مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۴، شماره۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۸(شماره پی در پی۱۳۴)

Archiv

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019

ویژگی متابولیت‌های ضدمیکروبی تولید شده به وسیله اکتینومیست‌های نمک دوست جدا شده از دریاچه‌های آران بیدگل و مهارلو

محمدرضا نصری[۱]، مجید باصری صالحی[۲*]، مهران کرد تبار[۳]

[۱]گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران، [۲]گروه میکروبیولوژی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران، [۳]گروه بیوشمی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۷/۰۹/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۲۴

چکیده:

زمینه و هدف: امروزه یکی از مشکلات ایجاد شده در درمان بیماری‌های عفونی وجود میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها است. بنابر این کشف منابع جدید جهت تولید ترکیبات فعال زیستی با ویژگی ضدمیکروبی می تواند خدمت بسیار عظیمی به درمان بیماری‌های عفونی و کاهش میکروارگانیسم‌های مقاوم چند دارویی نماید. هدف از این تحقیق تعیین و ارزیابی متابولیت‌های ضدمیکروبی تولید شده به وسیله اکتینومیست‌های نمک دوست جدا شده از دریاچه‌های آران و بیدگل و مهارلو می‌باشد.

روش‌بررسی: این مطالعه به صورت توصیفی، مقطعی در سال ۱۳۹۶ انجام شد و ۵۱ اکتینومیست نمک دوست از ۱۱۵ نمونه آب و رسوبات نمکی در یاچه های آران بیدگل و مهارلو جدا گردید و جهت تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای جدا کردن متابولیت‌های تولید شده به وسیله اکتینومایست‌ها، ویژگی مایع رویی محیط کشت مایع اکتینومیست ها در مرحله سکون در مقابل *اشرشیا کلی*، *سودو موناس ایروجینوزا*، *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کاندیدا آلبیکنز* و *آسپرجیلوس نیجر* با استفاده از روش انتشار در آگار ارزیابی گردید. سپس جدایه‌های تولید کننده متابولیت‌های ضد میکروبی با استفاده از توالی ژن 16SrRNA تأیید گردیدند. بهینه‌سازی تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی با استفاده از تغییر دما، pH ، منبع کربن و نیتروژن انجام گرفت و بهترین فاز تولید متابولیت‌ها و حلال آلی برای خالص سازی تعیین گردید. در انتها ساختار احتمالی ترکیبات فعال زیستی با استفاده از روش‌های طیف سنجی مرئی فرابنفش و طیف سنجی جرمی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که از ۵۱ اکتینومیست نمک دوست جدا شده، ۳ جدایه قادر به تولید متابولیت‌های ضد میکروبی بودند. *باسیلوس سرئوس* ، *استافیلوکوکوس اورئوس وکاندیدا آلبیکنز* به همه متابولیت‌های تولیدی حساس و *سودوموناس ایروجینوزا* و *ای کلای* مقاوم بودند. شناسایی مولکولی نشان داد که این جدایه‌های *استرپتومایسس فلاویدوفوسکوس* سویه HBUM17405 و *نوکاردیوپسیس داسونویلی* زیر گروه داسونویلی سویه OK-22 و *اکتینومایست* سویه Nd28 بودند. متابولیت‌های ضد میکروبی در فاز سکون تولید می شدند و بهترین حلال برای خالص سازی آنها متانول و زایلین بودند. بهینه دما، pH به ترتیب ۲۷ درجه سلسیوس و ۸ و فروکتوز، گزیلوز ، عصاره مخمر و پپتون بهترین منبع کربن و نیتروژن ارزیابی شدند. نتایج به دست آمده از آنالیز طیف سنجی مرئی فرابنفش و طیف سنجی جرمی نشان داد ساختار احتمالی متابولیت های ضد میکروبی پپتید متصل به گروه‌های کلرواستات، اتیل کلرواستات و ۴ کلرو ۳ هیدروکسی بوتیرونیتریت می‌باشد.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های این تحقیق متابولیت‌های ضدمیکروبی جدید به وسیله اکتینومایست‌های نمک دوست تولید می‌شود که برای استفاده آنها در درمان عفونت ها نیاز به آزمون های درون تنی می باشد که در دیگر تحقیقات می بایست گنجانده شود.

واژه‌های کلیدی: اکتینومایست‌های نمک دوست، خاصیت ضدمیکروبی، رسوبات نمک

[*] **نویسنده مسئول: مجید باصری صالحی**، کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروبیولوژی

