریای عمان و خلیج فارس جمع‌آوری شد و در ظروف استریل و در دمای حدود ۴ درجه سانتی‌گراد در کوتاه‌ترین زمان (۲۴ تا ۴۸ ساعت) به آزمایشگاه منتقل شد. سپس نمونه‌ها جهت حذف اشکال رویشی اکتینوباکترها و سایر باکتری‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (۱۲).

جداسازی اکتینوباکترها

برای جداسازی اکتینوباکترهای نادر از تیمارهای مختلف استفاده شد. نمونه رسوبات با روش رقیق سازی متوالی رقیق شدند. برای جداسازی اکتینوباکترها، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های 10^{-1} و 10^{-2} در محیط کشت اختصاصی ISP2 (International *Streptomyces* Project) مالت (۱۰ گرم)(ایبرسکو، ایران)، عصاره مخمر (۴ گرم) (مرک، آلمان)، گلوگز (۴ گرم) (مرک، آلمان)، کلسیم کربنات (۲ گرم) (مرک، آلمان)، آگار (۱۵ گرم) (مرک، آلمان)، در یک لیتر آب دوبار تقطیر) در pH ۷/۲±۲ کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور گرماگذاری شدند. اکتینوباکترها دارای کلنی‌هایی با ظاهری پودری و خشک هستند و به این ترتیب کلنی‌های مذکور در سطح آگار جداسازی شدند. شناسایی اولیه بر اساس مشخصات مورفولوژی کلنی، اندازه کلنی، تولید اسپور و نیز مشخصات میکروسکوپی مسیلیوم هوایی، وضعیت اسپور و شکل انشعابات اسپور انجام شد. سپس جدایه‌های خالص شده در محیط نگهداری (گلیسرول (مجللی، ایران) (۲۰٪) + ISP_2) در دمای ۷۰- درجه سلسیوس در کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران (University of Tehran Microorganism Collection-UTMC) برای مراحل بعدی نگهداری شدند.

آماده سازی محیط کشت تولید اسپور باکتری

برای فعال‌سازی، جدایه‌ها بر روی محیط ISP_2 آگار کشت داده و به مدت ۷ تا ۱۰ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند.

کشت اکتینوباکترها در محیط پیش کشت

برای تهیه محیط پیش کشت ۸ میلی‌لیتر از محیط ISP2 مایع در فلاسک‌های ۱۰۰ میلی‌لیتر ریخته شد و دیسک‌هایی به قطر ۱ سانتی‌متر از محیط کشت جامد دارای کشت جدایه‌های موردنظر به محیط پیش کشت تهیه شده تلقیح گردید و در دمای ۲۸±۲ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور با ۲۲۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شد.

Archive of SID
www.SID.ir

استخراج عصاره مایع تخمیر جدایه‌های اکتینوباکتر

میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط پیش کشت به ۲۰ میلی‌لیتر محیط تخمیر (ISP2 مایع) در فلاسک ۱۰۰ میلی‌لیتر اضافه شد. فلاسک‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۷ روز در شیکر گرماگذاری شدند. پس از اتمام دوره گرماگذاری زیست توده جدایه‌های مورد بررسی با سانتریفوژ در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه جداسازی شد و سوپرناتانت به دست آمد.

بررسی فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌ها

فعالیت ضدمیکروبی عصاره مایع تخمیر استخراج شده از جدایه‌ها، به روش انتشار در آگار، با استفاده از *Pseudomonas aeruginosa* (UTMC 1404) دریافت شده ازکلکسیون میکروبی دانشگاه تهران مورد بررسی قرار گرفت. سوسپانسیون با غلظت $۱/۵\times۱۰^{۷}$ از *Pseudomonas aeroginosa* تهیه شد. کشت چمنی از سوسپانسیون مذکور در پلیت مولر هینتون آگار تهیه شد. در ادامه مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی کشت جدایه‌های مورد بررسی به چاهک‌هایی دارای قطر ۶ میلی‌متر در محیط کشت مولر هینتون آگار ریخته شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. تمامی آزمایش ها سه مرتبه تکرار شدند.

تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) *Pseudomonas aeruginosa* توسط عصاره مایع تخمیر سویه برتر

MIC عصاره مایع تخمیر سویه برتر با استفاده از روش براث میکرودایلوشن ارزیابی شد. به این منظور از پلیت ۹۶ خانه استریل استفاده شد و با ایجاد رقت متوالی از عصاره مورد بررسی سریال رقت در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه تهیه شد (۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک). در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مولر هینتون براث و ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظت $۱۰^{۶}$ ml/CFU در هر چاهک اضافه گشت. یک چاهک بدون عصاره و یک چاهک بدون باکتری به عنوان کنترل مثبت و منفی رشد در نظر گرفته شد. سپس پلیت موردنظر به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. در نهایت پس از سپری شدن زمان گرماگذاری جذب چاهک‌ها در دستگاه خوانش میکروپلیت در طول موج ۶۱۰ نانومتر خوانده شد. چاهک دارای کمترین غلظت از عصاره مورد بررسی که رشد را مهار کرده بود به عنوان حداقل غلظت مهارکننده رشد باکتری (MIC) در نظر گرفته شد.

شناسایی اکتینوباکتر برتر

شناسایی اکتینوباکترهای جداشده با روش‌های مختلف از جمله شناسایی مورفولوژی (رنگ آمیزی گرم)، تاکسونومی شیمیایی (تعیین نوع ایزومر دی آمینوپایمیلیک اسید) و آنالیز مولکولی (تعیین ترادف ژن 16S rRNA) انجام شد.

تعیین نوع ایزومر دی آمینوپایمیلیک اسید

جهت تعیین نوع ایزومر مزو و ال آمینواسید دی پایمیلیک اسید (تست Diaminopimelic acid-DAP) زی‌توده جدایه‌های مورد بررسی کشت داده شده در محیط ISP2 به‌وسیله سانتریفوژ جدا شد. زی‌توده به‌دست آمده در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. در ادامه ۲۰ میلی‌گرم از زی‌توده خشک شده با هاون کوبیده شد و در لوله‌های درپیچ‌دار ریخته شد و با هیدروکلریک اسید ۶ مولار (مرک-آلمان) در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس تجزیه شد. سپس نمونه‌های هیدرولیز شده در آب حل شد. سپس ۱ میکرولیتر از محلول به‌دست آمده با استفاده از لوله مویین بر روی کاغذ واتمن شماره ۱ قرار داده شد. جداسازی به کمک سیستم حلال آب مقطر-هیدروکلریک اسید (مرک-آلمان) پیریدین (مرک-آلمان)-متانول (مرک-آلمان) با نسبت حجمی (۸۰:۲۶:۴:۱۰) انجام شد. پس از گذشت تقریبا ۵ ساعت کاغذ از تانک برداشته و خشک شد. کاغذ با محلول ۰/۱درصد نین هیدرین (مرک، آلمان) در استون اسپری و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار داده شد تا لکه‌ها ظاهر شوند. برای انجام سایر مراحل سویه‌های مزو انتخاب گردید.

شناسایی مولکولی و تعیین ترادف ژن 16S rRNA

برای شناسایی مولکولی سویه موردنظر DNA آن استخراج شد. به این منظور، سویه مورد بررسی در فلاسک ۱۰۰ میلی‌لیتر حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط BHI (Brain Heart Infusion)

