



(Research Paper)
Biological Journal of Microorganism
11th Year, No. 42, Summer 2022
Received: May 9, 2021
Accepted: November 20, 2021

Isolation and Identification of Antibiotic Producing *Actinobacteria* from the Coast of the Persian Gulf

Somayeh Soori

Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, somayeh.soori93@yahoo.com

Mohammad Roayaei*

Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, roayaei_m@yahoo.com

Shahla Ahmadi

Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, ahmadishahla68@gmail.com

Gholam Reza Ghezelbash

Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, gh.r.ghezelbash@gmail.com

Abstract

Introduction: Actinomycetes are filamentous and gram-positive bacteria living as free-living, saprophyte, and sometimes in symbiosis with plants. These bacteria could be isolated from all ecosystems including soil, water, marine sediments and especially hot waters. Marine actinobacteria are known as the producers of a vast range of secondary metabolites. Any actinobacterial strain has the genetic potential for the production of 10-20 of the secondary metabolites. About 23000 antibiotic types were discovered from microorganisms which according to the estimations, about 10000 types have been isolated from actinobacteria. The secondary metabolites produced by marine actinobacteria have an extensive range of biological activities such as antibacterial, antifungal, anti-cancer, cytotoxic, cytostatic, anti-inflammatory, anti-parasite, anti-malaria, antiviral, anti-oxidant and anti-angiogenesis, etc.

Materials and Methods: In the present study, water and sediment samples from the Persian Gulf at the Bushehr Atomic Energy Beach were collected for Actinobacteria isolation. For the cultivation of these samples, 7 culture medium types were used. For the identification of the

*Corresponding Author

2322-5181/ © 2022 The Authors. Published by University of Isfahan

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



[10.22108/BJM.2021.128467.1385](https://doi.org/10.22108/BJM.2021.128467.1385)



[20.1001.1.23225173.1401.11.42.6.5](https://doi.org/20.1001.1.23225173.1401.11.42.6.5)

gathered isolates, morphological properties, biochemical tests, and molecular studies (e.g. PCR) were investigated.

Results: Twenty-four isolates of Actinobacteria were isolated from water and sediment samples of the Persian Gulf coast. Eighteen of the isolates have antibacterial activities. Seventy-five percent of the isolates were antibiotic producers and 95% of the gathered substances from these 18 strains had an antibacterial effect against gram-positive bacteria and 60% against gram-negative bacteria. Also, 60% of these substances were effective against both bacteria groups.

Discussion and Conclusion: The abundance of marine actinobacteria in new sources of the Persian Gulf and the extension of this sea's coast indicates the potential capability of this source for investigation in the scope of attaining new antibiotics.

Key words: The Persian Gulf, Actinobacteria, Antibiotic, Isolation

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)

سال یازدهم، شماره ۴۲، تابستان ۱۴۰۱، صفحه ۵۰-۳۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۹

جداسازی و شناسایی اکتینوباکتری‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک از ساحل خلیج فارس

سمیه سوری: کارشناس ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، somayeh.soori93@yahoo.com
محمد رعایی*: استاد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، roayaei_m@yahoo.com
شهلا احمدی: کارشناس ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، ahmadishahla68@gmail.com
غلامرضا قزلباش: استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، gh.r.ghezelbash@gmail.com

چکیده

مقدمه: اکتینومیست‌ها باکتری‌های رشته‌ای و گرم مثبت هستند که به صورت آزاد یا ساپروفیت و گاه همزیست با گیاهان دیده می‌شوند. این باکتری‌ها را می‌توان از همه اکوسیستم‌ها از جمله خاک، آب، رسوبات دریایی به‌ویژه آب‌های گرم جداسازی کرد. اکتینوباکتری‌های دریایی به‌عنوان تولیدکننده طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه شناخته شده‌اند. درواقع هر سویه از اکتینوباکتری‌ها به احتمال زیاد ظرفیت ژنتیکی برای تولید ۱۰ تا ۲۰ متابولیت ثانویه را دارد. حدود ۲۳۰۰۰ نوع آنتی‌بیوتیک از میکروارگانیسم‌ها کشف شده است که طبق برآوردها حدود ۱۰۰۰۰ نوع از آنها از اکتینوباکتری‌ها جدا شده‌اند. متابولیت‌های ثانویه تولیدشده توسط اکتینوباکتری‌های دریایی، طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های زیستی مانند ضدباکتری، ضدقارچ، ضدسرطان، سمیت سلولی، سیتواستاتیک، ضدعفونی، ضدانگل، ضد مالاریا، ضد ویروسی، آنتی‌اکسیدان و ضد رگ‌زایی و غیره دارند.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش برای جداسازی اکتینوباکتری‌ها، نمونه‌های آب و رسوب از خلیج فارس در محل ایستگاه انرژی اتمی بندر بوشهر جمع‌آوری شدند. برای کشت این نمونه‌ها از ۷ نوع محیط کشت استفاده شد. برای تعیین هویت جدایه‌های به‌دست آمده، ویژگی‌های ریخت‌شناسی، تست‌های بیوشیمیایی و مطالعات مولکولی بررسی شدند.