Email: majidbaseri@hotmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019

مقدمه

اکتینومیست‌ها، گروه بزرگ و متنوعی از باسیل‌های گرم مثبت بوده که در راسته اکتینومایستالس قرار دارند. DNA این باکتری‌ها دارای درصد گوانین و سیتوزین ۷۵ـ۵۵ درصد و از نظر ریخت‌شناسی تمایل به تشکیل زنجیر یا فیلامنت دارند. محیط زندگی این باکتری‌ها خاک بوده و ویژگی ساپروفیت از یک طرف و از طرف دیگر قابلیت بیماری‌زایی دارند(۳ـ۱). عموماً این میکروارگانیسم‌ها به علت متابولیسم فعال می‌توانند متابولیت‌های مختلفی از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها، ویتامین‌ها، هورمون‌های رشد، عوامل ضد سرطانی و دیگر ترکیبات فعال زیستی تولید کنند. از میان این باکتری‌ها جنس *استرپتومایسس* در مقایسه با دیگر جنس‌ها توانایی بیشتری در تولید متابولیت‌های گوناگون با خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی نشان داده است(۶ـ۴). امروزه بیش از ۱۲۰۰۰ آنتی‌بیوتیک شناخته شده است که بیش از ۷۰ درصد از آنها به وسیله اکتینومیست‌ها و ۳۰ درصد باقیمانده به وسیله قارچ‌های رشته‌ایی و باکتری‌های غیراکتینومیستی تولید می‌شود(۸ـ۵). بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های تولید شده به وسیله اکتینومیست‌ها در چندین کلاس ساختاری بزرگ، مانند؛ آمینوگلیکوزیدها(به عنوان مثال: دوگزوروبیسین)، بتالاکتام(به عنوان مثال: سفالوسپورین)، ماکرولیدها(به عنوان مثال: ارتیرومایسین) و تتراسایکلین طبقه‌بندی می‌شوند(۱۱ـ۹). همان‌گونه که بیان گردید اکتینومیست‌ها دارای پتانسیل رشد در مناطق مختلف محیطی می‌باشند و پژوهش‌های انجام شده به وسیله محققین مختلف نشان داده است که تولید متابولیت‌های ثانویه این باکتری‌ها وابسته به شرایط فیزیکوشیمیایی محیط‌های آبی و خاکی تغییر می‌نماید(۶). امروزه اثبات شده است که ویژگی فیزیولوژیکی اکتینومیست‌ها در محیط‌های مختلف تحت تأثیر استرس‌های سخت مانند شوری زیاد و دمای بالا تغییر می‌نماید، که البته چنین ویژگی به پتانسیل تولید متابولیت‌هایی گوناگون این باکتری‌ها ارتباط دارد که باعث افزایش بقای آنها در محیط‌های مختلف می‌گردد. از طرف اکتینومیست‌ها به علت تولید متابولیت‌های گوناگون قادر به رقابت در محیط‌های آبی و خاکی غنی و یا فقیر از نظر مواد غذایی می‌باشند، لذا با در نظر داشتن قدرت تولید متابولیت‌ها و قابلیت زندگی در شرایط مختلف تحقیق حاضر سعی می‌نماید تا محیط‌های نمکی را به عنوان منابع مهمی جهت رشد اکتینومیست‌های تولید کننده متابولیت‌های ضدمیکروبی معرفی نماید. در این روند به احتمالی می‌توان متابولیت‌های ضدمیکروبی جدیدی که به وسیله اکتینومایست‌های نمک دوست تولید می‌شود را معرفی نمود که شاید بتوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها باشد، لذا هدف از این تحقیق تعیین و ارزیابی متابولیت‌های ضدمیکروبی تولید شده به وسیله اکتینومیست‌های نمک دوست جدا شده از دریاچه‌های آران و بیدگل و مهارلو می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی، مقطعی که در سال ۱۳۹۶ انجام شد، ۵۱ اکتینومیست نمک دوست از ۱۱۵ نمونه آب و رسوبات نمکی دریاچه‌های آران بیدگل(شکل ۱) و مهارلو(شکل ۲) جدا گردید و جهت تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی مورد ارزیابی قرار گرفتند. جهت جداسازی اکتینومیست‌ها ابتدا نمونه‌های رسوبات نمکی و آب از دریاچه ها ی نمک از عمق ۱۵ـ۱۰ سانتی‌متری رسوبات نمکی(مناطقی که به رنگ زرد، نارنجی، کرم و قهوه‌ای بود) جمع‌آوری و در طی ۲ ساعت به آزمایشگاه جهت آنالیز میکروب‌شناسی انتقال یافتند(۱۴ـ۱۲).

جهت کشت نمونه‌ها، رسوبات و آب نمک دریاچه در آب مقطر حل گردید و بعد از مخلوط شدن کامل با دور rpm ۳۸۰۰ سانتریفوژ گردید و محلول رویی دور ریخته شد و از رسوبات، رقیق‌سازی تا رقت 10^{-5} تهیه شد. سپس محیط مایع تریپتی کاز سوی آگار با غلظت‌های نمک شامل؛ ۰/۵ ، ۱ ، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ مولار تهیه شد و نمونه‌ها کشت داده شد و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. بعد از گذشتن ۷۲ ساعت، کدورت در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ مشاهده و سپس از این غلظت‌ها به طور مستقم لام تهیه شد و بعد از رنگ‌آمیزی گرم با میکروسکوپ با بزرگ نمایی 100Xمورد مطالعه قرار گرفتند. نمونه‌هایی که باکتری‌های رشته‌ای گرم مثبت بودند به صورت مقدماتی اکتینومایست در نظر گرفته شد. جهت جداسازی باکتری‌های مورد نظر، به محیط کشت جامد(محیط کشت تریپتی کاز سوی آگار ۱/۵ مولار وتریپتی کاز سوی آگار ۲ مولار همراه با ۲درصد نوترینت آگار) انتقال یافتند. بعد از گذشت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس کلنی‌های سفید و زرد با حاشیه نامنظم مشاهده گردید و با رنگ‌آمیزی گرم، باکتری‌های اکتینومایست مشاهده شد(۱۶ و ۱۵).

تست‌های اولیه جهت شناسایی باکتری‌های اکتینومایست شامل رنگ‌آمیزی گرم و تعیین شکل میکروسکوپی انجام گرفت و شناسایی ویژگی‌های بیوشیمیایی باکتری‌های اکتینومایست جداسازی شده شامل؛ تست‌های اکسیداز، کاتالاز، اکسیداتیو- فرمانتتیو، هیدرولیز کازئین و هیدرولیز نشاسته صورت گرفت(۱۷ و۱۲). در این تحقیق از کیت APi Coryne (bioMerieux) برای شناسایی فنوتیپی اکتینومایست‌ها استفاده گردید، به این صورت که نمونه‌های باکتریایی مورد نظر برای شناسایی به لوله‌های موجود در کیت مورد نظر اضافه گردیدند و به مدت ۴۸ـ۲۴ ساعت در دمای مطلوب ارگانیسم گرمخانه‌گذاری گردیدند. پس از این مدت با اضافه کردن معرف‌های مربوطه تغییر رنگ تست‌ها و کدهایی که شامل چند عدد بودند ثبت گردید و بر اساس کدهای به دست آمده و نرم‌افزار APi شناسایی باکتری‌ها شناسایی گردیدند(۱۸ و۱۱).

جهت تعیین پتانسیل تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی جدایه‌های اکتینومایست، از میکروارگانیسم‌های *اشرشیاکلی* (PTCC 1330) *سودوموناس ایروجینوزا* (PTCC 1074)

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019

باسیلوس سریوس(PTCC 1015) *استافیلوکوکوس اورئوس*(PTCC 1112) *کاندیدا آلبیکنز*(PTCC 5027) و *آسپرجیلوس نیجر*(PTCC 5012) استفاده گردید. بدین گونه که کدورت کشت۲۴ـ ۱۸ ساعته باکتری‌های فوق را با لوله ۰/۵ مک‌فارلند تنظیم کرده و بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت صفحه‌ایی داده و با استفاده از بورل استریل چاهک‌هایی در محیط تعبیه گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت‌های فیلتر شده به درون هر چاهک تلقیح شد و پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت اثر ضد میکروبی متابولیت‌های تولیدی بر روی میکروارگانیسم‌ها با استفاده از وجود هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها مورد بررسی قرار گرفت(۱۹).