Archive of SID

www.SID.ir

(مرک، آلمان) با pH ۷ ± ۰/۲ تلقیح و به مدت ۴۸ الی ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه گرماگذاری گردید. پس از حصول اطمینان از رشد کافی میسلیوم باکتری و نداشتن هر گونه آلودگی، زی‌توده آماده شد (۱۳). مراحل بعدی استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت پویاژن آزما، ایران) مطابق با دستورالعمل سازنده انجام شد. کمیت DNA استخراج شده نمونه‌ها توسط دستگاه نانودراپ (2000C Thermo) با نسبت جذبی $OD_{۲۶۰/۲۸۰}$ تعیین شد. سپس الکتروفورز با ژل آگارز ۰/۸ درصد (سیناژن، ایران) به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد و در دستگاه ژل داک، باندها دیده شد. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction-PCR) در این پژوهش از دو پرایمر عمومی با نام‌های F9 و R1541 (ژن فناوران، ایران) برای تکثیر ژن ۱۶SrRNA استفاده شد. از این پرایمرها به منظور تکثیر ژن ۱۶SrRNA با طول ۱۵۰۰ نوکلئوتید استفاده شد (Kumar, Tamura et al. 2004). توالی پرایمرهای استفاده شده دراین پژوهش و دمای اتصال آن‌ها به ترتیب زیر است:

9F: 5'- AAG AGT TTG ATC ATG GCT CAG -3' (Tm:60)

1541R: 5'- AGG AGG TGA TCC ACC CGC A -3' (Tm:60)

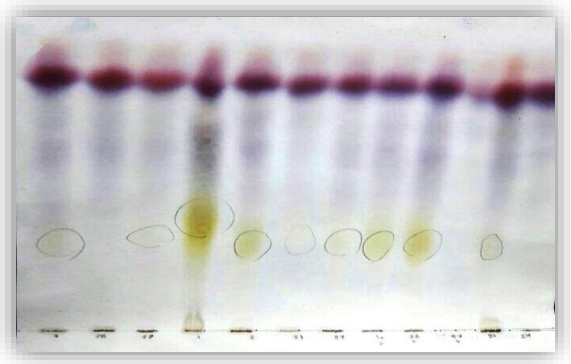
در نهایت محصول PCR به‌دست آمده پس از الکتروفورز و مشاهده بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد برای یافتن تعیین توالی ژن موردنظر، به شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال شد.

۳. ملاحظات اخلاقی

در مطالعه حاضر، تمامی اصول ایمنی زیستی و اخلاق زیستی رعایت شده است.

۴. یافته‌ها

در این پژوهش تعداد ۵۰ جدایه با مورفولوژی متفاوت به دست آمد که دارای ایزومر مزو در آزمون DAP بودند و بنابراین به عنوان اکتینوباکتر نادر در نظر گرفته شدند. بر روی کاغذهای کروماتوگرافی لایه نازک (Thin Layer Chromatography-TLC)، اسید آمینه‌های موجود (به جز دی آمینوپایمیلیک اسید) در محلول هیدرولیزشده به رنگ بنفش (ارغوانی) دیده می‌شوند که جلوتر از لکه‌های DAP حرکت کرده‌اند. این در حالی است که مولکول‌های DAP (لکه‌های با رنگ سبز مایل به خاکستری) به دلیل قطبیت زیاد، R_f پایینی داشته‌اند. ایزومر فرم *L* R_f کمتری نسبت به ایزومر *meso* داشته است (شکل ۱).



شکل ۱. پلیت TLC برای آنالیز نوع ایزومر دی آمینوپایمیلیک اسید در بین جدایه‌های اکتینوباکتر. لکه‌های بنفش (ارغوانی): اسید آمینه‌های موجود (به جز دی آمینوپایمیلیک اسید)، لکه‌های سبز زیتونی: مولکول‌های DAP. ایزومر L R_f کمتری نسبت به ایزومر meso داشته است.

