Archive of SID

جداسازی، شناسایی و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اکتینومایست‌ها از رسوبات دریایی خلیج فارس در محدوده استان هرمزگان

محسن گذری*[۱]، محمد صدیق مرتضوی[۱]، رامین کریم زاده[۱]، محمود ابراهیمی[۱]، رضا دهقانی[۱]

*M_gozari@yahoo.com

۱- پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان ، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات ، آموزش و ترویج کشاورزی

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹٤

چکیده

اکتینومایست‌ها باکتریهای گرم مثبت ، رشته ای و مولد بخش عمده ترکیبات زیست فعال می باشند. این پژوهش با هدف جداسازی و شناسایی اکتینومایست¬های مولد آنتی بیوتیک از رسوبات دریایی خلیج فارس در محدوده استان هرمزگان انجام شد. از میان ۳ محیط کشت منتخب محیط کشت M۱ با جداسازی ۳۲ ایزوله بیشترین کارایی را نشان داد. تیمار حرارتی ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه با جداسازی ۲۶ ایزوله بهترین نتیجه را ارائه نمود. در کل حدود ۶۰ ایزوله اکتینومایست از ۱۰ نمونه رسوب جداسازی شد. بررسی فعالیت ضد میکروبی ایزوله های بدست آمده نشان داد بترتیب ۳۳،۲۰ و ۳۰ درصد ایزوله ها در مقابل *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Candida albicans* فعالیت ضد میکروبی ارائه نمودند. مطالعات شناسایی مورفولوژیک، بیوشیمیایی ، فیزیولوژیک و کموتاکسونومیک روی ایزوله های منتخب شامل ۱۲ Ifro، Ifro 33 و۴۷ Ifro بیانگر تعلق آنها به جنس Streptomyces بود. مطالعات ژنتیک ملکولی بر اساس آنالیز ژن s rRNA۱۶ نشان داد ایزوله های ۱۲ Ifro، 33 Ifro و ۴۷ Ifro دارای ۹۹ درصد تشابه بترتیب با سویه های *S.olivaceus*، *S.cacaoi* و *S.variabilis* بودند. آنالیز فیلوژنتیک بیانگر اشتقاق ایزوله های ۱۲ Ifro و47 Ifro از یک جد مشترک بود. نتایج این مطالعه نشان داد ایزوله های منتخب می توانند کاندیدای نویدبخشی برای تحقیقات اکتشاف آنتی بیوتیک های جدید باشند.

لغات کلیدی : اکتینومایست‌های دریایی , فعالیت ضد میکروبی , رسوبات دریایی , خلیج فارس

*نویسنده مسئول

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

اکتینومایست‌ها گروهی از باکتریهای گرم مثبت می باشند که در میان پروکاریوت ها دارای جایگاه متمایزی بوده و کاربردهای منحصر به فردی در زیست فناوری دارند. این باکتریها با تولید متابولیت های مختلف تنوع فیزیولوژیک بالایی را ارائه می نمایند(Dworkin *et al*., 2006). تقریبا نیمی از متابولیت های زیست فعال کشف شده، به ویژه آنتی بیوتیک ها، عوامل ضد تومور، عوامل تعدیل کننده سیستم ایمنی و آنزیم ها توسط اکتینومایست‌ها تولید شده اند (Manivasagan *et al*., 2013). جنس های *Streptomyces*، *Amycolatopsis*، *Saccharopolyspora* ، *Micromonospora* و *Actinoplanes* تولید کنندگان عمده ملکولهای زیستی مهم تجاری می باشند(Solanki *et al*., 2008). سالیانه تنها از فروش آنتی بیوتیک های بدست آمده از استرپتومایسس ها ۲۵/۳ میلیارد دلار سود نصیب شرکتهای داروسازی می شود(Hranueli *et al*., 2005). با کاهش قابل ملاحظه در سیر اکتشاف ترکیبات زیست فعال مهم از اکتینومایست‌ها خاکزی لزوم گسترش مطالعات در زمینه جداسازی از سایر منابع از جمله دریاها احساس گردید (Zotchev, 2012). دریاها حدود ۷۰ درصد سطح کره زمین را پوشانده و با توجه به پیچیدگی و تنوع بالای زیستگاه ها و شرایط محیطی متفاوت از جمله فشار، شوری ، دما ، pH، مواد مغذی و نورخوشید منابع بکری برای ارگانیسم های مولد داروهای جدید می باشند. سطح بالای تنوع زیستی ارگانیسم های دریایی و سازش شیمیایی با شرایط محیطی باعث ایجاد تنوع ژنتیک و متابولیک از جمله ایجاد مسیرهای بیوسنتزی جدید و تولید متابولیت های ثانویه با ساختارهای منحصر به فرد گردیده است(Molinski *et al*., 2009) . بنابراین برآورد می شود که اکتینومایست‌های دریایی نیز با ویژگیهای متفاوت از انواع خاکزی خود انواع متنوعی از ترکیبات زیست فعال را تولید نمایند. علیرغم این تنوع زیستی در محیط دریایی تحقیق در زمینه فراورده های طبیعی دریایی هنوز در مرحله ابتدایی خویش قرار دارد و در مقایسه با زیستگاه های موجود در خشکی بررسی نشده باقی مانده است(Jensen *et al*., 2005). با توجه به شیوع میکروارگانیسم های بیماریزای مقاوم به آنتی بیوتیک اکتشاف آنتی بیوتیک های جدید بیش از همیشه ضروری می نماید(Payne *et al*., 2006). این پژوهش با هدف دستیابی به سویه های اکتینومایست مولد ترکیبات ضد میکروبی از رسوبات خلیج فارس در محدوده استان هرمزگان و ارزیابی پتانسیل فعالیت ضد میکروبی جوامع اکتینومایست‌ها این منطقه انجام گردید.