شناسایی ژنوتیپی جدایه‌های اکتینومایستی تولید کننده متابولیت‌های ضدمیکروبی با استفاده از تکثیر قطعه‌ای از توالی ژن 16S rRNA مربوط به باکتری‌ها انجام گرفت. به این صورت که در ابتدا با استفاده از کیت استخراج DNA، DNA نمونه‌های مورد نظر استخراج گردید و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی آن‌ها انجام شد. سپس محصول حاصل بر روی ژل آگارز الکتروفورز شد و با شناسایی باند اختصاصی، باند از روی ژل بریده و به وسیله کیت استخراج DNA از ژل خالص‌سازی و جداسازی گردید. در نهایت برای تعیین توالی، نمونه‌ها به شرکت ژن فناوران ارسال و نتیجه تعیین توالی در NCBI چک گردید و باکتری‌ها کاملاً تا حد گونه شناسایی شدند(۲۰ و ۱۶، ۱۱).

هدف از بهینه‌سازی به دست آوردن بهترین شرایط محیطی جهت تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی با بالاترین میزان تولید بوده است. در هر مرحله بهینه‌سازی یکی از عؤامل مؤثر در محیط کشت تغییر داده شد. بهینه‌سازی دما با استفاده از دماهای ۲۸، ۳۷ و ۴۵ سیلسیوس، pHهای ۶، ۷، ۸ و ۹ و منابع کربن و نیتروژن فروکتوز، گزیلوز، مالتوز، لاکتوز، گلوکز، ساکاروز، آمونیوم کلراید، پپتون و عصاره مخمر انجام گرفت(۱۹).

به دنبال شناسایی شرایط بهینه تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی، جداسازی این متابولیت‌ها با استفاده از حلال‌های مختلف صورت گرفت. برای انجام این آزمایش اکتینومیست‌های جدا شده در محیط تریپتیکاز سوی براث کشت داده شدند و پس از ۳ تا ۵ روز به مدت ۲۰ دقیقه در دور rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردیدند. سپس سوپرناتانت‌ها با استفاده از کاغذ واتمن استریل شماره یک فیلتر گردیدند(۵ و۳) و حلال‌های مختلف استون، اتانول، متانول، اتیل استات و کلروفرم به نسبت ۱:۱ به سوپرناتانت‌ها برای استخراج متابولیت‌های ضدمیکروبی اضافه شدند. سپس به مدت ۴۵ دقیقه با استفاده از هم‌زن با هم مخلوط شدند و به دنبال آن فاز حلال‌ها با استفاده از قیف جداسازی از مایع جدا گردیدند. به دنبال آن فعالیت ضدمیکروبی تمام متابولیت‌ها با استفاده از حلال‌ها به عنوان کنترل با روش چاهک زنی در آگار بررسی شدند. در رابطه با حلال اتیل استات و کلروفرم، فاز آنها از فاز آبی جدا

www.SID.ir

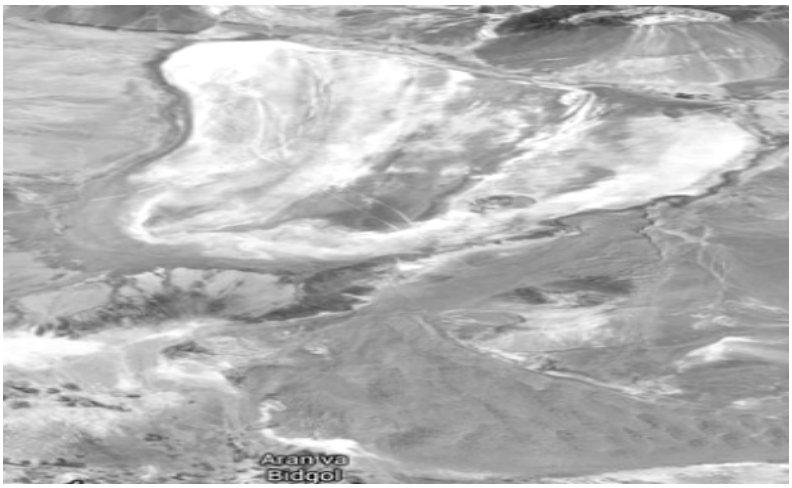
Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019

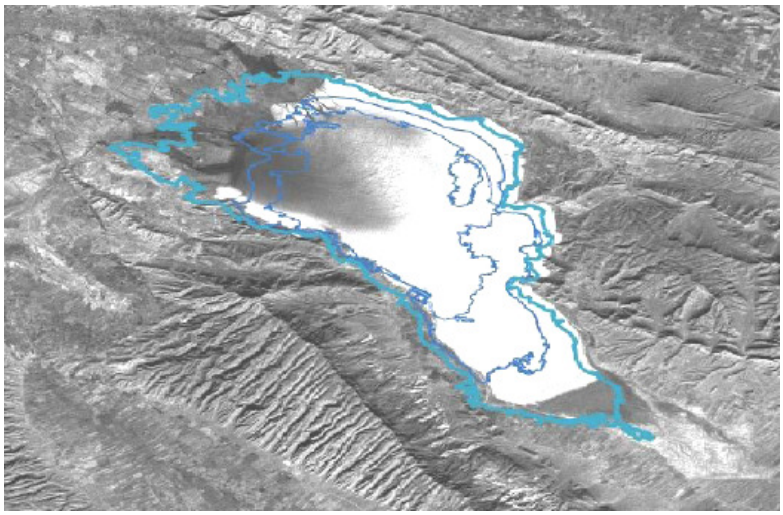
گردید، سپس اتیل استات و کلروفرم به ترتیب در حمام بخار آب ۹۰-۸۰ و ۶۲ درجه سیلسیوس تبخیر شدند و پس از اطمینان از تبخیر آنها عصاره‌های باقیمانده در بافر N- فسفات ۰/۲ مولار(۸/۵ - ۸ pH) حل شدند، سپس در چاهک‌های تعبیه شده در محیط آگار مغذی کشت داده شده با نمونه های میکروبی ریخته و در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. یک چاهک نیز به عنوان کنترل در نظر گرفته شد که فقط بافر N- فسفات ۰/۲ مولار در آن ریخته شد. پس از ۲۴ ساعت با استفاده از اندازه هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها بهترین حلال جهت جداسازی متابولیت‌های ضدمیکروبی شناسایی گردید(۲۰ و ۱۶، ۱۲).