نتایج: ۲۴ جدایه اکتینوباکتری از نمونه‌های آب و رسوب سواحل خلیج فارس جدا شدند که ۱۸ جدایه فعالیت ضدباکتریایی داشتند؛ بنابراین، ۷۵ درصد جدایه‌ها مولد آنتی‌بیوتیک بودند. ۹۵ درصد مواد به‌دست آمده از این ۱۸ سویه، اثر ضدباکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت و ۶۰ درصد علیه باکتری‌های گرم منفی داشتند. ۶۰ درصد از این مواد علیه هر دو گروه باکتری مؤثر بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند هر کدام از ۱۸ نوع ماده ضدباکتری جدا شده از ۱۸ سویه مختلف، حداقل علیه یک باکتری بیماری‌زا مؤثر هستند که این نشان‌دهنده توانایی بالقوه این منبع برای مطالعه در زمینه دستیابی به آنتی‌بیوتیک‌های جدید است.

واژه‌های کلیدی: خلیج فارس، اکتینوباکتری‌ها، آنتی‌بیوتیک، جداسازی

* نویسنده مسئول مکاتبات



2322-5181/ © 2022 The Authors. Published by University of Isfahan

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



10.22108/BJM.2021.128467.1385



20.1001.1.23225173.1401.11.42.6.5

مقدمه

محیط زیست دریایی یک منبع تا حد زیادی ناشناخته برای جداسازی میکروب‌های جدید مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، اکتینوباکتری‌ها، جلبک‌های ریز، سیانوباکتری‌ها و دیاتومه‌ها محسوب می‌شود که تولیدکننده مهم متابولیت‌های ثانویه فعال زیستی‌اند (۱). مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها به دنبال مصرف بی‌رویه آنها به شدت در حال گسترش است؛ بنابراین، همین موضوع ضرورت کشف ترکیبات دارویی جدید را پیشنهاد می‌کند. تقریباً نیمی از تنوع زیستی کره زمین مربوط به موجودات دریایی است؛ لذا، گفتنی است دریا منبع غنی از ترکیبات جدید است. به منظور پیشرفت در زمینه فعالیت‌های داروسازی، دریا مخزنی از مولکول‌های طبیعی با ارزش به شمار می‌آید؛ بنابراین، می‌توان اذعان کرد محیط‌های دریایی به‌طور عمده منبع مناسبی برای جداسازی میکروارگانیسم‌های جدید با توانایی تولید متابولیت‌های فعال ثانویه‌اند. از میان این میکروارگانیسم‌ها، اکتینوباکتری‌ها اهمیت ویژه‌ای دارند؛ زیرا تولیدکننده ترکیبات شیمیایی متنوعی با طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی‌اند (۲). واکسمن^۱ کشف کرد باکتری‌های خاک مورد مطالعه او تولیدکننده اکتینومایسین هستند و اولین آنتی‌بیوتیک خالص از یک اکتینوباکتریوم به نام *استرپتومایسین آنتی‌بیوتیکوس*^۲ به دست آمد گذاشته شود. بعدها واکسمن و آبراهام^۳ کشف کردند استرپتومایسین توسط *استرپتومایسین گریزنوس*^۴ تولید می‌شود و برای نخستین بار این دارو برای درمان سل استفاده شد (۳). اکتینوباکتری‌ها، باکتری‌های رشته‌ای و گرم مثبت‌اند که از نظر اقتصادی و زیست فناوری ارزشمندترین پروکاریوت‌ها محسوب می‌شوند. این میکروارگانیسم‌ها قادر به تولید طیف

