فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۵، پاییز ۱۳۹۴، صفحه ۱۶۷- ۱۷۸
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۵/۱۸ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۸/۰۷

سنجش فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های جداسازی شده از دریای خزر و شناسایی مولکولی سویه‌های دارای اثر ضد میکروبی

سجاد هارون آبادی: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، ایران، s.harounabadi@gmail.com
سید خلیل شکوهی مصطفوی: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، ایران، shokouhi85@gmail.com
پروانه اقبالی شمس‌آباد: کارشناس ارشد محیط زیست، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران، eghbalip@gmail.com
سید منصور میبدی *: استادیارمیکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، ایران، meybodi@dr.com

چکیده

مقدمه: دسترسی آسان و استفاده گسترده از ترکیبات ضد میکروبی، به پیدایش مقاومت در میان میکروارگانیسم‌ها منجر شده است. بنابراین، غربال‌گری و شناسایی ترکیبات ضد میکروبی با اثر بخشی بالا از میکروارگانیسم‌های ساکن در محیط‌های مختلف امری ضروری است. استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای اهداف زیست شناختی، آن‌ها را به عنوان یک ابزار مؤثر برای کنترل پاتوژن‌ها تبدیل کرده است. یکی از این میکروارگانیسم‌ها، باکتری *استرپتومایسس گریزئوس* است. هدف از مطالعه حاضر، جداسازی باکتری‌های آبزی با اثر ضد میکروبی بر پاتوژن‌های مقاوم گرم مثبت و گرم منفی و در نهایت، شناسایی مولکولی سویه‌های دارای اثر ضد میکروبی است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر، ۱۶۲ سویه از دریای خزر جداسازی شد. پس از کشت روی محیط اختصاصی میکروب‌ها، خاصیت ضد میکروبی باکتری‌های آبزی روی سویه‌های مرجع، سنجیده شد. ۴ سویه که بیش ترین خاصیت ضد میکروبی را داشتند انتخاب و با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و تعیین توالی ژن *۱۶rDNA S* به عنوان سویه جدید شناسایی و در بانک اطلاعات ژنی NCBI ثبت شد.

نتایج: از مجموع ۱۶۲ نمونه جداشده، ۴ باکتری بیش ترین فعالیت آنزیمی را داشتند، نتایج سنجش فعالیت ضد میکروبی آن‌ها نشان داد که بیش‌ترین اثر ضد میکروبی را روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* و کم ترین اثر را روی *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروجینوزا* داشتند. در انتها، پس از تعیین توالی ژنی باکتری‌های دارای اثر ضد میکروبی، مشخص شد که سویه‌ها به *استرپتومایسس گریزئوس* متعلق هستند.

بحث و نتیجه گیری: در مطالعه حاضر ۴ سویه باکتریایی دارای اثر ضد میکروبی شناسایی شد. با توجه به قدرت این سویه‌ها در کنترل رشد باکتری‌های پاتوژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌توان با خالص‌سازی بیشتر مواد ضد میکروبی این میکروارگانیسم‌ها در شرایط بهینه و کنترل شده، در صنایع دارویی و برای درمان پاتوژن‌های خطرناک از آن‌ها استفاده کرد.

واژه های کلیدی: *استرپتومایسس گریزئوس*، دریای خزر، فعالیت ضدمیکروبی

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2015, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

با وجود تنوع بسیار بالای زندگی در محیط خاکزی، دریاها دارای بزرگترین تنوع زیستی هستند. محیط‌های آبزی منابع بسیار بزرگی برای جداسازی میکروارگانیسم‌های جدید با توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه هستند (۱- ۳). متابولیت‌های ثانویه ترکیباتی با وزن مولکولی کم هستند که آنتی‌بیوتیک‌ها، سموم، فرومون‌ها، ممانعت کننده‌های آنزیمی و غیره را شامل می‌شوند. این مواد به عنوان تولیدات طبیعی میکروارگانیسم‌ها شناخته می‌شوند و برای رشد طبیعی ارگانیسم‌ها ضروری نیستند (۴). در مقایسه با ارگانیسم‌های خاکزی، متابولیت‌های ثانویه تولید شده در میکروارگانیسم‌های آبزی جدیدتر و فعالیت‌های زیستی آن‌ها قوی‌تر است که علت این امر تا حدودی مربوط به شرایط زندگی پیچیده و تنوع گسترده زیستی آن هاست. رقابت بین میکروب‌های آبزی برای فضا و غذا باعث ایجاد یک نوع فشار انتخابی می‌شود، در نتیجه میکروارگانیسم‌ها ترکیباتی طبیعی تولید می‌کنند که ارزش بسیاری در صنعت و پزشکی دارد (۵). تعداد ترکیبات طبیعی جداسازی شده از میکروارگانیسم‌های آبزی رو به افزایش است به طوری که هر سال صدها ترکیب جدید و مختلف کشف می‌شود و شمار آن‌ها هم اکنون بالغ بر ۱۸۰۰۰ ترکیب است (۶ و ۷). تعداد زیادی از این ترکیبات فعالیت دارویی دارند و برای تولید ترکیبات دارویی فعال زیستی بسیار سودمند هستند (۸). بیماری‌های عفونی تهدید جدی برای سلامت در کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شوند. افزون بر این، پیدایش مقاومت‌های دارویی مشکل بسیار جدی در درمان این بیماری‌های عفونی محسوب می‌شود (۹ و ۱۰). آثار بیماری‌های عفونی در محیط‌های آبزی نیز بسیار چشمگیر است. در ابتدا این بیماری‌ها در محیط‌های آبزی با داروهای ضد میکروبی کنترل می‌شد اما استفاده گسترده از داروهای ضد میکروبی در این زمینه سبب ایجاد نوعی فشار انتخابی و ظهور مقاوت باکتریایی شد (۱۱). بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها سبب مقاوت به بسیاری از پاتوژن‌ها شده است (۱۲). باکتری‌های مهم بیمارستانی از قبیل *استافیلوکوکوس اورئوس*[1] به طور معمول به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مقاوم شده‌اند (۱۳ و ۱۴). نگرانی اصلی دیگر در این زمینه مربوط به مقاوت‌های چند دارویی در بین باکتری‌های گرم منفی است. باکتری‌های گرم منفی محیطی به طور جدی بیماران را در بیمارستان‌ها تهدید می‌کنند و به طور وسیعی به نسل‌های اول و دوم و سوم پنی‌سیلین‌ها مقاوم هستند. از این دسته باکتری‌ها می‌توان به *سودوموناس آئروجینوزا*[2] اشاره کرد که پاتوژن فرصت طلب بیمارستانی است و بیماران بسیاری را تهدید می‌کند (۱۵). امروزه در حدود ۷۰ درصد از باکتری‌هایی که سبب عفونت دربیمارستان‌ها می‌شوند به طور رایج به یک یا تعداد بیش تری از آنتی‌بیوتیک‌های معمول که برای درمان استفاده می‌شوند، مقاوم هستند (۱۶). باکتری‌های آبزی با فعالیت ضد میکروبی از لایه‌های مختلف دریا از قبیل: سطح، عمق، رسوبات و همچنین، از سایر قسمت‌ها و نیز همراه با جلبک‌های دریای استخراج شده اند (۱۷). جنس *استرپتومایسس*[3] در میان خانواده *اکتینومایست‌ها*[4] به عنوان عامل تولید کننده آنتی‌بیوتیکی مهمی شناخته شده است و به طور گسترده در اکوسیستم‌های مختلف مانند خاک و آب یافت می‌شود. این جنس، باکتری‌هایی گرم مثبت با درصد بسیار بالایی از گوانین و سیتوزین در داخل ماده ژنتیکی خود هستند (بالغ بر ۷۰ درصد). *استرپتومایسس*ها به طور گسترده به