در این پژوهش برای شناسایی ساختمان متابولیت‌های ضدمیکروبی از روش‌های طیف‌سنجی UV visible و طیف سنجی جرمی Mass spectrometry استفاده گردید(۲۱ و ۲۰).

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزارSPSS و آزمون کروسکال- والیس تجزیه و تحلیل شدند.



شکل ۱: نقشه توپوگرافی دریاچه نمک آران و بیدگل کاشان (GPS:39S 579975-3798341)



شکل ۲: نقشه توپوگرافی دریاچه نمک مهارلو شیراز (GPS: 39R 668293-3259121)

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019

یافته‌ها

نتایج به دست آمده نشان داد که ۳ جدایه اکتینومیست‌ها قادر به تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی بودند که ۲ جدایه از رسوبات نمکی دریاچه آران و بیدگل و۱ جدایه از رسوبات نمکی دریاچه مهارلو شیراز به دست آمدند. جدایه‌های اکتینومیست از نظر شکل ظاهری کلنی و تست‌های بیوشیمیایی به طور مقدماتی شناسایی شدند(شکل ۳). سپس این جدایه‌ها با استفاده از کیت APi Coryne (bioMerieux) تأیید گردیدند. نتایج به دست آمده از کیت Api نشان داد جدایه‌ها همگی اکتینومیست با درصدهای همولوژی بالا تر از ۹۰ درصد بودند.

نتایج به دست آمده از تعیین طیف اثر متابولیت‌های ضدمیکروبی جدایه‌های اکتینومیست نشان داد که ۳ جدایه اکتینومیست نمک *دوست* تولید کننده متابولیت‌های ضدمیکروبی بودند که همگی قادر به ممانعت از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *کاندیدا آلبیکنس* با طیف اثر متفاوت بودند، اگرچه *اشریشیاکلای*، *سودوموناس آئروجینوزا* و *آسپرژیلوس نایجر* به تمامی‌متابولیت‌های ضدمیکروبی مقاوم نشان دادند. از ۳ جدایه اکتینومیست، جدایه Am14 اثر ضدمیکروبی بر روی تمام میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست‌ها نشان داد. جدایه Aa13 کمترین اثر بر باکتری‌ها و بیشترین اثر را برروی قارچ‌های تک سلولی و پر سلولی نشان داد(جدول۲).

استخراج DNA با استفاده از کیت صورت گرفت. سپس جهت اطمینان از خالص بودن DNA، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج‌ها ۲۶۰/۲۸۰ خوانده شد که برای هر نمونه بالاتر از ۱/۸ بود(در غیر این صورت DNA ناخالص تلقی می‌گردید). محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مربوط به هر نمونه ابتدا از درون ژل آگارز با دمای ذوب پایین بریده و خالص‌سازی شد و سپس تعیین توالی گردید. به این ترتیب نمونه‌ها در حد گونه با استفاده از توالی‌های موجود در سایت NCBI شناسایی شدند. نتایج آلاینمنت ژن16s rRNA نشان دهنده شناسایی جدایه‌Aa11 با ۹۵ درصد همولوژی به *استرپتومایسس فلاویدوفوسکوس* سویه HBUM17405، جدایه Aa13 با ۹۷ درصد همولوژی به *نوکاردیوپسیس داسونویلی* زیرگروه داسونویلی سویهOK-22 و جدایه Am14 با ۹۷ درصد همولوژی به *اکتینومایست* سویه Nd28 بوده است(جدول ۳).

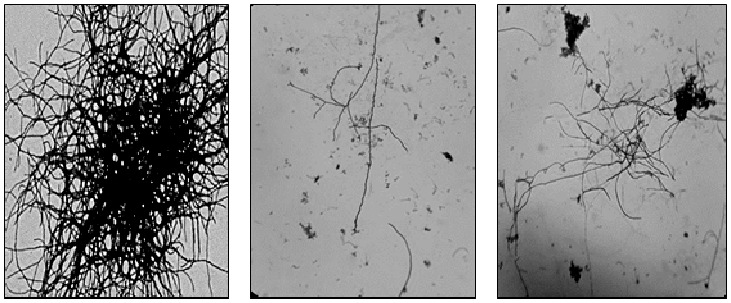
در این مرحله اثر دما وpHهای مختلف بر تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی بررسی گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که بهترین دما و pH جهت تولید متابولیت‌های ضد میکروبی به ترتیب ۲۸ درجه سلسیوس و ۷ بوده است و نتایج به دست آمده نشان داد که گلوکز بهترین منبع کربن و پپتون بهترین منبع نیتروژن جهت تولید متابولیت‌های ضد میکروبی ارزیابی گردیدند. بهترین حلال‌ها برای جداسازی متابولیت ضدمیکروبی متانول ارزیابی گردید. همان‌گونه که عنوان شد در این تحقیق برای شناسایی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019

ساختمان متابولیت‌های ضدمیکروبی از روش‌های طیف‌سنجی مرئی فرابنفش و طیف‌سنجی جرمی‌استفاده گردید. نتایج به دست آمده از طیف‌سنجی UV visible نشان داد که بیشترین جذب در طول موج ۲۶۸ نانومتر بوده است که نشاندهنده باندهای پپتیدی است. بنابراین ترکیبات پروتئینی را تأیید می‌نماید. از طرف دیگر آزمون طیف‌سنجی جرمی وجود گروه‌های کلرواستات، اتیل کلرواستات و ۴ کلرو ۳ هیدروکسی بوتیرونیتریت را تأیید می‌کند(شکل‌های۴ تا ۹).



الف) سویه Aa11 ب) سویه Aa13 ج) سویه Am14

شکل ۳: شکل های میکروسکوپی سلول های اکتینومایست‌های تولید کننده متابولیت‌های ضدمیکروبی(بزرگنمایی X۱۰۰).