گسترده‌ای از ترکیبات فعال زیستی مانند عوامل ضدتومور، عوامل سرکوب‌کننده ایمنی، آنزیم‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها هستند (۴، ۵، ۶)؛ برای مثال، بوناکتین^۵ یک ترکیب جدید است که از محیط کشت مایع *استرپتومایسین سوئی* BD21-2^۶ جداسازی شده از نمونه رسوبات کم عمق ساحل کائوآئی^۷، اوآهو^۸ و هاوایی^۹ به دست آمده است. این ترکیب فعالیت ضدباکتریایی علیه هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داده است و فعالیت ضدقارچی نیز دارد (۷). تریواکساکارسین‌های^{۱۰} A، B و C از *استرپتومایسین اوکراسئوس*^{۱۱} و *استرپتومایسین بوتروپنسیس*^{۱۲} به دست آمده‌اند. این ترکیبات علیه رده‌های سلول‌های سرطانی مختلف فعالیت سیتوتوکسیک داشته و همچنین فعالیت علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی نیز نشان داده‌اند. تریواکساکارسین A1 و A2 فعالیت ضدقارچی را هم نشان داده‌اند. پس از انجام بررسی‌ها مشخص شد برخی تریواکساکارسین‌ها فعالیت ضدمالاریایی زیادی به نمایش می‌گذارند که تاکنون ناشناخته بوده است (۸). در همین راستا این مطالعه به منظور جداسازی و شناسایی اکتینوباکتری‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک ناحیه شمالی خلیج فارس (سواحل بوشهر) و بررسی کارایی متابولیت‌های ثانویه جداشده از آنها علیه سویه‌های بیماری‌زا و سویه‌های استاندارد انجام گرفت. علاوه بر این، انتخاب و گزارش چندین سویه برتر تولیدکننده آنتی‌بیوتیک از بین سویه‌های جداشده انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: نمونه‌برداری از ساحل انرژی اتمی بندر بوشهر (اسکله صیادی بندرگاه) با طول جغرافیایی ۲۸°۳۸′۴۹ و عرض جغرافیایی ۵۴°۴۴′۵۰ صورت

محل نمونه‌برداری (ساحل سازمان انرژی اتمی بوشهر)
این پروژه در جدول شماره ۱ آورده شده است.

گرفت. با استفاده از مولتی‌متر، pH، میزان اکسیژن
محلول، دما و شوری آب اندازه‌گیری شد. مشخصات

جدول ۱- وضعیت محل نمونه‌برداری

خصوصیات نمونه‌ها و محل نمونه‌برداری	دما °C	شوری ms/cm	pH	DO ^۲ mg/L	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
ساحل انرژی اتمی	۲۰/۹	۵۱/۳	۸/۱۶	۹/۹	۲۸°۳۸'۴۹	۵۴°۴۴'۵۴

برای نمونه‌برداری از آب از واتر سمپلر و برای
رسوب از گریپ^{۱۳} استفاده شد. نمونه‌برداری از ۴
ایستگاه و در چهار عمق مختلف (۱/۵، ۲/۵، ۳ و ۵ متر)
صورت گرفت. در مجموع ۳۰ نمونه آب و رسوب (۲۱
نمونه آب و ۹ نمونه رسوب) جمع‌آوری شدند (جدول
۲).

جداسازی باکتری‌ها از نمونه‌های آب و رسوب:
جداسازی باکتری‌ها از نمونه‌ها طی مراحل از جمله
تیمار حرارتی، تیمار شیمیایی، رقت‌سازی و غنی‌سازی
انجام شد.

الف. تیمار حرارتی: برای تیمار حرارتی، نمونه‌های
رسوب به مدت یک ساعت در آون ۵۵ درجه
سانتی‌گراد قرار داده شدند تا خشک شوند. سپس با
کوبیدن، به صورت پودر درآورده و از الک عبور داده
شد. این کار با هدف آزادشدن اسپورهای متصل به
ذرات انجام شد. سپس ۵ گرم از نمونه خشک‌شده به
همراه کربنات کلسیم (CaCO₃) در ۴۵ میلی‌لیتر آب
دریای فیلترشده، حل و به مدت یک ساعت مخلوط شد.
در نهایت، بعد از ته‌نشینی، ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی
به محیط‌های جامد ساخته‌شده تلقیح شد (۹، ۱۰).

جدول ۲- نوع نمونه‌ها و عمق برداشت آنها

کد نمونه	نوع نمونه	عمق نمونه‌برداری (متر)
N1A1	آب	۱/۵
N2A1	آب	۱/۵

ب. تیمار شیمیایی: به منظور تیمار شیمیایی، کربنات
کلسیم به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر گرم به نمونه‌ها اضافه
شد (۹).

ج. رقت‌سازی: یک گرم از نمونه‌های رسوب
تهیه‌شده به روش بالا به ارلن‌مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری
حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب دریای استریل اضافه شد و
ارلن‌مایرها به مدت نیم ساعت برای جداسازی
زنجیره‌های اسپور مخلوط شدند. بعد از ته‌نشینی ذرات

محلول به دست آمده، صاف و حجم آن اندازه‌گیری شد. حجم نهایی به ۱ لیتر رسانیده و سپس آگار اضافه شد. pH محیط روی ۷/۲ تنظیم و سپس اتوکلاو شد (۱۴).