عنوان منبع مهمی برای آنتی‌بیوتیک‌ها و دیگر متابولیت‌های جدید و مهم شناخته شده اند. کمتر از ۷۰ نوع از ۱۰۰ نوع آنتی‌بیوتیک تجاری که برای درمان استفاده می‌شوند و نیز بالغ بر ۵۵ درصد ازآنتی‌بیوتیک‌های کشف شده بین سال‌های ۱۹۴۵ تا ۱۹۷۸ از مواد تولید شده *از استرپتومایسس*ها مشتق شده اند و کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید از این جنس همچنان ادامه دارد. (۱۸- ۲۴). بیشتر *استرپتومایسس*ها تولید کننده محدوده گسترده ایی از آنتی‌بیوتیک‌ها از قبیل: آمینوگلیکوزیدها[۵]، بتالاکتام‌ها[۶]، ماکرولیدها[۷]، پپتیدها[۸]، پولیین‌ها[۹]، نوکلوئوزیدها[۱۰] و.. . هستند (۲۵- ۲۸). همچنین، *استرپتومایسس*ها نقش بسیار مهمی در بازیافت مواد آلی و مواد دارویی جدید، آنزیم‌ها، مواد آرایشی و همچنین، تولید مواد ضد تومور ایفا می‌کنند (۲۹ و ۳۰). تجزیه و تحلیل از طریق روش‌های مولکولی ابزار بسیار ارزشمندی برای جداسازی و تشخیص سویه‌های جدید *استرپتومایسس* است. شواهد نشان می‌دهد تمایل زیادی برای شناسایی سویه‌های جدید *استرپتومایسس* از این طریق وجود دارد؛ زیرا این باکتری‌ها تولید کننده قوی متابولیت‌های ثانویه هستند و ارزش چشمگیری در زمینه‌های کشاورزی و پزشکی و.. .. دارند (۳۱). هدف از پژوهش حاضر، جداسازی و غربال‌گری باکتری‌های آبزی از دریای خزر، با توانایی تولید ماده ضد میکروبی بر علیه پاتوژن‌های مقاوم به دارو، گرم مثبت و گرم منفی، و سپس، سنجش قدرت ضد میکروبی آن‌ها برای توجیه بهینه‌سازی تولید ماده ضد میکروبی در آن‌ها برای صنایع داروسازی با دو روش کاملا متفاوت آنتاگونیسم میکروبی[۱۱] و سنجش از طریق دیسک[۱۲] و در انتها، شناسایی مولکولی آن‌ها بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و کشت باکتری‌های آبزی: نمونه گیری از غرب دریای خزر، (شهرستان رامسر واقع دراستان مازندران)، در شرایط کاملا کنترل شده، در فصل پاییز، در سه نوبت از عمق ۵۰ سانتی متری و از فاصله ۱۵۰ تا ۲۰۰ متر از ساحل انجام شد. علت لحاظ کردن این فاصله، دور بودن از آلودگی‌های نزدیک به ساحل و وجود سویه‌های غیر بومی بود. نمونه گیری به طور مستقیم با قرار گرفتن داخل آب، فرو بردن دست تا عمق ۵۰ سانتی متری، باز کردن درب شیشه داخل آب در همان عمق و پس از پر شدن شیشه بستن درب ظرف در همان لحظه در زیر آب انجام شد. نمونه‌ها داخل ظروف با درب پیچ دار (ظروف شیشه‌ای با درب پیچ دار پلاستیکی با قابلیت اتوکلا شدن که قبل از نمونه گیری در دستگاه اتوکلاو کاملا سترون شد ند) قرار گرفتند و در جعبه یخ به سرعت به آزمایشگاه انتقال داده و در مدت حداکثر ۲۴ ساعت کشت داده شدند.

سپس، از هر یک از نمونه‌ها در حالت سترون رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-8} تهیه، مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از هر کدام از رقت‌ها روی سطح پلیتی که حاوی محیط کشت مارین آگار[۱۳] بود ریخته و کشت سفره‌ای داده شد. محیط مارین آگار با غلظت یک دهم، ترکیب آن شامل: پپتون[۱۴] (مرک آلمان) ۰/۵ گرم، عصاره مخمر[۱۵] (مرک آلمان) ۰/۱ گرم، فسفات آهن[۱۶] (مرک آلمان) ۰/۱ گرم، آگار آگار[۱۷] (مرک آلمان)[۱۸] ۱۵ گرم، آب دریا ۱ لیتر بود. اسیدیته محیط بین ۷/۲ تا ۷/۶ تنظیم شد.