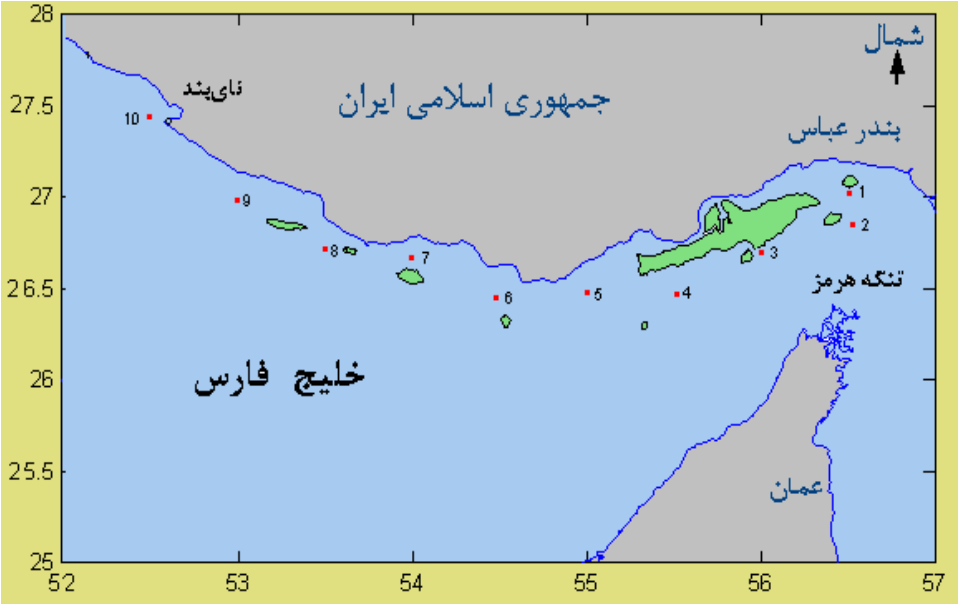
مواد و روش کار

نمونه برداری و آماده سازی رسوبات دریایی

نمونه های رسوبات دریایی در بهمن ماه ۱۳۸۸ از ۱۰ ایستگاه تعیین شده در خلیج فارس در قلمرو آبهای استان هرمزگان جمع آوری شد(جدول ۱). جهت نمونه برداری از یک دستگاه نمونه بردار رسوبات سطحی (Grab Van Veen sampler) ساخت شرکت هیدروبیوس آلمان با سطح مقطع ۰/۱ متر مربع استفاده گردید. در کلیه ایستگاه ها پس از اتمام عملیات نمونه برداری، بلافاصله محتویات رسوب داخل Grab به درون بطری های شیشه ای استریل منتقل و سپس در داخل یخچال با دمای حدود ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید و پس از اتمام گشت دریایی کلیه نمونه‌ها جهت بررسی به آزمایشگاه انتقال داده شد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: موقعیت جغرافیایی ایستگاه های نمونه برداری شده در خلیج فارس

پیش تیمارهای حرارتی

نمونه های رسوب در شرایط سترون در پلیت های شیشه ای ریخته شد و در دماهای ۱۰۰، ۱۱۰و ۱۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه قرار داده شد (Bredholdt, 2008).

جداسازی اکتینومایست‌ها

بدنبال رقیق سازی ۰/۲ میلی لیتر از هرنمونه در محیط های نوترینت آگار M_1، حاوی (٪۱ نشاسته، ٪۰/۱ کازئین، ٪ ۰/۰۱ عناصر کمیاب، ٪ ۱/۶ آگار اضافه شده به ٪ ۷۵ آب دریا فیلتر شده و ٪ ۲۵ آب مقطر) و M_2 حاوی (٪ ۰/۲۵نشاسته، ٪۰/۱ پپتون، ٪ ۰/۰۵ عصاره مخمر، ٪ ۰/۰۱ گلیسروفسفات، ٪ ۱/۶ آگار اضافه شده به ٪ ۷۵ آب دریا فیلتر شده و٪ ۲۵ آب مقطر) کشت داده شد محیط های کشت تا چهار هفته در دمای ۲۸ °C گرماگذاری شدند (Jensen *et al.*, 1991).

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ایزوله های اکتینومایست

اثر ایزوله های خالص شده اکتینومایست در مقابل سویه های *Escherichia coli* PTCC 1276 ,*Staphylococcus aureus* PTCC 1112, *Candida albicans* PTCC 5027 با استفاده از روش های آگار دولایه (Fguira *et al.*, 2005) و انتشار از چاهک (Magaldi *et al.*, 2004) مورد ارزیابی قرار گرفت و قطر هاله ممانعت از رشد پس از انجام ۳ تکرار ثبت شد.

شناسایی ایزوله های مولد ترکیب ضد میکروبی

ویژگی‌های مورفولوژیک ایزوله های مولد شامل شکل میسلیوم ها، رنگ میسلیوم رویشی و هوایی ، میزان رشد و تشکیل اسپور در محیط های International (ISP) Streptomyces project مورد ارزیابی قرار گرفت. خصوصیات بیوشیمیایی ایزوله های منتخب شامل مصرف منابع کربن مختلف انجام شد. همچنین ویژگیهای فیزیولوژیک شامل تولید پیگمان و رشد در دماهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. شناسایی نوع ایزومر دی آمینو پایمیلیک اسید(DAP) دیواره سلولی با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک انجام شد (Whitman *et*

www.SID.ir

Archive of SID

(*al*., 2012). شناسایی ژنتیکی ایزوله های مولد بر اساس آنالیز توالی ژن16s rRNA صورت گرفت. بدین منظور DNA ژنومی نمونه های مورد نظر با استفاده از روش Ezaki استخراج گردید(Ezaki *et al*., 1990). بدنبال آن ژن 16s rRNA توسط واکنش PCR تکثیر گردید. تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن 16s rRNA ایزوله‌های موردنظر باروش Sanger انجام شد.