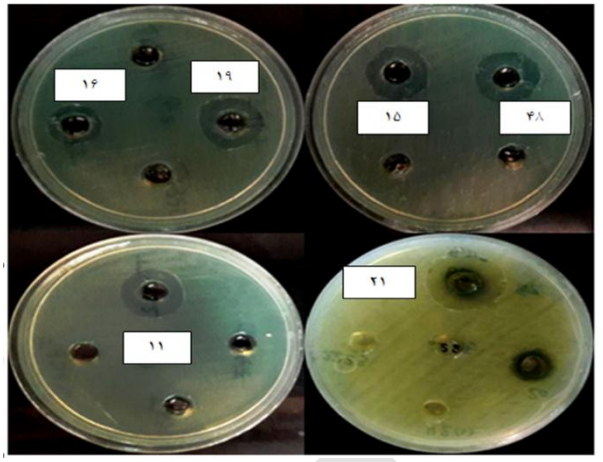
ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌ها

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی اکتینوباکترهای جداشده علیه *Pseudomonas aeruginosa* به روش انتشار در آگار نشان داد که از ۵۰ سویه انتخابی، ۶ سویه دارای خاصیت ضدمیکروبی بودند (جدول ۱، شکل ۲). در این میان جدایه ۲۱ با قطر هاله ۲۳ میلی‌متری بیشترین فعالیت را داشته است. این جدایه در کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران با شماره UTMC 1357 ذخیره شده است.

جدول ۱. نتایج مربوط به فعالیت ضدمیکروبی اکتینوباکترها به همراه قطر هاله عدم رشد

نام سویه	قطر هاله (میلی‌لیتر)
۱۱	۱۶ میلی‌لیتر
۱۶	۱۵ میلی‌لیتر
۲۱	۲۳ میلی‌لیتر
۱۵	۱۷ میلی‌لیتر
۱۹	۱۹ میلی‌لیتر
۴۸	۱۷ میلی‌لیتر

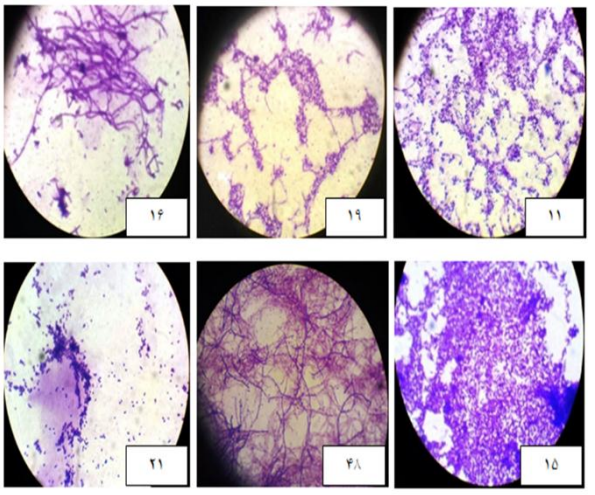
Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲. فعالیت ضدمیکروبی اکتینوباکترهای موثر بر *Pseudomonas aeruginosa* روی محیط NA.

مورفولوژی اکتینوباکترهای دارای فعالیت زیستی

شکل ۳ مورفولوژی میکروسکوپی اکتینوباکترهای دارای فعالیت ضدمیکروبی را با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم نشان می‌دهد.



شکل ۳. مورفولوژی میکروسکوپی سویه‌های اکتینوباکتر دارای فعالیت زیستی، بزرگنمایی ×۱۰۰۰.

حداقل غلظت مهارکننده رشد عصاره مایع تخمیر سویه برتر

نتایج آزمون براث میکرودایلوشن نشان داد که عصاره سویه برتر می‌تواند در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر رشد *Pseudomonas aeruginosa* را مهار نماید.

ویژگی های سویه منتخب

جدایه UTMC 1357 دارای کلنی خیلی ریز، برآمده و قهوه‌ای بود که در مشاهدات میکروسکوپی به صورت باکتری‌های میله-ای بلند، دارای اسپور مشکی و گرم‌مثبت دیده شده است. نتایج آنالیز DAP جدایه ۲۱ نشان می‌دهد ایزومر DAP در دیواره سلولی این جدایه *meso* بوده است. غلظت DNA استخراج شده با استفاده از کیت مذکور معادل ۱/۵نانوگرم در میلی‌لیتر بود. نتیجه تعیین توالی ژن 16S rRNA این اکتینوباکتر منتخب و بررسی توالی‌ها در سامانه EZtaxon، نشان می‌دهد که سویه متعلق به جنس *Micromonospora* بوده و ۹۹/۸ درصد به *Micromonospora chalcea* شباهت دارد.