نمونه‌های مورد نظر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد داخل گرمخانه گذاشته شد. پرگنه‌های مختلف باکتریایی پس از گذشت ۴۸ تا ۷۲ ساعت و تعدادی نیز پس از ۲۰ روز روی پلیت ظاهر شدند (۳۲).

آماده‌سازی باکتری‌های جدا شده برای تولید ماده ضد میکروبی: باکتری‌هایی که بر اساس شکل و رنگ آمیزی گرم از یکدیگر جدا شده بودند هر یک به طور جداگانه در شرایط سترون و به میزان ۱ لوپ در ۳۰۰ میلی‌لیتر محیط مارین براث[۱۹] تلقیح شدند.

ارلن‌های حاوی باکتری تلقیح شده در داخل گرمخانه شیکردار در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دور ۲۲۰ rpm به مدت ۷ روز قرار داده شد. پس از گذشت ۷ روز نمونه‌ها از داخل گرمخانه شیکردار خارج و برای سانتریفیوژ به لوله‌های آزمایش انتقال داده شد. سانتریفیوژ در دور ۸۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه انجام و در نهایت، مایع رویی جدا شد (۳۲).

استخراج عصاره ضد میکروبی: مایع رویی ۳ بار و هر بار با ۱۰۰ میلی‌لیتر اتیل استات[۲۰] تیمار شد. سپس، حلال در دمای ۳۷ درجه تبخیر و عصاره میکروبی استخراج شد (۳۲).

سنجش فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های آبزی: در مرحله سنجش فعالیت ضد میکروبی به یک سری از سویه‌های مرجع برای بررسی اثر ضد میکروبی باکتری‌های آبزی روی آن‌ها نیاز بود. در این مرحله ۴ باکتری به عنوان سویه مرجع در نظر گرفته شد. این سویه‌ها شامل *باسیلوس سوبتیلیس* PTCC 1720 (DSM10)[۲۱]، *اشریشیا کلی*[۲۲] PTCC1399 (ATCC 25922)، *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC 1431 (ATCC25923) و *سودوموناس آئروجینوزا* PTCC 1430 (ATCC 27853) بودند.

بررسی فعالیت ضد میکروبی با دو روش انجام شد:

آنتاگونیسم میکروبی: در این روش باکتری‌های آبزی به شکل زنده برای بررسی اثر ضد میکروبی استفاده شد. در ابتدا، پلیت به دو قسمت مساوی تقسیم شد. در یک قسمت باکتری آبزی به شکل زنده و انبوه کشت داده و به مدت ۴۸ ساعت در داخل گرمخانه در دمای ۳۰ درجه قرار داده شد تا به اندازه کافی رشد کند و انتشار ماده ضد میکروبی در ژل انجام شود. سپس، از هر یک از سویه‌های مرجع رقت ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. سپس، هر یک از سویه‌های مرجع به شکل جداگانه با سوآپ از پایین به بالا به باکتری آبزی که قبلا به شکل انبوه در نیمه بالای پلیت کشت شده بود، به شکل عمود بر آن متصل شدند، به طوری که باکتری مرجع با باکتری آبزی که پیش از این در نیمه بالای پلیت کشت داده شده بود، اتصال یافت. سپس، پلیت‌های حاوی کشت‌های انجام شده به مدت ۴۸ ساعت دیگر داخل گرمخانه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (محیط کشت مورد استفاده در این مرحله مولر هینتون آگار بود که با آب دریا ساخته شده بود. علت استفاده از آب دریا املاح موجود در آن برای رشد باکتری‌های آبزی بود.) نتایج به شکل عدم رشد سویه‌های مرجع بررسی شد. این روش برای اطمینان ۳ بار تکرار شد.

انتشار از دیسک: در این روش، در ابتدا از هر یک از ۴ سویه مرجع رقت ۰/۵ مک فارلند تهیه و روی سطح پلیتی که حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار[۲۳] (مرک آلمان) بود کشت سفره‌ای داده شد. سپس، عصاره خام تهیه شده در مراحل قبلی به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دراتیل استات حل شد و مقدار ۲۰ لاندا (میکرولیتر) از آن به دیسک‌های بلانک استریل اضافه شد. دیسک‌های آغشته به مواد ضد میکروبی روی سطح پلیت‌های یاد شده به مدت ۱۰ ساعت در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا انتشار ماده ضد میکروبی در

ژل انجام شود. سپس، پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. در نهایت، قطر هاله اطراف هر دیسک بر حسب میلی‌متر سنجیده شد. شایان ذکر است که دیسک بلانک حاوی اتیل استات به عنوان شاهد منفی استفاده شد (۳۲). (این روش نیز برای اطمینان ۳ بار تکرار شد).

شناسایی سویه‌های باکتریایی تولید کننده ماده ضد میکروبی با استفاده از روش مولکولی: پس از استخراج DNA از باکتری‌ها با کیت استخراج DNA شرکت سیناژن[۲۴]، با استفاده از پرایمرهای جهانی، ماده ژنتیکی *۱۶SrRNA* با کمک روش مولکولی واکنش زنجیری پلیمراز تکثیر شد. در این مرحله، باکتری‌هایی که توانایی تولید ماده ضد میکروبی را داشتند با استفاده از روش تعیین توالی PCR rDNA 16S شناسایی شدند. توالی پرایمرهای ژن مورد نظر در جدول ۱ نشان داده شده است.

تهیه مخلوط واکنش زنجیری پلیمراز: برای انجام واکنش زنجیری پلیمراز به ترتیب از ddH_2O به غلظت ۰/۰۳۷ میلی‌لیتر (۳۷ لاندا) بافر واکنش زنجیری پلیمراز به غلظت ۰/۰۰۵ میلی‌لیتر (۵ لاندا) کلرید منیزیم و دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات و مخلوط پرایمر به میزان برابر ۰/۰۰۱ میلی‌لیتر (۱ لاندا) و در نهایت، از DNA الگو و آنزیم مقاوم به حرارت تک پلیمراز به ترتیب به میزان ۰/۰۰۵ (۵ لاندا) و ۰/۰۰۰۴ میلی‌لیتر (۴ دهم لاندا) استفاده شد. مجموع غلظت کل مواد واکنش زنجیری پلیمراز ۰/۰۵ میلی‌لیتر (۵۰ لاندا) بود. مواد مورد نظر به دقت و با رعایت شرایط مناسب برای اجتناب از آلودگی در یک میکروتیوپ ۰/۲ میلی‌لیتری ریخته شد.