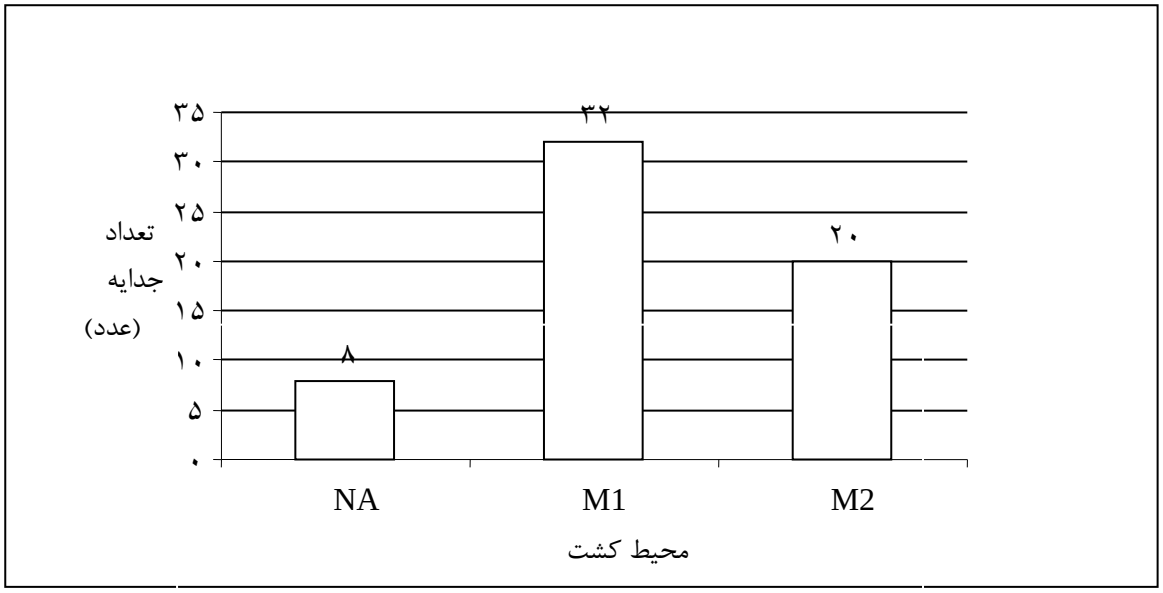
آنالیز فیلوژنتیک ایزوله های منتخب

به منظور ارزیابی کیفیت توالی ژن16s rRNA سویه‌های منتخب از نرم افزار DNA BASER Sequence Assembler 4.10 استفاده شد. سپس توالی های بدست آمده در مقابل توالی‌های ژن 16s rRNAسایر سویه های موجود در بانک ژن NCBI بوسیله نرم افزار Megablast مورد مقایسه قرار گرفت(Zhang *et al*., 2000). آنالیز فیلوژنتیک ایزوله های منتخب با استفاده از نرم افزار MEGA6 انجام شد و درخت فیلوژنتیک بر اساس روش neighbor-joining رسم گردید (Tamura *et a.l*, 2013).

نتایج

جداسازی اکتینومایست‌ها

نتایج نشان داد محیط کشت M_1 با جداسازی ۳۲ ایزوله بیشترین کارایی را ارائه نمود پس از آن محیطهای کشت M_2 و نوترینت آگار بیشترین تعداد ایزوله را جداسازی نمودند (شکل ۲)



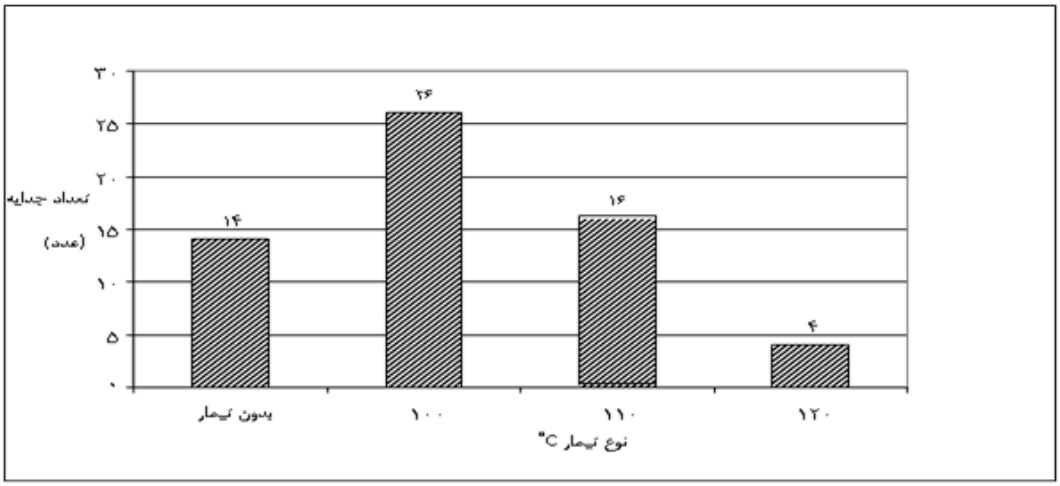
شکل ۲: میزان جداسازی اکتینومایست‌ها در محیط کشت های مختلف

بررسی اثر چند تیمار حرارتی بر جداسازی اکتینومایست‌ها

نتایج بیانگر بیشترین تاثیر تیمار C ۱۰۰° با جداسازی ۲۶ ایزوله اکتینومایست بود. تیمار حرارتی C ۱۱۰° و C ° ۱۲۰ بترتیب با جدا نمودن ۱۶ و ۴ ایزوله در مرتبه بعدی قرار گرفتند (شکل ۳).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳: ارزیابی تاثیر تیمارهای فیزیکی بر جداسازی اکتینومایست‌ها