۵. بحث

Pseudomonas aeruginosa یکی از مقاوم‌ترین باکتری‌های فرصت‌طلب به انواع آنتی بیوتیک است و به طور شاخص به فلوروکینولون‌ها مقاومت نشان می‌دهد (۱۴).

لیستر و همکاران در سال ۲۰۰۹ بیان کردند *Pseudomonas aeruginosa* به سرعت در حال توسعه مقاومت خود به چندین گروه آنتی بیوتیک از جمله آنتی بیوتیک‌های آب‌دوست، مانند بتالاکتام ها، آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین‌ها و برخی از فلوروکینولون‌ها است (۱۵). خسروی و همکاران در سال ۱۳۸۶ نشان دادند که سویه‌های *Pseudomonas aeruginosa* جدا شده از بیماران سوختگی در بیمارستان طالقانی اهواز مقاومت بالایی به سفتازیدیم (۷۱ درصد)، ایمی پنم (۱۴ درصد) و سیپروفلوکساسین (۶۷ درصد) دارند (۱۶). بنابراین با توجه به ضرورت بالای درمان عفونت‌های مرتبط با *Pseudomonas aeruginosa* مطالعه حاضر با هدف کشف ماده ضدمیکروبی علیه سویه *Pseudomonas aeruginosa* انجام شد. در پژوهشی مشابه، محسنی و همکاران در سال ۱۳۹۳ به بررسی اکتینومیست‌های تولیدکننده آنتی بیوتیک در دریای خزر پرداختند که ۴۴ گونه از رسوبات دریای خزر جدا شد که نویدبخش‌ترین سویه‌های آن از لحاظ فعالیت ضدمیکروبی شامل MN38 در برابر *Staphylococcus aureus* ، *Bacillus subtilis* و *E.coli*، N39 در برابر *E.coli*، *Bacillus subtilis* و *Klebsiella nvmvnya* و فعالیت N3 علیه *Pseudomonas aeruginosa* می‌شود.

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج حاصل از این تحقیقات نشان داد که اکتینومیسست رسوبات دریایی منابع سرشار از اکتینوباکترهای مولد آنتی بیوتیک هستند (۱۷). در مقایسه با مطالعات پیشین، در مطالعه حاضر *Micromonospora* sp. UTMC 1357 سویه برتر جداسازی شده از رسوبات خلیج فارس دارای فعالیت قابل‌ملاحظه‌ای علیه باکتری گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa* بود. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۸، سه ترکیب Phocoenamicins B، Phocoenamicins C و spirotetronate phocoenamicin از کشت *Micromonospora* sp. جداسازی شدند. عصاره استونی از یک کشت این سویه که از رسوبات دریایی در جزایر Canary جدا شده بود، فعالیت علیه Staphylococcus aureus مقاوم به متی سیلین، *Mycobacterium tuberculosis H37Ra* و *Mycobacterium bovis* را نشان داد. تخلیص عصاره مذکور منجر به جداسازی و شناسایی ترکیبات جدید Phocoenamicins B و Phocoenamicins C که متعلق به کلاس spirotetronate از پلی کتیدها است، شد. فعالیت ضدمیکروبی ترکیبات خالص شده علیه پاتوژن‌های مذکور نشان‌دهنده MIC، ۴ تا ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای *Staphylococcus aureus* مقاوم به متی سیلین و ۱۶ تا ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra با هیچ فعالیت قابل توجهی علیه *Mycobacterium bovis* بود. این مطالعه نشان‌دهنده توانایی بالایی باکتری‌های متعلق به جنس *Micromonospora* جدا شده از اکوسیستم‌های دریایی در تولید ترکیبات ضدمیکروبی است (۱۸).