پس از انجام واکنش زنجیری پلیمراز مقدار ۵ میکرولیتر از محصول واکنش زنجیری پلیمراز روی ژل آگاروز ۱ درصد به همراه اندازه نشانگر ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ الکتروفورز و باندهای اختصاصی مشاهده شد.

برای تعیین توالی محصول واکنش زنجیری پلیمراز ژن *۱۶SrRNA*، ۴۵ میکرولیتر از محصول نهایی واکنش زنجیری پلیمراز به همراه پرایمر Forward (جدول ۱) برای تعیین توالی برای شناسایی مولکولی براساس ژن *۱۶SrRNA* به شرکت ماکروژن کره جنوبی[۲۵] ارسال شد.

توالی‌های ارسال شده از شرکت ماکروژن، توسط نرم افزار کرومس[۲۶] مشاهده و کیفیت تعیین توالی از روی پیک‌های‌های ترسیمی بررسی شد. با استفاده از نرم افزار بلاست[۲۷] در پایگاه اینترنتی بانک اطلاعات ژنی[۲۸] توالی‌های همسان مشخص و درصد تشابه آن‌ها بررسی شد.

جدول ۱- توالی پرایمر مورد استفاده در روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

رفرنس	پرایمر	تولی پرایمر	طول قطعه تکثیر شده
(۳۳)	پرایمر Forward	AACTGGAGGAAGGTGGGGAT	۳۷۰ جفت باز
	پرایمر Reverse	AGGAGGTGATCCAACCGCA	

نتایج

سویه‌های جدا شده به اختصار با Ramsar (RS) strain نمایش داده شد. شکل ۱ تصویر ماکروسوپی *استرپتومایسس گریزئوس* [۲۹] را نمایش می‌دهد.

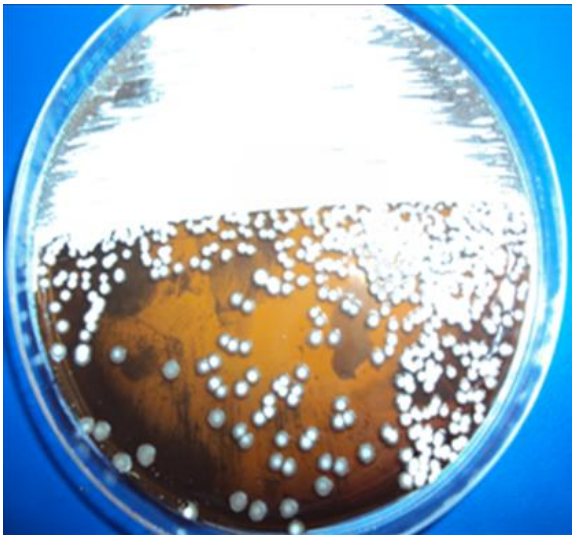
یافته‌های به دست آمده به روش کشت متقاطع خطی (آنتاگونیسم میکروبی): *استرپتومایسس اریترئوس* [۳۰] به عنوان شاهد مثبت برای بررسی فعایت ضد میکروبی استفاده و اثر آن روی ۴ سویه مرجع بررسی شد (جدول ۲).

یافته‌های به دست آمده در روش دیسک‌گذاری و سنجش هاله ممانعت از رشد: در این روش دیسک حاوی اتیل استات به عنوان شاهد منفی استفاده و اثر سویه های دارای اثر ضد میکروبی با آن مقایسه شد (جدول ۳).

شکل ۲ تصاویر اثر مهاری در روش کشت متقاطع خطی (آنتاگونیسم میکروبی) را نمایش می‌دهد.

شکل ۳ تصویر اثر مهاری در روش کشت دیسک‌گذاری را نمایش می‌دهد.

شناسایی ژنتیکی سویه‌های دارای اثر ضد میکروبی: سویه‌ها پس از استخراج DNA با روش تعیین توالی PCR rDNA 16S تکثیر و روی ژل آگاروز نمایان شدند (شکل ۴). در نهایت، مشخص شد که ۴ سویه جدید باکتریایی هستند (جدول ۴).



شکل ۱- تصویر ماکروسکوپی *استرپتومایسس گریزئوس*

جدول ۲- بررسی فعایت ضد میکروبی سویه‌های جداشده به روش کشت متقاطع خطی و اثر آن روی هر ۴ سویه مرجع

نام سویه	*استافیلوکوکوس اورئوس*	*سودوموناس آئروجینوزا*	*اشریشیاکلی*	*باسیلوس سوبتیلیس*
RS ۷۹	+	+	–	+
RS ۸۰	+	–	–	+
RS ۱۰۰	+	+	–	+
RS ۱۰۳	+	–	–	+
کنترل	+	–	–	+

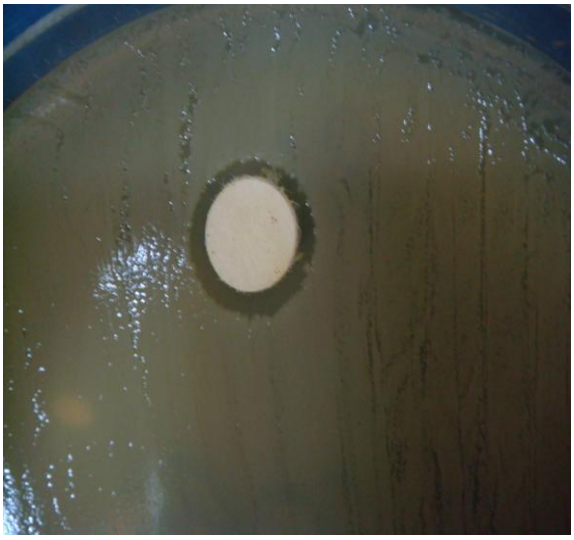
جدول ۳- یافته‌های به دست آمده از طریق دیسک‌گذاری و سنجش هاله ممانعت از رشد. (دیسک حاوی اتیل استات به عنوان شاهد منفی استفاده شد). ((–) بدون هاله ممانعت، (+) هاله بین صفر تا ۳ میلی‌متر، (++) هاله بین ۳ تا ۵ میلی‌متر، (+++) هاله بیشتر از ۵ میلی‌متر)