جدول۱: تست‌های بیوشیمایی بر روی سویه های جدا شده

تست های بیوشیمایی	جدایه‌های		
	Am14	Aa13	Aa11
اکسیداز	+	+	+
کاتالاز	+	+	+
O/F	+/–	+/–	+/–
هیدرولیز نشاسته	+	+	+
هیدرولیز کازئین	+	–	–

جدول ۲: قطر هاله ممانعت کنندگی رشد متابولیت‌های تولیدی(بر حسب میلی‌متر) به وسیله سویه ها بعد از ۷۲ ساعت

سویه های میکروبی	قطر هاله ممانعت کنندگی رشد متابولیت‌های تولیدی (بر حسب میلی‌متر)		
	Aa11	Aa13	Am14
سودوموناس آئروژینوزا	-	-	-
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۰ ± ۱	۲۰ ± ۱	۲۴ ± ۱
اشریشیا کلای	-	-	-
باسیلوس سرئوس	۲۰ ± ۱	۲۴ ± ۱	۲۰ ± ۱
کاندیدا آلبیکنس	-	-	۲۰ ± ۱
آسپرژیلوس نایجر	-	-	-

*داده‌های فوق میانگین ۳ تکرار می‌باشد.

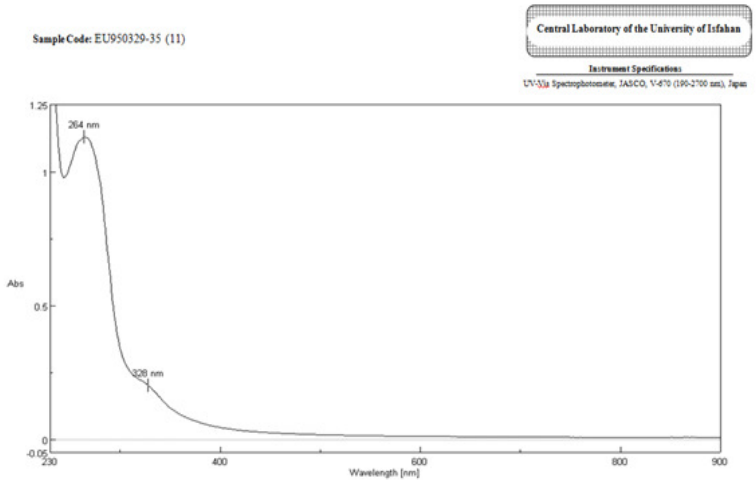
www.SID.ir

Archive of SID

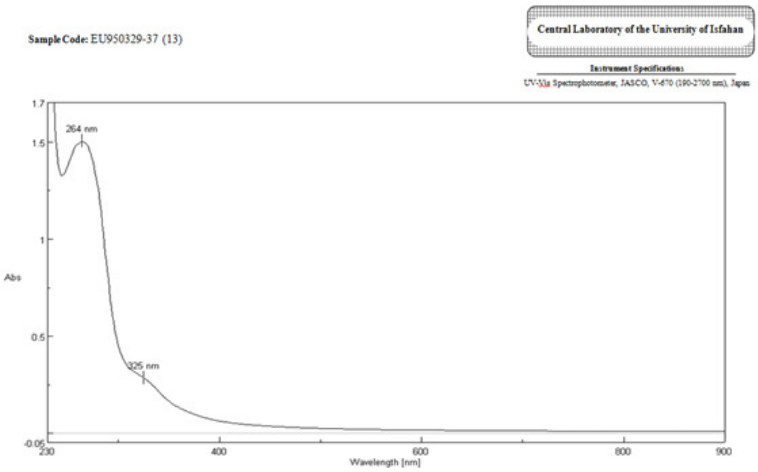
Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019

جدول ۳: نتایج شناسایی مولکولی سویه‌های تولید کننده متابولیت‌های ضدمیکروبی

سویه ها	شماره دسترسی	توضیح نوع میکروارگانیسم	بالاترین درصد تشابه
Aa11	gb/EU841706.1	*Streptomyces flavidofuscus* strain HBUM1740	۹۵ درصد
Aa13	gb/KF543091.1	*Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* strain OK-22	۹۷ درصد
Am14	gb/FJ379328.1	*Actinomycete* Nd28	۹۵ درصد



شکل ۴: آنالیز حاصل از طیف‌سنجی مرئی فرابنفش برای *استرپتومایسس فلاویدوفوسکوس* سویه HBUM17405

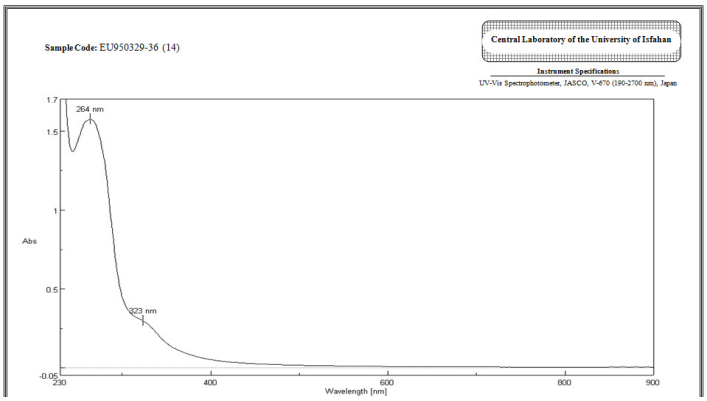


شکل ۵: آنالیز حاصل از طیف‌سنجی مرئی فرابنفش برای *نوکاردیوپسیس داسونویلی* زیرگروه داسونویلی سویهOK-22

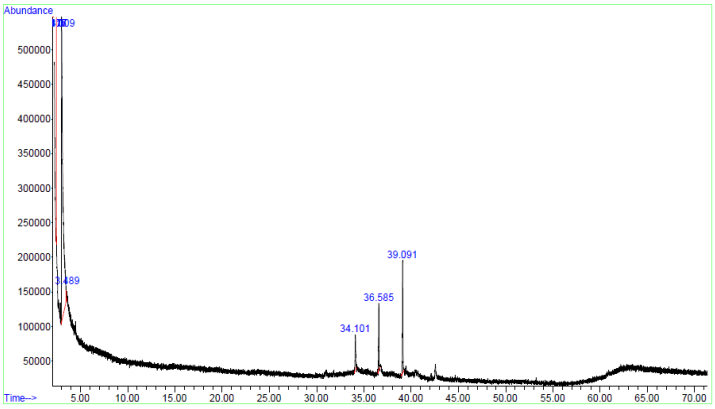
www.SID.ir

Archive of SID

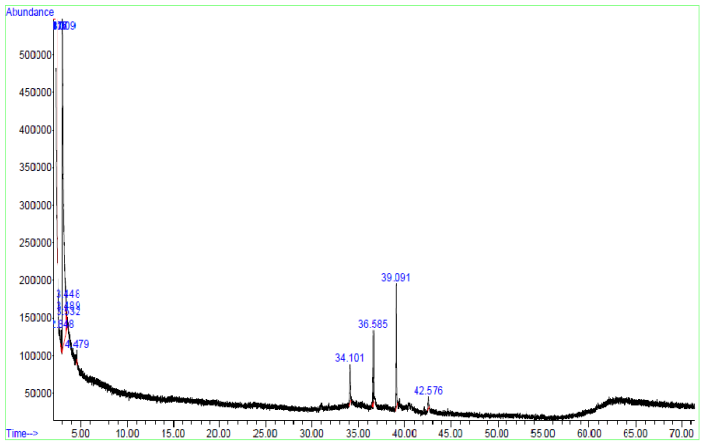
Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019