این ترکیبات آنتی بیوتیکی موثر را نیز گونه‌های مختلف *Micromonospora* به ویژه گونه *chalcea* *Micromonospora* تولید می‌کنند. در نتیجه، سویه *chalcea* *Micromonospora* می‌تواند به عنوان سویه دارای توانمندی تولید انواع متابولیت‌های ضدمیکروبی معرفی شود. مطالعات قبلی جداسازی و شناسایی آنتی بیوتیک‌های متنوعی از خانواده‌های آنتی بیوتیکی مختلف از جمله پپتیدها، لیپوپپتیدها، آنتراسایکلین‌ها، پلی ان‌ها، لاکتون‌ها، آمینوگلیکوزیدها، ماکرولیدها، الیگوساکاریدها، ماکرولیدها را از باکتری‌های متعلق به جنس *Micromonospora* گزارش کرده‌اند (۲۰،۱۹).

عبدالمحسن و همکاران در سال ۲۰۱۰ طی مطالعه‌ای، ۹۰ اکتینومیست از ۱۱ گونه مختلف از اسفنج دریایی که از ساحل راس محمد (مصر) و از روویني (کرواسی) جمع آوری شده بود جدا کردند. فعالیت‌های ضدمیکروبی این جدایه‌ها علیه *Enterococcus faecalis*، *S. aureus*، *E. coli*، *P. aeruginosa*، *Candida albicans* انگل لیشمانیا (*Trypanosoma brucei*) مورد بررسی قرار گرفت. از این میان، ۱۰ جدایه اکتینومیستی فعالیت ضدمیکروبی قابل‌توجهی علیه عوامل بیماری‌زای مذکور نشان دادند. این نتایج تاییدکننده تنوع و توانایی بالای اکتینومیست مرتبط با اسفنج‌های دریایی در تولید عوامل ضدمیکروبی می‌باشد (۲۱).

والی و همکاران در سال ۲۰۱۲ بیست و یک سویه اکتینومیستی از نمونه‌های سواحل دریا در هند جدا کردند و غربال‌گری اولیه فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌ها بر دو باکتری گرم مثبت و هشت باکتری‌های گرم منفی انجام شد. با توجه به نتایج غربال‌گری اولیه دو جدایه نویدبخش C11 و C12 برای مطالعات فراتر انتخاب شدند و ترکیبات ضدمیکروبی آن‌ها مورد استخراج قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که این دو سویه فعالیت گسترده ضدباکتریایی داشتند و در نهایت نتایج شناسایی مولکولی مشخص کرد که این دو جدایه متعلق به جنس *Streptomyces* هستند (۲۲).

MIC عصاره برتر (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) کمتر از مقادیر MIC برخی از مطالعات پیشین در ارتباط با جدایه‌های اکتینوباکتر دارای فعالیت ضدمیکروبی بود که این امر می‌تواند به علت کم بودن فعالیت دارای خاصیت ضدمیکروبی و یا تفاوت روش استخراج ترکیبات زیست فعال در مطالعه حاضر و سایر مطالعات باشد (۲۳).

Archive of SID

www.SID.ir

Micromonospora یکی از جنس‌های مهم اکتینوباکتر نادر است. این جنس دارای ۶۷ گونه هست. باکتری‌های متعلق به جنس *Micromonospora* در تولید آنتی بیوتیک‌ها نقش مهمی دارند (Houge-Frydrych, Readshaw et al. 2000). از جمله ترکیبات زیست فعال تولیدشده توسط این باکتری‌ها می‌توان به آمینو گلیکوزیدها، maquarimisids و ماکرولیدها اشاره نمود (۲۴).