نام سویه	*استافیلوکوکوس اورئوس*	*سودوموناس آئروجینوزا*	*اشریشیاکلی*	*باسیلوس سوبتیلیس*
RS ۷۹	++	–	–	+
RS ۸۰	++	+	–	++
RS ۱۰۰	++	–	–	+
RS ۱۰۳	+	+	–	+
کنترل	–	–	–	–

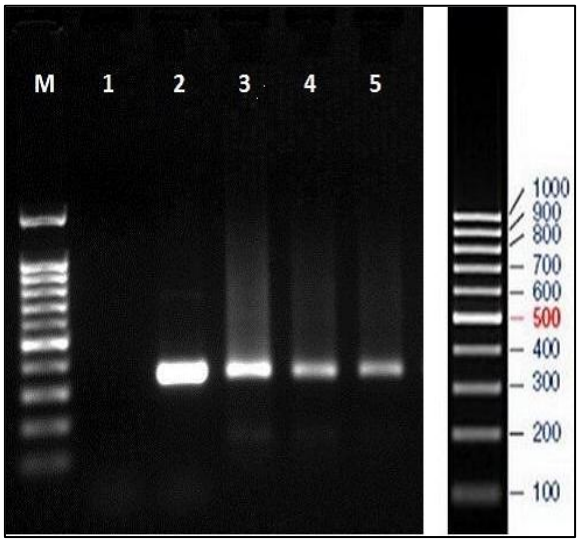
جدول ۴- چهار سویه جدید باکتریایی جدا شده و ثبت شده در Information Biotechnology for Center National و درصد همسانی آن‌ها با نزدیکترین سویه

نام سویه	نزدیکترین سوش	نام ثبت شده	درصد همسانی	شماره ثبت در NCBI
RS ۷۹	*griseus Streptomyces*	*caspian7* strain *griseus Streptomyces*	۹۹	JN084044
RS ۸۰	*griseus Streptomyces*	*caspian8* strain *griseus Streptomyces*	۹۹	JN084045
RS ۱۰۰	*griseus Streptomyces*	*caspian10* strain *griseus Streptomyces*	۹۹	JN084047
RS ۱۰۳	*griseus Streptomyces*	*caspian12* strain *griseus Streptomyces*	۹۹	JN084051

شکل ۲- تصاویر اثر مهاری در روش کشت متقاطع خطی (آنتاگونیسم میکروبی)



شکل ۳- تصویر اثر مهاری در روش کشت دیسک‌گذاری



شکل ۴- نتیجه حاصل از الکتروفورز با ژل ۱ درصد محصول تکثیر با روش *۱۶rDNA S* (M بیانگر لدر DNA bp 100، چاهک شماره ۱ کنترل منفی و چاهک‌های ۲ تا ۵ محصول حاصل از تکثیر DNA هدف هستند).

بحث و نتیجه گیری

در دهه‌های گذشته ترکیبات بسیار زیادی از باکتری‌های آبزی و دیگر منابع برای توسعه و پیشرفت در زمینه‌های پزشکی جدا شده است. هدف از پژوهش حاضر، جداسازی باکتری‌های آبزی با توانایی تولید مواد ضد میکروبی از دریای خزر بود. نمونه‌های فراوانی از منطقه رامسر در استان مازندران جمع آوری شد. فعایت ضد میکروبی در بین ۱۶۲ کلونی مختلف با استفاده از ۲ روش مختلف سنجیده شد. در روش اول، اثر ضد میکروبی باکتری مورد نظر به شکل زنده به روش آنتاگونیسم میکروبی بررسی شد. نتایج نشان داد که باکتری‌های مورد نظر در ۱۰۰ درصد مورد علیه گرم مثبت‌ها مؤثر بودند ولی اثر آن‌ها روی گرم منفی‌ها بسیار ضعیف بود؛ به طوری که *اشریشیاکلی* در هیچ یک از موارد رشد آن مهار نشد. در روش بررسی از طریق دیسک نیز نتایج تا حدود بسیار زیادی مشابه روش اول بود به طوری که گرم مثبت‌ها در همه موارد مهار شدند اما گرم منفی‌ها بسیار مقاوم بودند. در مورد نتایج این دو روش می‌توان گفت که در این دو روش اثر مهاری روی گرم مثبت‌ها بوده است و گرم منفی‌ها به مقدار بسیار کمی مهار شده اند. این امر می‌تواند مربوط به تفاوت ساختار دیواره سلولی در گرم مثبت‌ها و گرم منفی‌ها باشد. در پژوهش‌های مختلف نشان داده شد که اثرگذاری مواد ضد میکروبی در برابر گرم مثبت‌ها بیشتر از گرم منفی‌هاست. دیواره سلولی گرم مثبت‌ها متشکل از چندین لایه پپتیدوگلایکن است، در مقابل باکتری‌های گرم منفی دارای غشای خارجی منحصر به فردی هستند. آن‌ها دارای یک لایه ظریف پپتیدوگلایکن هستند. مقاومت گرم منفی‌ها به آنتی‌بیوتیک ناشی از غشای خارجی است. این غضای خارجی متشکل از پلی‌ساکارید است که دارای ترکیبات ساختاری لیپو پلی‌ساکاریدی می‌باشد. این امر، دیواره آن‌ها را غیر قابل نفوذ می‌کند و آن‌ها را از فروپاشی مصون می‌دارد (۳۴). نتایج به دست آمده در پژوهش‌های دیگر نیز تا حد زیادی با نتایج پژوهش حاضر انطباق داشت. در پژوهشی که در سال ۲۰۱۰ در مورد فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های آبزی در خلیج مکزیک انجام شد، نشان داده شد که باکتری‌های گرم منفی به اندازه باکتری‌های گرم مثبت به اثر ضد میکروبی حساس نبودند؛ به طوری که مشاهده شد هاله ممانعت از رشد ایجاد شده بر علیه *سودوموناس آئروجینوزا* بسیار کوچک‌تر از هاله ایجاد شده بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* بود و نیز در اطراف *اشریشیاکلی* هیچ هاله ممانعت از رشدی مشاهده نشد (۳۵). در پژوهشی که توسط زنگ[۳۱] و همکاران انجام شد نشان داده شد که در ۴۲ سویه جدا شده با فعالیت ضد میکروبی در ۶۹ درصد موارد *باسیلوس سوبتیلیس* و در ۵۲ درصد از موارد *استافیلوکوکوس اورئوس* مهار شدند. اما نکته جالب این بود که تنها در ۴ مورد یعنی در ۹ درصد از موارد *اشریشیاکلی* مهار شد (۳۲). در پژوهش دیگری در سال ۱۹۹۸ نتایج مشابهی به دست آمد، در پژوهش حاضر نیز مشاهده شد در میان ۱۲۶ سویه با فعالیت ضدمیکروبی تنها در ۴ مورد *اشریشیاکلی* مهار شد (۳۶). در پژوهش انجام شده برای استخراج ماده ضد میکروبی از اتیل استات استفاده شد. این امر در مطالعات دیگر نیز انجام شد به طوری که در پژوهش دیگری که در سال ۲۰۱۳ انجام شد برای بازیابی فعالیت ضد میکروبی و استخراج ماده ضد میکروبی از حلال اتیل استات استفاده شد (۳۷). در مطالعات پیشین نیز این نتیجه به دست آمده بود که