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی ایزوله های اکتینومایست

پس از غربالگری ۶۰ ایزوله اکتینومایست جداسازی شده ۲۰ ایزوله در مقابل *S.aureus* ، ۱۲ ایزوله در مقابل *E.coli* و ۱۸ ایزوله در مقابل *C.albicans* فعالیت ضد میکروبی نشان دادند. از این میان ایزوله های Ifro 12 ،Ifro 33 وIfro 47 هاله های ممانعت از رشد با قطر بیش از ۳۰ mm در مقابل*S.aureus* و هاله ممانعت از رشد بین ۳۰-۲۰ میلی متر در مقابل *E.coli* ایجاد کردند و ایزوله Ifro ۱۲ در مقابل *C.albicans* هاله ممانعت از رشد با قطر بیش از ۳۰ mm تولید کرد در حالیکه ایزوله های Ifro ۳۳ و Ifro ۴۷ در مقابل *C.albicans* هاله ممانعت از رشد بین ۳۰-۲۰ میلی متر ایجاد نمودند (جدول ۲). سنجش فعالیت ضد میکروبی ایزوله های مولد با روش انتشار از آگار بیانگر تولید و ترشح متابولیت های ثانویه ضد میکروبی توسط اکثر سویه های مولد بود(جدول ۳).

جدول ۲: فعالیت ضد میکروبی ایزوله های اکتینومایست استفاده از روش آگار دو لایه

نام ایزوله	قطر هاله ممانعت از رشد		
	S.aureus	*E.coli*	*C.albicans*
Ifro 1	+	-	+
Ifro 3	+	+	+
Ifro 7	+++	++	++
Ifro 10	++	++	++
Ifro 12	++++	+++	++++
Ifro 13	++	-	++
Ifro 14	++	++	++
Ifro 22	+++	++	++
Ifro 24	+	-	+
Ifro 28	++	-	-
Ifro 30	++	-	++
Ifro 33	++++	+++	+++
Ifro 39	++	+	++
Ifro 42	++	+	++
Ifro 47	++++	+++	+++
Ifro 49	+	-	-
Ifro 50	-	-	+
Ifro 51	++	++	++
Ifro 54	++	+	++
Ifro 55	+	-	+

قطرهاله ممانعت از رشد : + < ۱۰ mm , ++ = ۱۰-۲۰ mm ,+++ = ۲۰-۳۰ mm , ++++ > ۳۰ mm

www.SID.ir

Archive of SID

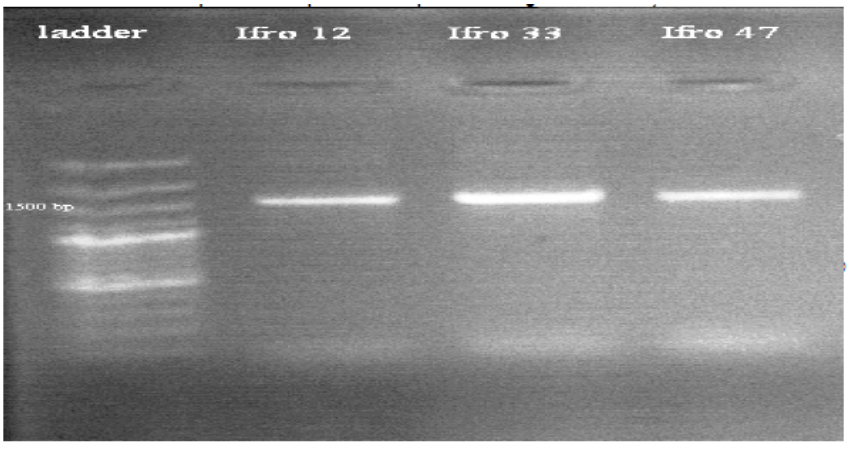
جدول ۳: فعالیت ضد میکروبی ایزوله های اکتینومایست با استفاده از روش انتشار از چاهک

قطر هاله ممانعت از رشد (mm)			نام ایزوله
C.albicans	*E.coli*	*S.aureus*	
12	10	15	Ifro 7
12	9	15	Ifro 10
27	20	32	Ifro 12
13	10	16	Ifro 14
10	11	14	Ifro 22
0	0	16	Ifro 28
10	0	11	Ifro 30
30	17	35	Ifro 33
12	0	16	Ifro 39
15	0	13	Ifro 42
24	15	31	Ifro 47
12	12	16	Ifro 51
13	0	14	Ifro 54

شناسایی ایزوله های مولد

با توجه به میزان فعالیت ضد میکروبی ایزوله های 12 Ifro 33، Ifro و47 Ifro جهت شناسایی اولیه انتخاب شدند. مطالعات مورفولوژیک نشان داد هر سه ایزوله دارای میسلیوم هوایی منشعب بودند. آرایش میسلیوم هوایی در ایزوله های Ifro 12 و Ifro 33 بصورت فنری و در ایزوله Ifro 47 بصورت حلقوی باز بود. خصوصیات رشدی ایزوله ها روی محیط های ISP و برخی ویژگی های فیزیولوژیک، بیوشیمیایی در جدول ۴ ارائه گردید. بررسی کموتاکسونومیک نوع ایزومر دی آمینو پایمیلیک اسید دیواره سلولی هر سه ایزوله را از نوع LL تعیین نمود.

شناسایی ژنتیکی ایزوله های مولد پس از استخراج DNA و انجام واکنش PCR منجر به تکثیر ژن 16s rRNA با طول ۱۵۰۰ جفت باز گردید(شکل ۴). نتایج حاصل از تطابق ژن 16s rRNA ایزوله های مولد با نمونه های موجود در بانک ژن NCBI بیانگر بیشترین تشابه ایزوله های Ifro 12 ، Ifro 33 و Ifro 47 بترتیب با *Streptomyces olivaceus* strain NBRC 12805 ، *Streptomyces cacaoi* strain NBRC 12748 و *Streptomyces variabilis* strain NRRL B-3984 به میزان ۹۹ درصد بود(جدول ۵).