شکل ۶ : آنالیز حاصل از طیف سنجی مرئی فرابنفش برای*اکتینومایست* سویه Nd28



شکل ۷ : آنالیز حاصل از گاز کروماتوگرافی جرمی برای *استرپتومایسس فلاویدوفوسکوس* سویه HBUM17405

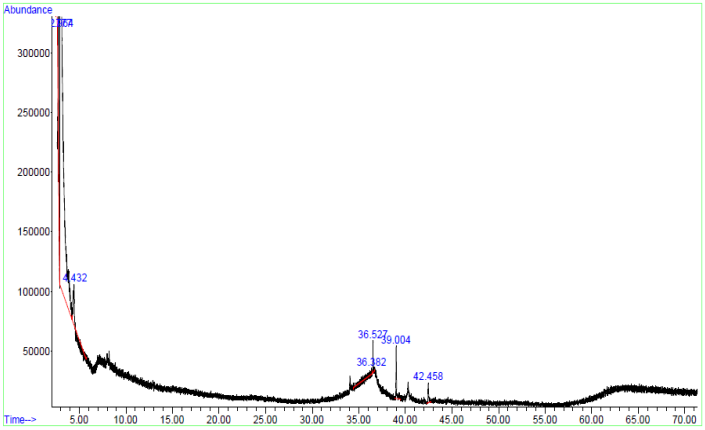


شکل ۸ : آنالیز حاصل از گاز کروماتوگرافی جرمی‌برای *نوکاردیوپسیس داسونویلی* زیرگروه داسونویلی سویه OK-22

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019



شکل ۹: آنالیز حاصل از گاز کروماتوگرافی جرمی برای *اکتینومایست* سویه Nd28

بحث

اکتینومیست‌ها باکتری‌هایی با توانایی تولید ترکیبات بیوتکنولوژیکال مانند؛ آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌های صنعتی و دیگر ترکیبات فعال زیستی هستند. از این ترکیبات آنتی‌بیوتیک‌ها بهترین ترکیباتی است که به وسیله اکتینومیست‌ها تولید می‌گردد. امروزه اثبات شده است که جنس اکتینومیست مسئول ساخت بیش از ۶۰ درصد از آنتی‌بیوتیک‌ها است که بیشتر از ۱۵ درصد از آنها به وسیله تعدادی از اکتینومیست‌های منسوب، میکروونوسپورا، اکتینومادورا، استرپتوورتیسلیوم و ترمواکتینومیست‌ها تولید می‌شوند(۵). از طرف دیگر باید توجه داشت که اکتینومیست‌ها علاوه بر آنتی‌بیوتیک‌ها متابولیت‌های مهم دیگری همانند باکتریوسین‌ها تولید می‌نماید که از نظر پزشکی و زیست‌شناسی بسیار اهمیت دارد، لذا تحقیق حاضر ضمن تعیین و ارزیابی پتانسیل تولید متابولیت‌های ضد میکروبی اکتینومیست‌های نمک دوست، سعی بر معرفی منابع طبیعی جدید تولید ترکیبات فعال زیستی به وسیله اکتینومیست‌ها می‌نماید.

همانگونه که قبلا عنوان گردید، امروزه با توجه به افزایش میزان باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیکی‌ها، نیاز بیشتری به داروهای جدید و جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها احساس می‌شود. بنابراین هدف اصلی صنایع دارویی تلاش برای یافتن ترکیبات ضدمیکروبی با فعالیت بالا برای مقابله با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا است(۱۱ و۷، ۲). یکی از باکتری‌هایی که در صنایع دارویی مورد توجه خاص قرار گرفته است اکتینومایست‌*ها* هستند که توانایی تولید ترکیبات ضدمیکروبی با توانایی بالایی را دارند(۲۲ و ۲۳). چندین تحقیق در ارتباط با این موضوع در کشورهای مختلف از جمله کره، آمریکا، مصر، چین، آلمان و هندوستان انجام گرفته که اهمیت تولید متابولیت‌ها ضدمیکروبی به وسیله *اکتینومایست*‌ها را نشان می‌دهد(۲۷-۲۳ و ۱۷، ۱۴). از طرف دیگر تولید

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019

متابولیت‌های ضدمیکروبی به وسیله اکتینومیست‌های نمک دوست از جمله موضوعاتی است که اطلاعات زیادی به وسیله دانشمندان گزارش نگردیده است(۱۴ و ۱۳). نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر نشان داد که ۵۱ جدایه اکتینومایست از دریاچه‌های نمک آران بیدگل و مهارلو جدا گردید که سه سویه قادر به تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی بودند. در مطالعه هاناجیان و همکاران در آمریکا منطقه ماساچوست اکتینومایست‌هایی را از مناطق نمکی جدا کردند که توانایی تولید متابولیت‌ها ضدمیکروبی مؤثر در مقابل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بیماری‌زا را داشتند. این ترکیبات فعال زیستی دارای ساختار پروتئینی بودند که قدرت بالایی جهت کاهش تعداد باکتری‌های بیماری‌زا را داشتند(۱۲). در این روند جینی و همکاران در منطقه بجایا در الجزایر اکتینومایست‌هایی را از خاک نمکی جدا نمودند که دارای توانایی تولید متابولیت‌هایی با خاصیت ضدباکتریایی و ضدقارچی بودند(۲۸). این یافته با نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر تا حدی تشابه دارد چرا که *Streptomyces flavidofuscus* strain HBUM1740 جدا شده قادر به تولید متابولیتی با خاصیت ضد باکتریایی و ضدفارچی(*کاندیدا آلبیکنز*) بود.

نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر سه سویه اکتینومایست‌ها با پتانسیل تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی را معرفی نمود که این سه سویه شامل *استرپتومایسس فلاویدوفوسکوس* سوش HBUM17405، *نوکاردیوپسیس داسونویلی* زیر گروه داسونویلی سوش OK-22 و *اکتینومایست* سوش Nd28 بوده است.

این در حالی است که ماریاس و همکاران سه سویه استرپتومیسس جدا نمودند که توانایی تولید متابولیت ضدباکتریی را داشتند(۲۹).

نتایج به دست آمده از تعیین ساختار متابولیت‌های ضدمیکروبی، بهترین حلال را برای جداسازی متانول ارزیابی نمود. از نظر ساختار احتمالی این متابولیت‌ها بر اساس نتایج طیف‌سنجی مرئی فرابنفش و طیف‌سنجی جرمی وجود ترکیبات پروتئینی با گروه‌های کلرواستات، اتیل کلرواستات و ۴ کلرو ۳ هیدروکسی بوتیرونیتریت را تأیید نمود. آویلالا و همکاران اکتینومایست‌های جدا شده از خاک مناطق نمکی را گزارش کردند که تولید کننده متابولیت‌های ضدمیکروبی بودند که ساختاری پروتئینی جدیدی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند(۳۰). بر اساس یافته‌های این تحقیق متابولیت‌های ضدمیکروبی جدید به وسیله اکتینومایست‌های نمک دوست تولید می‌شود که برای استفاده آنها در درمان عفونت ها نیاز به آزمون های درون تنی می باشد که در دیگر تحقیقات می باید گنجانده شود.

نتیجه‌گیری

به طور کل یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که اکتینومیست‌های گوناگون در مناطق مختلف نمکی ایران وجود دارد که قادر به تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی گوناگونی می‌باشند. ساختارهای گوناگون

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019

متابولیت‌های ضدمیکروبی می‌تواند بر اساس اقلیم‌های مختلف متفاوت باشد. متابولیت‌های ضدمیکروبی جداشده در تحقیق حاضر طیف اثر ضدمیکروبی متقاوتی داشتند که به احتمال زیاد به ساختارهای متفاوت آنها با ترکیباتی شبیه به آنتی‌بیوتیک‌های پپتیدی است وابسته می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله بر گرفته از پایان نامه دوره دکترای رشته میکروبیولوژی با کد اخلاق 00000002-8463-1808 دانشگاه آزاد اسلامی کرج می‌باشد، که با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019

REFERENCES

1.Ningthoujam DS, Sanasam S, Nimaichand S, Sanjenbam P. Screening and optimization studies of native anticandidal actinomycetes from Manipur (Indo-Burma Biodiversity Hotspot), India. Proceedings of the 15th International Symposium on the Biology of Actinomycetes(ISBA15). Shanghai Jiaotong University, Shanghai 2009; 3: 20-5.
2.Mageshwaran V, Walia S, Govindasamy V. Antibacterial activity of metabolite produced by Paenibacillus polymyxa strain HKA-15 against Xanthomonas campestrispv. Phaseoli Indian Journal of Experimental Biology 2011; 49: 229-33.
3.Shouvik S, Pranab R, Sutanu S. Actinomycetes from hospital dump soil produce highly activity antibiotic. International Journal of Microbiology Research 2012; 4(6): 258.
4.Aghamirian MR, Ghiasian SA. Isolation and characterization of medically important aerobic Actinomycetes in soil of Iran. Open Microbiology Journal 2009; 3: 53-7.
5.Bharti A, Kumar V, Gusain O, Singh Bisht G. Antifungal activity of Actinomycetes isolated from Garhwal region. Journal of Science Engg 2010; 2(2): 3-9.
6.Radhakrishnan M, Balaguruathan R, Selvakumar N, Doble M, Kumar V. Bioprospecting of marine derived Actinomycetes with special reference to anti mycobacterial activity. Indian Journal of Geo Marine Sciences 2011; 40 (3): 407-10.
7.Gontang EA, Fenical W, Jensen PR. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. Applied Environment Microbiology 2007; 73: 3272-82.
8.Jang HD, Chang KS. Thermostable cellulases from Streptomyces sp: scale-up production in a 50-l fermenter. Bio Technology Letters 2005; 27(4): 239–42.
9.Monisha K, Renu S, Rup L. Selective Isolation of rare Actinomycetes producing novel Antimicrobial Compounds. J Adv Bio Technol Res 2011; 2(3): 357-75.
10.Bhattacharya D, Nagpure A, Gupta RK. Bacterial chitinases: properties and potential. Critical Reviews in Biotechnology 2007; 27(1): 21–8.
11.Dehnad AR, Parsa YR, Bakhshi R, Mokhtarzadeh A, Soofiani SA, Monadi AR. Investigation antibacterial activity of Streptomyces's isolates from soil samples from west of Iran. African Journal of Microbiology Research 2010; 4: 1685-93.
12.Dhananjeyan V, Selvan N, Dhanapal K. Isolation, characterization, screening and antibiotic sensitivity of Actinomycetes from locally (Near MCAS) collected soil sample. J Biol Sci 2010; 10: 514-9.
13.Nanjwade BK, Chandrashekhara S, Shamarez AM, Goudanavar PS, Manvi FV. Isolation and morphological characterization of antibiotic producing Actinomycetes. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 2010; 9: 231-6.
14.Tian SH, Yang Y, Liu K, Xiong Z, Xu L, Zhao L. Antimicrobial metabolites from a novel halophilic Actinomycete nocardiopsis YIM 90022. Natural Product Research 2013; 28(5): 344-6.
15.Citarasu T, Velmurugan S, Raman K, Thanga Viji V, Donio M BS, Adlin Jenifer J, et al. Screening and characterization of antimicrobial secondary metabolites from Halomonas salifodinae MPM-TC and it's in vivo antiviral influence on Indian white shrimp Fenneropenaeusindicus against WSSV challenge. Journal of King Saud University Science 2013; 25: 181–90.
16.Ningthoujam D, Sanasam S, Nimaichand SA. Streptomyces sindenensis strain LS1-128 exhibiting broad spectrum antimicrobial activity. Res J Biol Sci 2009; 4: 1085–91.
17.Maskey RP, Helmke E,Laatsch H. Himalomycin A and B: Isolation and structure elucidation of new fridamycin type antibiotics from a marine Streptomyces isolate. J Anti Biot 2003; 56(11): 942-9.
18.Bamzadeh Z, Baserisalehi M, Bahador N, Hejazi S H. Screening of soil Streptomyces and characterization of their bioactive compounds. Health MED 2013; 7(80): 2292-300.
19.Dhanasekaran D, Rajakumar G, Sivamani P, Selvamani S, Panneerselvam A, Thajuddin N. Screening of salt pans Actinomycetes for antibacterial agents. Internet J Micro Biol 2005; 1: 2.
20.Augustine SK, Bhavsar SP, Kapadnis BP. A non-polyene antifungal antibiotic from Streptomyces albidoflavus PU 23. Indian Academy of Sciences 2005; 30: 201–11.
21. Muhanned AK, Ameer IA, Imad HH, Mohammed AJ. A new polymorphic positions is covered in mitochondrial DNA hypervariable region hviii from central and north-central of Iraq. Mitochondrial DNA 2015; 23: 1-5.
22.Basik M, Mousses S, Trent J. Integration of genomic technologies for accelerated cancer drug development. Biotechniques 2003; 35: 580-6.