بیشتر ترکیبات ضد میکروبی با اتیل استات استخراج می‌شوند (۳۸). ماده ضد میکروبی استخراج شده توسط اتیل استات ممکن است حاوی ترکیبات گوناگونی باشد. از مهم ترین آن‌ها که سبب خاصیت ممانعت کنندگی می‌شود می‌توان به آنتی‌بیوتیک‌ها اشاره کرد. در پژوهشی که در سال ۲۰۰۸ انجام شد پس از استخراج ماده ضد میکروبی از طریق کروماتوگرافی ترکیبات ضد میکروبی گونه مشخصی از *استرپتومایسس* تحلیل شد. در پژوهش حاضر، بر اساس مقایسه پیک‌های جذبی، ترکیبات ماده ضد میکروبی بررسی شد (۳۰). در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۴ مشخص شد که یک سویه مشخص از *استرپتومایسس* دارای فعالیت ضد میکروبی است. پس از تجزیه و تحلیل و شناسایی آن، ترکیب ضد میکروبی تولید شده توسط این سویه به طور جزیی شناسایی شد. در پژوهش حاضر مشخص شد که، فعالیت ضد میکروبی تحت تأثیر پروتئیناز K یا درجه حرارت بالا نظیر (۶۰ درجه و یا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) از بین نمی‌رود. بر اساس این یافته‌ها می‌توان به این نتیجه رسید که ترکیب فعال ضد میکروبی ممکن است دارای ساختاری غیر پروتئینی باشد. (عواملی غیر پروتئینی به غیر از آنتی‌بیوتیک‌ها در فعالیت ضد میکروبی دخیل است). در پژوهش حاضر نیز برای شناسایی دقیق‌تر ساختار و ترکیب ماده ضد میکروبی به پژوهش‌های و آزمایش‌های بیشتری نیاز بود (۳۹). در پژوهش دیگری در هند، پتانسیل ضد میکروبی *اکتینومایست‌ها* بررسی شد. در پژوهش حاضر پس از انجام تجزیه و تحلیل از طریق کروماتوگرافی لایه نازک و استفاده از معرف‌های گوناگون مشخص شد ترکیب ضد میکروبی ممکن است الکل، فنل و یا استروئید باشد (۴۰). در زمینه بررسی اثر ضد میکروبی *استرپتومایسس*ها پژوهشی در سال ۲۰۱۴ برای جداسازی و تعیین ویژگی‌ها و فعالیت ضد میکروبی *استرپتومایسس* انجام شد. در پژوهش حاضر، از محیط‌های کشت متفاوت و متنوعی برای برسی فعالیت *استرپتومایسس* بر ضد پاتوژن‌ها استفاده شد ولی نکته مشترک در نتایج پژوهش حاضر این بود که در محیط کشت‌های متفاوت مقاومت بسیار بالایی در *اشریشیاکلی* مشاهده شد و همچنین *سودوموناس آئروجینوزا* نیز تا حد بالایی مقاوم بود اما در مقابل بر خلاف *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروجینوزا* اثر ضد میکروبی بر ضد *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به میزان بالایی در محیط‌های مختلف مشاهده شد. این امر گویای مقاوت بالای *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروجینوزا* به این نوع از *استرپتومایسس* است (۳۹). در پژوهش دیگری که در سال ۲۰۰۳ انجام شد حدود ۴۶ درصد از نمونه‌های جدا شده دارای فعالیت ضد میکروبی بودند البته در این بین پایین ترین فعالیت ضد میکروبی که در حدود ۵ درصد بود برعلیه گرم منفی‌ها مشاهده شد (۲۲). شناسایی گونه‌ها با استفاده از روش‌های مولکولی درجه بالایی از سرعت و دقت را فراهم کرد؛ به طوری که شناسایی مولکولی به مراتب ساده‌تر است زیرا پرایمرها هدف‌های بسیار ویژه‌ای در شناسایی *اکتینومایست‌ها* در روش *16 SrRNA* می‌باشند و شناسایی با این روش دقیق‌تر و صحیح‌تر است (۴۰).

تشکر و قدرانی

از سرکار خانم مهندس بزرگ نیا برای پیشبرد بهینه پژوهش حاضر تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Attimarad SL., Ediga GN., Karigar AA., Karadi R., Chandrashekhar N., Shivanna C. Screening, isolation and purification of antibacterial agents from marine *Actinomycetes*. *International Current Pharmaceutical Journal* 2012; 1 (12): 394-402.

(2) AL-Zereini W. Natural products from marine bacteria [Dissertation] Jordan: Kaiserslautern Univ.; 2006.