شکل ۴: ژن 16s rRNA سویه های مولد منتخب تکثیر شده با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR)

www.SID.ir

Archive of SID

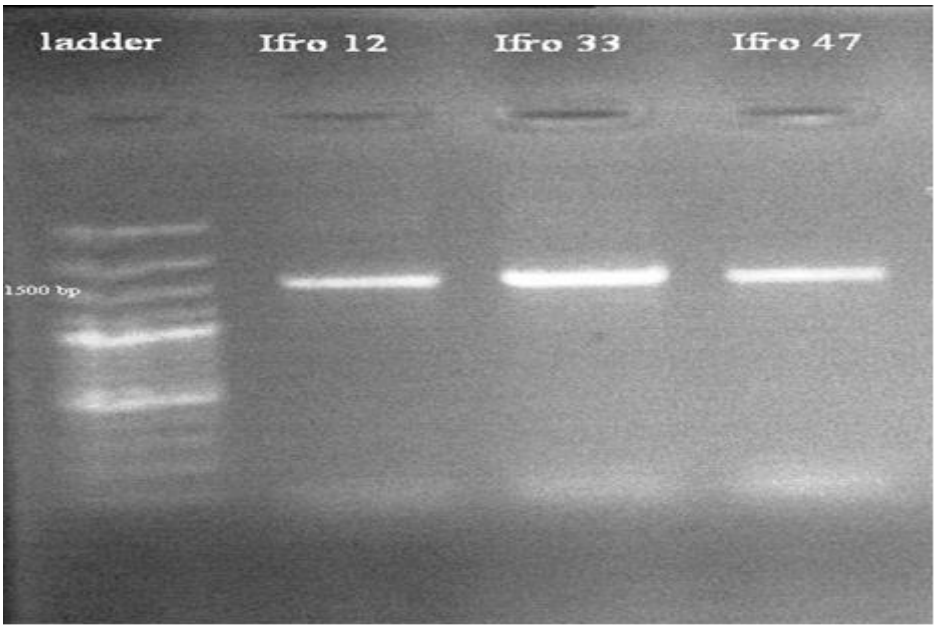
جدول ۴: ویژگی های مورفولوژیک، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و کموتاکسونومیک ایزوله های مولد منتخب

مشخصه		Ifro 12	Ifro 33	Ifro 47
بررسی رنگ میسیلیوم	هوایی	C	GR	W
	رویشی	C	GR	W
رشد و تولید اسپور در محیط های	ISP II	G	G	G
	ISP III	G	G	G
	ISP IV	G	L	G
	ISP V	G	G	G
	ISP VI	G	L	G
	ISP VII	G	G	L
	CDA	L	L	L
	BA	L	G	L
	NA	G	G	G
مصرف منابع کربن	گلوکز	+	+	+
	فروکتوز	+	+	+
	زایلوز	+	+	+
	آرابینوز	+	+	+
	رامنوز	+	-	+
	سوکروز	-	-	-
	رافینوز	-	-	-
تولید پیگمان ملانوئیدی		_	+	+
تولید پیگمان غیر ملانوئیدی		_	+	_
محدوده دمای رشد	۴	_	_	_
	۲۰	+	+	+
	۳۰	+	+	+
	۳۵	+	+	+
	۴۵	_	_	+
نوع ایزومر DAP		L L	L L	L L

رشد و تولید اسپور: خوب: G کم: L رنگ کلونی: کرم: C خاکستری: GR سفید: W

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴: ژن 16s rRNA سویه های مولد منتخب تکثیر شده با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR)

جدول ۵: تطابق توالی ژن 16s rRNA سویه های مولد منتخب با نزدیک ترین سویه های موجود در بانک ژن NCBI

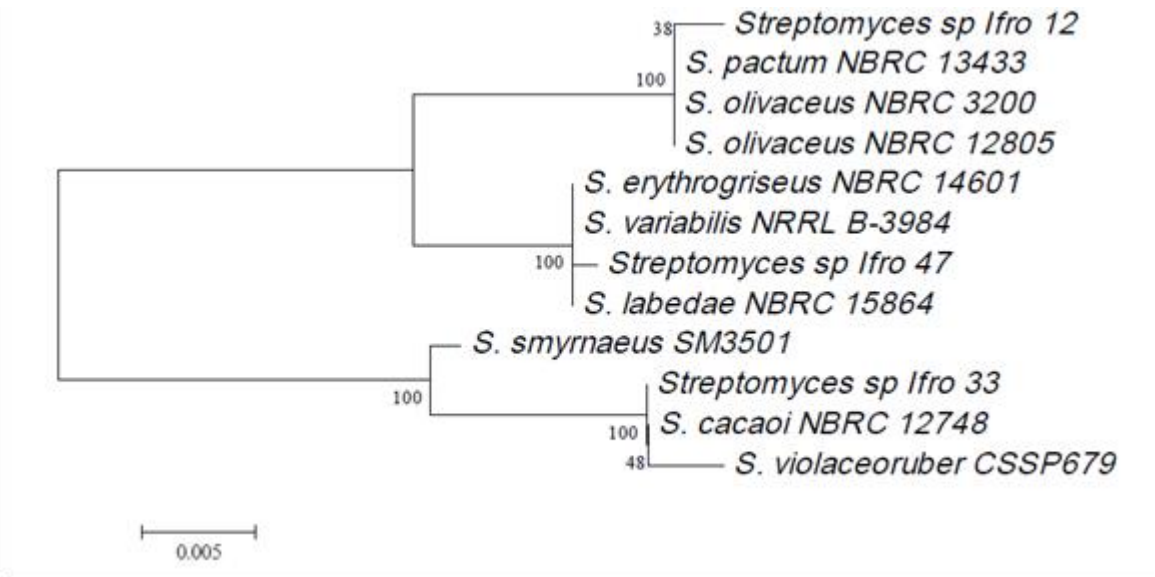
Isolate	closest strains	Max score	Total score	Query coverage	E value	Ident	Accession
Ifro 12	*Streptomyces olivaceus* strain NBRC 12805	1707	1707	100%	0.0	99%	NR_112581.1
	Streptomyces olivaceus strain NBRC 3200	1707	1707	100%	0.0	99%	NR_041202.1
	Streptomyces pactum strain NBRC 13433	1707	1707	100%	0.0	99%	NR_041134.1
Ifro 33	*Streptomyces cacaoi* strain NBRC 12748	1788	1788	100%	0.0	99%	NR_041061.1
	Streptomyces violaceoruber strain CSSP679	1759	1759	100%	0.0	99%	NR_115407.1
	Streptomyces smyrnaeus strain SM3501	1727	1727	99%	0.0	99%	NR_134201.1
Ifro 47	*Streptomyces variabilis* strain NRRL B-3984	1821	1821	99%	0.0	99%	NR_043840.1
	Streptomyces labedae strain NBRC 15864	1821	1821	99%	0.0	99%	NR_041192.1
	Streptomyces erythrogriseus strain NBRC 14601	1821	1821	99%	0.0	99%	NR_112438.1