Micromonospora در اکوسیستم‌های آبی و خاکی یافت می‌شود ولی عمدتا در محیط‌های آبی زندگی می‌کند (۲۴، ۲۵) اگرچه بسیاری از باکتری‌های متعلق به جنس *Micromonospora* از خاک‌های متنوع مناطق مختلف جداسازی شده اند (۲۶). برخی از آن‌ها از گره ریشه (۲۵) شن و ماسه دریا (۲۶) و اسفنج دریایی (۲۷) جداسازی شده‌اند.

۶. نتیجه‌گیری

به‌طورکلی، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که اکتینوباکترهای کمیاب موجود در آب‌های جنوب ایران می‌توانند نویدبخش منبع طبیعی مناسبی برای یافتن ترکیبات ضدمیکروبی بر علیه سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک از جمله، *Pseudomonas aeruginosa* باشند. نتایج این پژوهش دیدگاهی جدید در مورد توانایی‌های گسترده اکتینوباکترهای دریایی در تولید ترکیبات زیست فعال از جمله آنتی بیوتیک‌ها به منظور یافتن کاندیداهای دارویی جدید و امیدوارکننده برای درمان عفونت‌ها ارائه می‌نماید. به منظور مطالعات دقیق مکانیسم فعالیت ترکیب دارای خاصیت ضدمیکروبی در عصاره خام سویه برتر، این ترکیب بایستی با استفاده از ستون‌های کروماتوگرافی جداسازی و خالص‌سازی شود و در نهایت با استفاده از روش‌های رایج همانند LC-MASS، NMR و FT-IR شناسایی گردد و در نهایت غیرسمی بودن آن برای سلول‌های یوکاریوتی مورد بررسی قرار گیرد.

۷. تقدیر و تشکر

این مطالعه هیچ‌گونه حامی مالی نداشته است. نویسندگان از همکاری خانم‌ها فهمیه محمدنیا و لیلا پرویزی، کارشناسان محترم شرکت توسعه فناوری زیستی توکا صمیمانه تشکر می‌کنند.