(3) Poosarla A., Ramana LV., Krishna RM. Isolation of potent antibiotic producing *Actinomycetes* from marine sediments of Andaman and Nicobar Marine Islands. *Journal of Microbiology And Antimicrobials* 2013; 5 (1): 6- 12.

(4) Ogunmwonyi INH. Assessment of antibiotic production by some marine *Streptomyces* isolated from the Nahoon beach [Dissertation]. south Africa: Fort Hare Alice Univ.; 2010.

(5) Jeganathan P., Rajasekaran KM., Asha Devi NK., Karuppusamy S. Antimicrobial activity and Characterization of Marine bacteria. *Indian Journal of Pharmaceutical And Biological Research* 2013; 1 (4): 38-44.

(6) Jeganathan P., Rajasekaran KM., Asha Devi NK. Antimicrobial activity and Characterization of Marine bacteria in Coastal sea water. *Scholars Academic Journal of Pharmacy* 2014; 3 (1): 73- 8.

(7) Pabba SK., Samatha B., Prasad MR., Nidadavolu SH., Charya MA S. Isolation and screening of marine bacteria for antimicrobial activity along Vishakapatanam Coast. *Journal of Microbiology And Biotechnology Research* 2011; 1 (2): 86- 9.

(8) Gokulkrishnan K., Kusum S., Boopalan K. Antimicrobial activity of marine bacteria isolated from the Mangalore Coast, West Coast of India. *Recent Research In Science And Technology* 2011; 3 (4): 15- 17.

(9) Vimal V., Rajan BM., Kannabiran K. Antimicrobial activity of marine *Actinomycete, Nocardiopsis sp*. VITSVK 5 (FJ973467). *Asian Journal of Medical Sciences* 2009; 1 (2): 57- 63.

(10) Subashini J., Kannabiran K. Antimicrobial activity of *Streptomyces sp*. VITBT7 and its synthesized silver nanoparticles against medically important fungal and bacterial pathogens. *Scholars Research Library* 2013; 5 (3): 192- 200.

(11) Anand P., Chellaram C., Kumaran S., Shanthini CF. screening for antibiotic production marine bacteria against fish pathogens. *International Journal of Pharma And Bio Sciences* 2011;2 (1): 314- 25.

(12) Tahmasby H., Barati S., Momtaz H., Rafiee Dolatabadi M., Ghasemi M., Ahmadi Salianeh SV., et al. An Investigation of beta-lactam antibiotics resistance in *Escherichia coli* isolates and molecular detection of *Escherichia coli O157:H7* in cage birds from Shahrekord, Iran. *Biological Journal of Microorganism* 2014; 9 (3): 35- 44.

(13) Parungao MM., G. Maceda EB., F. Villano MA. Screening of antibiotic-producing *Actinomycetes* from marine, Brackish and terrestrial sediments of Samal Island, Philippines. *Journal of Research in Science, Computing, and Engineering* 2007; 4 (3): 29- 38.

(14) Reisi M., Tajbakhsh E., Momtaz H. Isolation and identification of antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus* isolates from respiratory system infections in shahrekord., Iran. *Biological Journal of Microorganism* 2014; 10 (3): 97- 106.

(15) Ceylan C., Okmen G., Ugur A. Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. *Eurasian Journal of Biosciences* 2008; 2: 73- 82.

(16) Bisht R., Katiyar A., Singh R., Mittal P. Antibiotic resistance–a global issue of concern. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 2009;2 (2): 34- 9.

(17) Jayanth K., Jeyasekaran G., Shakila J. Isolation of marine bacteria, antagonistic to human pathogens. *Indian Journal of Marine Sience* 2002; 31 (1): 39- 44.

(18) Maleki H., Dehnad A., Hanifian S., Khani S. Isolation and molecular identification *of Streptomyces sp*. with antibacterial Activity from Northwest of Iran. *Biolmpacts* 2013; 3 (3): 129- 34.

(19) Sethi S., Kumar R., Gupta S. Antibiotic production by microbes isolated from soil. *International Journal of Pharmaceutical Sciences And Research* 2013; 4 (8): 2967- 73.

(20) Ningthoujam DS., Sanasam S., Nimaichand S. Screening of *Actinomycete* isolates from niche habitats in Manipur for antibiotic activity. *American Journal of Biochemistry Andbiotechnology* 2009; 5 (4): 221- 5.

(21) Ripa FA., Nikkon F., Rahman BM., Khondkar P. In vitro antibacterial activity of bioactive metabolite and crude extract from a new *Streptomyces sp. Streptomyces rajshahiensis. International Journal of Pharmtech Research* 2010; 2 (1): 644- 48.

(22) Rifaat HM., Abd El Naser NH., Helmy SM., Ali AM. Taxonomical studies on certain *Streptomycetes* exhibiting antimicrobial activity isolated from Egyptian soils. *Journal of Culture Collections* 2006; 5: 25- 34.

(23) Kay M., Hojati Z., Motovali-Bashi M. Increase of Clavulanic acid production by using recombinant *Streptomyces clavuligerus* strain including claR gene. *Biological Journal of Microorganism* 2014; 10 (3): 37- 44.

(24) Khayatmaher R., Amoozegar MA., Seyedmahd S., Hamedi J., Naghavi MR., Foroozanfar F., et al. Isolation and screening of phytotoxin producing *Actinomycetes* and determination of phytotoxin effect spectrum of selected strains. *Biological Journal of Microorganism* 2012; 2 (1) 1- 22.

(25) Malibari AA. Isolation and screening of antibiotic producing *streptomycetes* from western region soils of Saudi Arabia. *Journal of King Abdulaziz University* 1991; 3: 31- 42.

(26) Sahin N. Investigation of the antimicrobial activity of some *Streptomyces* Isolates. *Turkish Journal of Biology* 2002; 27: 79- 84.

(27) Anansiriwattana W., Tanasupawat S., Amnuoypol S., Suwanborirux K. Identification and antimicrobial activities of *Actinomycetes* from soils in Samed island, and geldanamycin from strain PC4-3. *The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006; 30: 49- 56.

(28) B. Ilić S., S. Konstantinović S., B. Todorović Z. UV/VIS analysis and antimicrobial activity of *Streptomyces* isolates. *Medicine and Biology* 2005; 12 (1): 44- 6.