آنالیز فیلوژنتیک ایزوله های منتخب

آنالیز فیلوژنتیک ایزوله های مولد منتخب با نزدیک ترین سویه ها بر اساس روش Neighbor-joining نشان داد اختلاف تکاملی بین ایزوله های منتخب مولد وجود دارد بطوریکه در سه کلاستر متفاوت قرار گرفتند. بررسی درخت فیلوژنتیک بیانگر اشتقاق ایزوله های Ifro 12 و Ifro 47 از یک جد مشترک بود در صورتیکه ایزوله Ifro 33 به دودمان جداگانه ای تعلق داشت (شکل ۵).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵: درخت فیلوژنتیک رسم شده بر اساس آنالیز ژن 16s rRNA بدست آمده از فاصله تکاملی ایزوله های منتخب با نزدیکترین سویه ها بر اساس روش Neighbour-joining.

بحث

با توجه به توسعه روشهای بیولوژی ملکولی و ژنومیکس مطالعات اکتشاف ترکیبات طبیعی با منشاء میکروبی از زیستگاههای دریایی هنوز در ابتدای مسیر خود قرار دارد. برای اولین بار در این تحقیق رسوبات خلیج فارس به عنوان منبع جداسازی اکتینومایست‌ها مورد بررسی قرار گرفت. انتخاب محیط کشت نقش مهمی در جداسازی اکتینومایست‌ها ایفا نموده و می تواند بصورت انتخابی یا غیر انتخابی باشد (Zucchi *et al.*, 2011). به منظور بالا بردن میزان جداسازی و افزایش تنوع از ۳ محیط کشت جداسازی غیر انتخابی استفاده شد که از میان آنها محیط کشت M_1 قابلیت بالاتری نسبت به دو محیط کشت دیگر در جداسازی اکتینومایست‌ها ارائه نمود. توانایی بهتر این محیط کشت در جداسازی اکتینومایست-ها می تواند به دلیل وجود عناصر معدنی و حداقل میزان ترکیبات آلی در این محیط کشت باشد که با نزدیکی به شرایط فیزیکوشیمیایی دریا امکان رشد باکتریهای سریع الرشد که باعث تداخل در فرایند جداسازی می شوند را کاهش داده است (Gartner *et al.*, 2011). سایر مطالعات نیز افزایش کارایی جداسازی اکتینوماست های دریایی در محیط های کشت با محتوای پایین مواد آلی را تایید کرده اند(Koch 2001). از میان تیمارهای حرارتی مورد استفاده تیمار $100^{\circ}C$ به مدت ۶۰ دقیقه بیشترین کارایی را در جداسازی اکتینومایست‌ها نشان داد. تیمار حرارتی با مهار عوامل مختل کننده از جمله رشد سایر باکتریهای غیر مرتبط و قارچهای موجود در نمونه رسوب میزان جداسازی اکتینومایست‌ها را ارتقا بخشید (Hames Kocabas & Uzel., 2012). در تیمارهای با دمای بالاتر از تعداد کلونی های اکتینومایست کاسته شد که می تواند به دلیل حضور اندک اکتینومایست‌های ترموفیل در نمونه های رسوب باشد. حضور اکتینومایست‌های ترموفیل به عنوان شاخص حضور گونه های خاکزی محسوب می شود(Pathom-aree *et al.*, 2006). این گونه ها احتمالا با جریان های ورودی مانند رودخانه ها به خلیج فارس وارد شده اند. بطور کلی میزان فعالیت ضد میکروبی ایزوله های بدست آمده در مقابل گونه های *S.aureus* ، *E.coli* و *C.albicans* با استفاده از روش آگار دولایه *بترتیب* ۳۳، ۲۰ و ۳۰ درصد ثبت گردید. این نتیجه با توجه به نفوذ پذیری بالاتر دیواره سلولی باکتریهای گرم مثبت نسبت به ترکیبات ضد میکروبی در مقایسه با