۸. سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

۹. تضاد منافع

بدین‌وسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Okeke IN. Poverty and root causes of resistance in developing countries. InAntimicrobial resistance in developing countries Springer, New York, NY. 2010. 27-35.
2. Parkins MD, Gregson DB, Pitout JD, Ross T, Laupland KB. Population-based study of the epidemiology and the risk factors for Pseudomonas aeruginosa bloodstream infection. Infection. 2010; 38(1):25-32.
3. Johnson LE, D'agata EM, Paterson DL, Clarke L, Qureshi ZA, Potoski BA, Peleg AY. Pseudomonas aeruginosa bacteremia over a 10-year period: multidrug resistance and outcomes in transplant recipients. Transpl Infect Dis. 2009; 11(3):227-34.
4. Wiegand I, Marr AK, Breidenstein EB, Schurek KN, Taylor P, Hancock RE. Mutator genes giving rise to decreased antibiotic susceptibility in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother. 2008; 52(10):3810-3.
5. Baumgart AM, Molinari MA, Silveira AC. Prevalence of carbapenem resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii in high complexity hospital. Braz J Infect Dis. 2010; 14(5):433-6.
6. Tuon FF, Gortz LW, Rocha JL. Risk factors for pan-resistant Pseudomonas aeruginosa bacteremia and the adequacy of antibiotic therapy. Braz J Infect Dis. 2012; 16(4):351-6.
7. Khan ST, Takagi M, Shin-ya K. Actinobacteria associated with the marine sponges Cinachyra sp., Petrosia sp., and Ulosa sp. and their culturability. Microbes Environ. 2012; 27(1):99-104.
8. Wilke MS, Heller M, Creagh AL, Haynes CA, McIntosh LP, Poole K, Strynadka NC. The crystal structure of MexR from Pseudomonas aeruginosa in complex with its antirepressor ArmR. Proc Natl Acad Sci 2008; 105(39):14832-7.
9. Luo HY, Wang YR, Miao LH, Yang PL, Shi PJ, Fang CX, Yao B, Fan YL. Nesterenkonia alba sp. nov., an alkaliphilic actinobacterium isolated from the black liquor treatment system of a cotton pulp mill. Int J Syst Evol Microbiol. 2009; 59(4):863-8.
10. Jensen PR, Lauro FM. An assessment of actinobacterial diversity in the marine environment. Antonie Van Leeuwenhoek. 2008; 94(1):51-62.
11. Gulve RM, Deshmukh AM. Antimicrobial activity of the marine actinomycetes. Int Interdiscip Res J. 2012; 2(3).
12. Takizawa M, Colwell RR, Hill RT. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. Appl Environ Microbiol. 1993; 59(4):997-1002.
13. Bertani LE, Bertani G. Genetics of P2 and related phages. Adv Genet 1971, (16): 199-237.
14. Salehi M, Hekmatdoost M, Hosseini F. Quinolone resistance associated with efflux pumps mexAB-oprM in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. J Microbial World 2014, 6(4): 290-298.
15. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin Microbiol Rev. 2009; 22(4):582-610.
16. Khosravi AD, Mihani F. Detection of metallo-β-lactamase–producing Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burn patients in Ahwaz, Iran. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2008 Jan 1; 60(1):125-8.
17. Mohseni M, Norouzi H. Antifungal activity of actinomycetes isolated from sediments of the Caspian Sea. J Mazandaran Univ Med Sci. 2013; 23(104):80-7.
18. Xie JJ, Zhou F, Li EM, Jiang H, Du ZP, Lin R, Fang DS, Xu LY. FW523-3, a novel lipopeptide compound, induces apoptosis in cancer cells. Mol Med Rep. 2011; 4(4):759-63.
19. Songsumanus A, Kudo T, Igarashi Y, Tanasupawat S. Characterization and screening of antimicrobial activity of Micromonospora strains from Thai soils. Malays J Microbiol . 2013 Jan 1; 9(3):260-9.
20. Madhumita, T. Isolation and screening of micromonospora for bioactive metabolites and their bioevaluation. 2016.
21. Abdelmohsen UR, Pimentel-Elardo SM, Hanora A, Radwan M, Abou-El-Ela SH, Ahmed S, Hentschel U. Isolation, phylogenetic analysis and anti-infective activity screening of marine sponge-associated actinomycetes. Mar drugs. 2010; 8(3):399-412.
22. Valli S, Suvathi SS, Aysha OS, Nirmala P, Vinoth KP, Reena A. Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. Asian Pac J Trop Biomed. 2012; 2(6):469-73.

Archive of SID

www.SID.ir

23. Sengupta, S, Pramanik, A, Ghosh, A, & Bhattacharyya, M. Antimicrobial activities of actinomycetes isolated from unexplored regions of Sundarbans mangrove ecosystem. BMC microbiol. 2015; 15(1): 170.
24. Houge-Frydrych CS, Readshaw SA, Bell DJ. SB-219383, a novel tyrosyl tRNA synthetase inhibitor from a Micromonospora sp. J Antibiot. 2000; 53(4):351-6.
25. Ertaş M, Özdemir K, Atalan E. Isolation and characterization of Micromonospora bacteria from various soil samples obtained around Lake Van. Afr J Biotechnol. 2013;12(21).
26. Hernandez LM, BLANCO JA, Baz JP, Puentes JL, Millan FR, Vazquez FE, Fernandez-Chimeno RI, Gravalos DG. 4'-N-Methyl-5'-hydroxystaurosporine and 5'-Hydroxy staurosporine, New Indolocarbazole Alkaloids from a Marine Micromonospora sp. Strain. J Antibiot. 2000; 53(9):895-902.
27. Gutierrez-Lugo MT, Woldemichael GM, Singh MP, Suarez PA, Maiese WM, Montenegro G, Timmermann BN. Isolation of three new naturally occurring compounds from the culture of Micromonospora sp. P1068. Nat Prod Res. 2005; 19(7):645-52.

Archive of SID

www.SID.ir