(29) George M., Cyriac N., Nair A., Hatha AA M. Diversity of *Bacillus* and *Actinomycetes* in the water and sediment samples from Kumarakom region of Vembanadu lake. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 2011;40 (3): 430- 7.

(30) Remya M., Vijayakumar R. Isolation and characterization of marine antagonistic *Actinomycetes* from west coast of India. *Medicine And Biology* 2008;15 (1): 13- 19.

(31) Smaouti S., Mathieu F., Fguira LF., Merlina G., Mellouti L., Taxonomy and antimicrobial activities of a new *Streptomyces sp*. TN17 isolated in the soil from an Oasis Tunis. *Archives of Biological Sciences* 2011; 63 (4): 1047- 56.

(32) Zheng L., Han X., Chen H., Lin W., Yan X. Marine bacteria associated with marine microorganisms: the potential antimicrobial resources. *Annals of Microbiology* 2005; 55 (2): 119- 24.

(33) Teng LJ., Hsueh PR., Huang YH., Tsai JC. Identification of *Bacteroides thetaiotaomicron* on the Basis of an unexpected specific amplicon of universal

16S Ribosomal DNA PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42 (4): 1727-30.

(34) Pandey B., Ghimire P., Agrawal VP. Studies on the antibacterial activity of the *Actinomycetes* isolated from the Khumbu Region of Nepal. *International Journal of Biological Sciences* 2004: 1- 4.

(35) Cetina A., Matos A., Garma G., Barba H., Vázquez R. Antimicrobial activity of marine bacteria isolated from Gulf of Mexico. *Revista Peruana De Biologia* 2010; 17 (2): 231- 6.

(36) Ivanova EP., Nicolan DV., Yumoto N., Taguchi T., Okamoto K., Tatsu Y., Yoshikawa S. Impact of conditions of cultivation and adsorption on antimicrobial activity of marine bacteria. *Maine Biology* 1998; 130: 545- 51.

(37) Ramazani A., Moradi S., Sorouri R., Javani S., Garshasbi M. screening for antibacterial activity of Streptomyces species isolated from Zanjan province, Iran. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences* 2013; 3 (2): 342- 9.

(38) Arasua VM., Duraipandiyana V., Agastiana P ., Ignacimuthu S. Antimicrobial activity of *Streptomyces spp.* ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. *Japanese Journal of Medical Mycology* 2008; 18 (3): 147- 53.

(39) Maataoui H., Iraqui M., Jihani S., Ibnsouda S., Haggoud A. Isolation, characterization and antimicrobial activity of a *Streptomyces* strain isolated from deteriorated wood. *African Journal of Microbiology Research* 2014; 8 (11): 1178-86.

(40) Rana S., Salam M D. Antimicrobial potential of *Actinomycetes* Isolated from soil samples of Punjab, India. *Journal Of Microbiology & Experimentation* 2014; 2 (1): 1- 6.

---

[1]- *Staphylococcus aureus*
[2]- *Pseudomonas aeruginosa*
[3]- *Streptomyces*
[4]- *Actinomycete*
[5]- Aminoglycosides
[6]- ß-lactams
[7]- Macrolides
[8]- Peptides
[9]- Polyenes
[10]- Nucleosides
[11]- Microbial antagonism (cross streak assay)
[12]- Disc diffusion
[13]- Marine-Agar
[14]- Peptone
[15]- Yeast Extract
[16]- Iron Phosphate
[17]- Agar-Agar
[18]- Merck, Germany
[19]- Marine-Broth
[20]- Ethyl acetate
[21]- *Bacillus subtilis*
[22]- *Escherichia coli*
[23]- Muller Hinton Agar
[24]- CinnaGen, Iran
[25]- Macrogen Inc. , South Korea
[26]- Chromas
[27]- BLAST
[28]- NCBI
[29]- *Streptomyces griseus*
[30]- *Streptomyces erythreus*
[31]- *Zheng L*

Measurement of antimicrobial activity of isolated bacteria from the Caspian sea and molecular identification of strains with antimicrobial effect

Sajad Harounabadi
M.Sc. of Microbiology, Islamic Azad University, Tonekabon branch, Iran, s.harounabadi@gmail.com
Seyyed Khalil Shokouhi Mostafavi
M.Sc. of Microbiology, Islamic Azad University, Tonekabon branch, Iran, shokouhi85@gmail.com
Parvaneh Eghbali Shamsabad
M.Sc. of Environment, Science and Research Branch Islamic Azad University, Tehran, Iran, eghbalip@gmail.com
Seyyed Mansour Meybodi *
Assistant Professor of Microbiology, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Iran, meybodi@dr.com

Abstract

Introduction: Easy access and wide use of antimicrobial compounds led to the emergence of resistance among microorganisms. Therefore, screening and identifying antimicrobial compound with high effect of microorganisms in different environments is necessary and vital . Using microorganisms for biological aims change them to an important tool to control pathogens. *Streptomyces griseus* is one of them. The aim of this study is isolation of marine bacteria with antimicrobial effect against gram positive and negative bacteria. Finally, molecular identification of strains with antimicrobial activity.

Materials and methods: In this study, 162 strains were isolated from the Caspian Sea .The strains were cultured on special medium and finally antimicrobial activity on references strains as measured. Among them four strains with remarkable antimicrobial activity were identified and selected. The strains were subjected to 16S rDNA PCR sequencing. The strains were submitted to NCBI as new *Streptomyces griseus* strains.

Results: Among 162 strains, 4 strains had the most antimicrobial activity. The result showed, the strains were the most effective on *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* (Gram positive bacteria) and the least effect were observed on *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negative bacteria). After sequencing, the strains were classified to *sterptomyces griseus* genu.

Discussion and conclusion: In this study, 4 strains with antimicrobial activity were identified. According to the strength of these bacteria for controlling pathogenic bacteria resistant to antibiotic, we can have more pure microorganisms in optimized and controlled conditions for using in pharmaceutical industries and also for the treatment of dangerous pathogenic bacteria.

Key words: *Streptomyces griseus*, Caspian Sea, Antimicrobial activity

* Corresponding author
Received: August 9, 2014 / **Accepted:** October 29, 2014