www.SID.ir

Archive of SID

باکتریهای گرم منفی قابل انتظار می باشد (Lambert, 2002). در یک مطالعه فعالیت ضد میکروبی اکتینومایست‌های جدا شده از خلیج بنگال ۲۴ درصد گزارش گردید (Kannabiran, 2009 & Suthindhiran). در تحقیق دیگری Ramesh و همکارانش میزان فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی اکتینومایست‌های جدا شده از خلیج بنگال را بترتیب ۵۳٪ و ۷۲ ٪ گزارش نمودند (Ramesh *et al*., 2009). در همین راستا ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اکتینومایست-های جدا شده از خلیج Otsuchi ۵۹ درصد گزارش شد (Imada *et al*., 2007). تفاوت میزان ایزوله های مولد در روش آگار دولایه با روش انتشار از آگار می تواند بدلیل اعمال سایر مکانیسم های بازدارندگی غیر از تولید آنتی بیوتیک توسط برخی ایزوله های اکتینومایست پیرامون کلونی خود باشد که امکان رشد میکروارگانیسم مورد آزمون را سلب نموده است. شناسایی ایزوله های مولد برتر بر اساس ویژگیهای مورفولوژیک، فیزیولوژیک و کمو تاکسونومیک بیانگر تعلق جدایه ها به جنس *Streptomyces* داشت. مطالعات مختلف حضور غالب جمعیت های *Streptomyces* را در رسوبات متعلق به دریاهای کم عمق همچون خلیج فارس تایید نموده اند (Kokare *et al*., 2004, Fiedler *et al*., 2005).

با توجه به پیچیدگی و تنوع گسترده جنس *Streptomyces* آنالیز فیلوژنتیک اعضای آن از اهمیت فوق العاده ای برخوردار می باشد (Mitra *et al*., 2010). آنالیز فیلوژنتیک بر اساس توالی ژن 16s rRNA بیانگر اختلاف تکاملی بین ایزوله های منتخب مولد بود(شکل ۵). بررسی دقیق تر نشان داد اگرچه ایزوله های Ifro 12 و Ifro 47 با نزدیک ترین سویه های خود در یک کلاستر قرار گرفته اند اما قدمت تکاملی نسبتا کمتری دارند. مطالعه پتانسیل بیوتکنولوژیک سویه های موجود در هر کلاستر نشان داد ایزوله Ifro 12 با *Streptomyces pactum* strain NBRC 13433 مولد آنتی بیوتیک Pactamycin و *Streptomyces pactum* strain NBRC 13433 مولد آنتی بیوتیک Elloramycin در یک کلاستر قرار گرفت (Ramos *et al*., 2008; Hirayama *et al*., 2013). همچنین ایزوله Ifro 33 با *Streptomyces cacaoi* strain NBRC 12748 مولد آنتی بیوتیک های Polyoxins و Ifro 47 با *Streptomyces erythrogriseus* strain NBRC 14601 مولد آنتی بیوتیک Erygrisin در یک کلاستر قرار گرفتند (Shunji *et al*., 1976). نزدیکی ایزوله های جدا شده در مطالعه حاضر با سویه های مولد آنتی بیوتیک های تجاری می تواند بیانگر پتانسیل بالای رسوبات منطقه مورد بررسی در خلیج فارس باشد. بنابر نتایج بدست آمده از این پژوهش می توان نتیجه گیری نمود که رسوبات دریایی خلیج فارس منبع با ارزشی برای اکتشاف فراورده های طبیعی دریایی می باشند. همچنین ایزوله های مولد Ifro 12 ، Ifro 33 و Ifro 47 می توانند به عنوان کاندیدای مناسبی جهت مطالعات تکمیلی اکتشاف آنتی بیوتیک مطرح گردند.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر از پروژه مصوب موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور با عنوان "بررسی فعالیت ضد میکروبی اکتینومایست های جداشده از رسوبات دریایی خلیج فارس در محدوده استان هرمزگان" استخراج گردیده است. این پروژه دارای فروست شماره ۹۰/۵۷۸ ازسازمان تحقیقات،آموزش وترویج کشاورزی می باشد.

منابع

Bredholdt, H., Tjaervik, E., Johnsen, G. and Zotchev, S.B., 2008. Actinomycetes from sediments in the Trondheim fjord,Norway: diversity and biological activity.Marine Drugs, 6: 12–24.

Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, Schleifer., K.H. and Stackebrandt, E., 2006. The Prokaryotes: Volume 3,. Springer-Verlag, New York, NY.

Ezaki, T., Hashimoto, Y., Yamamoto, H., Lucida, M.L., Liu, S., Kusunoki, S., Asano, K. and Yabuuchi, E., 1990,

www.SID.ir

Archive of SID

method for rapid identification of Legionella species. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease, 9: 213–217.

Fguira, L.F.B, Fotso, S, Mehdi, R.B.A., Mellouli, L. and Laatsch, H., 2005. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated Streptomyces sp. strain US80, Research in Microbiology, 156: 341–347.

Fiedler, H.P., Bruntner, C., Bull, A.T., Ward, A.C., Goodfellow, M., Potterat, O., Puder, C. and Mihm, G., 2005. Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. Antonie Van Leeuwenhoek, 87: 37–42.

Gartner, A., Blumel, M., Wiese, J. and Imhoff, J.F., 2011. Isolation and characterisation of bacteria from the Eastern Mediterranean deep sea. Antonie Van Leeuwenhoek, 100:421-435.

Hames-Kocabas, E.E. and Uzel, A., 2012, Isolation strategies of marine-derived actinomycetes from sponge and sediment samples. Journal of Microbiological Methods, 88: 342-347.

Hirayama, A., Eguchi, T. and Kudo, F., 2013. A single PLP-dependent enzyme PctV catalyzes the transformation of 3-dehydroshikimate into 3-aminobenzoate in the biosynthesis of pactamycin. Chembiochem, 14: 119-203.

Hranueli, D., Cullum, J., Basrak, B., Goldstein, P. and Long, P.F., 2005. Plasticity of the *Streptomyces* genome-Evaluation of the microplate hybridiation evolution and engineering of new antibiotics. Current Medicinal Chemistry, 12: 1697-1704.

Imada, C., Koseki, N., Kamata, M., Kobayashi, T. and Hamada-Sato, N., 2007. Isolation and characterization of antibacterial substances produced by marine actinomycetes in the presence of seawater. Actinomycetologica, 21: 27–31.