www.SID.ir

Archive of SID

23.Eccleston GP, Brooks PR, Ipek Kurtböke D. The occurrence of bioactive Micro monosporae in aquatic habitats of the Sunshine coast. health and education, university of the Sunshine coast maroochydore DC Qld4558. Australia 2008; 6: 243-61.
24.Saadoun I, Gharaibeh R. The streptomyces flora of Badia region of Jordan and its potential as a source of antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. Journal of Arid Environ 2003; 53: 365-71.
25.Mayuran S, Radhakrishnan M, Balagurunathan R. Antimicrobial pigments from desert soil Actinomycetes. Recent Trends in Microbial Biotechnology 2006; 35–51.
26.Furtado I, Velho-Pereira SH. Antibacterial activity of halophilic bacteria bionts from marine invertebrates of mandapam India. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences 2012; 74(4): 331-8.
27.Todkar S. Todkar R, Kowale L, Kamarkar K, Kulkarni A. Isolation and screening of antibiotic producing halophiles from Ratnagri coastal area, state of maharahstra. International Journal of Scientific and Research Publication 2012; 2(4): 1-3.
28.Djinni I, Kecha M, Souagui S, Benallaoua S. Antimicrobial activity of a moderate halophilic Actinomycete strain isolated from a saline soil in the region of bejaia. Extraction and partial characterization of the produced bioactive compounds. Environmental Engineering and Management Journal 2012; 11(3): 157.
29.Mariadhas VA, Thankappan SR, Naif AA, Veeramuthu D, Savarimuthu I, Paul A, et al. Nutritional requirements for the production of antimicrobial metabolites from Streptomyces. African Journal of Microbiology Research 2014; 8(8): 750-8.
30.Avilala J, Arthala PK, Buddolla V, Saigopal DVR, Golla N. Production of bioactive compounds by actinomycetes and their antioxidant properties. Biotechnology Research International 2014; 217030: 8.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019

www.SID.ir

Arc

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019

Characterization of Antimicrobial Metabolites Produced by Halophilic *Actinomyces* Isolated from Aran-Bidgol and Maharloo lakes

Nasri MR[1], Baserisalehi M[2*], Kurdtabar M[3]

[1]Deparment of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran,[2]Deparment of Microbiology, Kazeroun Branch, Islamic Azad University, Kazeroun, Iran,[3]Deparment of Chemistry, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Received: 09 Dec 2018 Accepted: 14 May 2019

Abstract

Background & aim: One of the problems encountered in the treatment of infectious diseases today is the presence of antibiotic-resistant microorganisms. Therefore, the discovery of new sources for the production of biologically active compounds with antimicrobial properties can serve enormously in the treatment of infectious diseases and in the reduction of resistant multidrug-resistant microorganisms. The aim of this study was to determine and evaluate antimicrobial metabolites produced by salt-loving actinomycetes isolated from Aran, Bidgol and Maharloo lakes.

Methods: This descriptive cross-sectional study was done in1396 and 51 halophilic actinomyces were isolated from 115 sediment and water samples of Aran Bidgol and Maharloo Lakes. All isolates subjected to antimicrobial metabolite activity assay.To isolate antimicrobial metabolites producing Actinomyces, culture supernatant of 51 halophilic Actinnomyces isolates were assessed against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* using Well Diffusion Agar (WDA) method. Then the promising strains were athenticated 16S rRNA gene sequencing. Optimization of antimicrobial metabolite production was carried out by different temperatures, pHs, carbon nitrogen sources and the best phase of metabolite production and solvent for purification was dtertermined. Finally, possible structure of bioactive compounds was determined using UV-visible and mass spectrometry methods.

Results: Out of 51strains of halophilic Actinomyces isolates, three strains indicated potent activity for the production of antimicrobial metabolites. *Bacillus cereus, Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* were sensitive to all and *E. coli* and *pseudomonas aeruginosa* were resistance to the bioactive compounds. Molecular identification of the antimicrobial metabolites producing strains recognized them as *Streptomyces sp.* Ahbb4, *Streptomyces flavidofuscus* strain HBUM1740 and *Actinomycete* Nd28. Optimal temperature and pH were 27℃, 8 respectively and the best C and N-sources were fructose, xylose and yeast extract and peptone. In addition, the best solvents for all bioactive compounds were methanol and xylene. The results obtained from UV-visible and GC mass spectrometry assay suggested the peptide nature of all compounds with chloroacetate, ethylcholoroacetate and 4 chloro 3 hydroxybutyronitrite groups.

Conclusion: According to the findings of the present study, new antimicrobial metabolites are produced by salt-loving actinomycetes, which require in vivo tests to be used for the treatment of infections, which should be included in other research.

Keywords: Halophilic Actinomyces, Antimicrobial metabolites, Biostructres.

[*]**Corresponding Author: Baserisalehi M**, Deparment of Microbiology, Kazeroun Branch, Islamic Azad University, Kazeroun, Iran
Email: majidbaseri@hotmail.com

Please cite this article as follows:
Nasri MR, Baserisalehi M, Kurdtabar M. Characterization of Antimicrobial Metabolites Produced by Halophilic *Actinomyces* Isolated from Aran-Bidgol and Maharloo lakes. Armaghane-danesh 2019; 24(3): 373-387

www.SID.ir