Jensen, P.R., Dwight, R. and Fenical, W., 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments**,** Applied and Environmental Microbiology, 57: 1102–1108.

Jensen, P.R., Mincer, T.J., Williams, P.G. and Fenical, W., 2005. Marine actinomycete diversity and natural product discovery, Antonie van Leeuwenhoek, 87: 43-48.

Koch, A.L., 2001. Oligotrophs versus copiotrophs. Bioassays, 23: 657–661.

Kokare, C.R., Mahadik, K.R., Kadam, S.S. and Chopade, B.A., 2004. Isolation, characterization and antimicrobial activity of marine halophilic Actinopolyspora species AH1 from the west coast of India., Current Science, 86:593–597.

Lambert, P.A., 2002. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. Journal of Applied Microbiology, 92: 46S-54S.

Magaldi, S., Mata Essayag, S., Hartung de Capriles, C., Perez, C., Colella, M.T., Olaizola, C. and Ontiveros,

www.SID.ir

Archive of SID

Y., 2004. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. International Journal of Infectious Diseases, 8(1): 39-45.

Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K. and Kim, S.K., 2013. Marine actinobacterial metabolite. Current status and future perspectives. Microbiological Research, 168: 311–332.

Mitra, A., Pramanik, A., Santra, S. C., Sen, P. K. and Mukherjee, J., 2011.Phylogeny, phenotypic and nutritional characteristics of estuarine soil actinomycetes having broad-spectrum antimicrobial activity derived from an ecologically guided bioprospecting programme. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27: 1679-1688.

Molinski, T.F., Dalisay, D.S., Lievens, S.L. and Saludes, J.P., 2009. Drug development from marine natural products. Nature Reviews Drug Discovery., 8: 69–85.

Pathom-aree, W., Stach, J.E.M., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T. and Goodfellow, M., 2006. Diversity of actinomycete isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. Extremophiles, 10:181–189.

Payne, D.J., Gwynn, M.N., Holmes, D.J. and Pompliano, D.L., 2006. Drugs for bad bugs: confronting thechallenges of antibacterial discovery. Nature Reviews Drug Discovery, 6(1): 29–40.

Ramos, A., Lombo, F., Brana, A.F., Rohr, J., Mendez, C. and Salas, J.A., 2008. Biosynthesis of elloramycin in Streptomyces olivaceus requires glycosylation by enzymes encoded outside the aglycon cluster. Microbiology, 154: 781-8.

Ramesh, S. and Mathivanan, N., 2009. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25: 2103–2111

Shunji, F. and Kiyoshi, I., 1976. Biosynthesis of the Polyoxins, Nucleoside Peptide Antibiotics: Formation of 5-Carboxyuracil Nucleosides by Streptomyces cacaoi. Agricultural and Biological Chemistry, 40: 1039–1044.

Solanki, R., Khanna, M. and Lal, R., 2008. Bioactive compounds from marine actinomycetes. Indian Journal Microbiology, 48(4):410–431.

Suthindhiran, K. and Kannabiran, K., 2010. Diversity and exploration of bioactive marine actinomycetes in the Bay of Bengal of the Puducherry coast of India. Indian Journal Microbiology, 50(1): 76-82.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30: 2725-2729.

Whitman, W.B., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Ludwig, W. and Suzuki, K.I., 2012. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 5, parts A and B. Springer-Verlag, New York, NY.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. and Miller, W. 2000. A greedy algorithm for

www.SID.ir

Archive of SID

Zucchi, T.D., Guidolin, A.S. and Consoli, F.L., 2011. Isolation and characterization of actinobacteria ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus* brunneus (Hymenoptera, Formicidae). Microbiological Research, 166: 68-76.

aligning DNA sequences. Journal of Computational Biology, 7(1-2): 203-214.

Zotchev, S.B., 2012. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. Journal of Biotechnology, 158(4):168–175 23.

www.SID.ir

Archive of SID

Isolation,Identification and Evaluation of antimicrobial activity of Actinomycetes from marine sediments of Persian Gulf (Hormozgan Province)

Gozari M.[1]*; Mortazavi M.S.[1]; Karim zadeh R.[1]; Ebrahimi M.[1]; Dehghani R.[1]

* m_gozari@yahoo.com

1-Persian Gulf and Oman Sea Ecological Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension Organization(AREEO) -Bandar Abbas- Iran

Abstract

Actinomycetes are gram positive and filamentous bacteria and produce major portion of bioactive compounds. The aim of this study was to isolate and identify antibiotic producing actinomycetes from Persian Gulf marine sediments within Hormozgan province territory. Among 3 selected isolation media the M_1 medium showed highest efficacy by isolation of 32 colonies. Heat treatment of 100 ºC for 60 min isolated 26 colonies and showed the best result. Approximately 60 Actinomycete isolates were obtained from 10 sediment samples. Evaluation of antimicrobial activity showed that 33, 20 and 30 % of isolates exhibited antimicrobial activity against *S.aureus*, *E.coli* and *C.albicans* respectively.Morphologic, physiologic and chemotaxonomic studies showed that selected potent isolates consist of Ifro12, Ifro 33 and Ifro 47 belonged to *Streptomyces* genus. Molecular genetic studies based on 16s rRNA gene analysis revealed that Ifro12, Ifro 33 and Ifro 47 exhibited 99 % similarity to *S.olivaceus*, *S.cacaoi* and *S.variabilis* respectively. Phylogenetic analysis showed that Ifro12 and Ifro 47 derived from a common ancestor. The results of present research indicated that these three isolates could be considered as promising candidates for antibiotic discovery researches.

Keywords: Marine Actinomycetes, Antimicrobial activity, Marine sediments, Persian Gulf

*Corresponding author

www.SID.ir