۴- محیط Starch- Inorganic salt Agar یا ISP4
(K₂HPO₄(anhydrous) 1g, soluble starch 10g,
(NH₄)₂SO₄ 2g, NaCl 1g, MgSO₄.7H₂O 1g
Agar 20g, Trace salts solution 1g, CaCO₃ 2g
(PH 7-7/2)

* دربارهٔ تهیه محیط ISP4، دو محلول نشاسته (۱۰ گرم نشاسته در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر جوشانده شد تا کامل حل شود) و محلول نمکی (عناصر نمکی در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر) به صورت جداگانه تهیه و با هم مخلوط شدند. pH محیط روی ۷ تا ۷/۴ تنظیم و سپس اتوکلاو شد (۱۳).

۵- محیط گلیسرول-آسپارژین آگار یا ISP5 (-L)
K₂HPO₄ ۱g, Glycerol 10g, asparagine 1g
agar 20g, Trace salts solution 1ml, (anhydrous)
(pH 7-7.4)

* ال-آسپارژین نسبت به حرارت حساس است و بعد از اتوکلاو اضافه شد (۱۴)

* ترکیب Trace Salts Solution: ZnSO₄.7H₂O 0.1, FeSO₄.7H₂O 0.1, MnCl₂.4H₂O 0.1

۶- محیط Peptone Yeast Extract Iron Agar یا ISP6
(Ferric ammonium citrate 0.5, Peptone 20g)
Yeast Extract, Na₂S₂O₃.5H₂O 0.08, K₂HPO₄ 1g
1g, agar 15g و (PH 7- 7/5) (۱۳).

۷- تیروزین آگار یا ISP7 (-L, Glycerol 15 g)
K₂HPO₄ 0.5, L-Asparagine 1g, Tyrosine 0.5g
Trace, FeSO₄.7H₂O 0.01, NaCl 0.5, MgSO₄ 0.5

معلق، از مایع رویی رقت‌های ۱۰^{-۱} تا ۱۰^{-۶} تهیه شد. در نهایت، ۱ میلی لیتر از مایع رویی هریک از رقت‌ها کشت داده شد (۱۱).

۵. غنی‌سازی: قبل از کشت نمونه‌ها در محیط جامد، غنی‌سازی در محیط مایع با هدف جداسازی میکروارگانیسم‌های کم تراکم انجام شد. برای این منظور در ارلن‌مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری، ۵۰ میلی‌لیتر محیط نشاسته - کازئین براث (SCB) و عصاره مخمر - عصاره مالت براث (ISP2) ریخته شد. سپس ۵ میلی‌لیتر از هر کدام از نمونه‌ها (نمونه‌های آب و سوسپانسیون رسوب) به محیط‌های غنی‌سازی تلقیح شد. کلیه نمونه‌های تلقیح شده به مدت ۳ روز تا ۳ هفته در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۳۰ دور در دقیقه شیک انکوبه شدند (۹، ۱۰). از تمامی نمونه‌های غنی‌سازی شده ۱ میلی‌لیتر به صورت مستقیم و بدون تهیه رقت (با چندین تکرار با فاصله زمانی) روی محیط‌های زیر (ISP2، SCA، آگار ISP3، ISP4، ISP5، ISP6، ISP7) به روش کشت چمنی با استفاده از سواب کشت داده شد.

۱- محیط نشاسته - کازئین آگار SCA (0.3 casein, starch 10 g, KNO₃ 2 g, K₂HPO₄ 2 g, MgSO₄.7H₂O 0.05 g, CaCO₃ 0.2 g, FeSO₄.7H₂O 0.01 g, agar 20 g, seawater 1,000 ml و pH 7.0 ± 0.2) (۱۲).

۲- محیط عصاره مخمر - عصاره مالت Yeast Extract-4g/l, Malt Extract-10g/l, ISP2 Soya meal-30g/l, Agar-18g/l, Dis. Water-700ml, Sea water-300ml and pH-7.5) (۱۳).

۳- محیط Oatmeal آگار یا ISP3 Oatmeal (-Oatmeal, Malt extract) 20 g, Agar 18 g و (pH 7.2) (۱۴).
* شایان ذکر است برای تهیه محیط ISP3 ابتدا Oatmeal با ۱ لیتر آب به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شد.

element solution 1ml و agar 20g) (۱۵).

کشت و خالص‌سازی: به منظور جداسازی، ابتدا از

تمامی نمونه‌های غنی‌سازی شده رقت‌های 10^{-1} ، 10^{-2} ، 10^{-3} و 10^{-4} تهیه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه‌شده روی محیط‌های SCA و ISP2 agar به روش کشت چمنی با استفاده از سوآب کشت داده شد. علاوه بر این، هر نمونه غنی‌شده به صورت مستقیم و بدون تهیه رقت (با چندین تکرار با فاصله زمانی) روی محیط‌های SCA، agar، ISP2، ISP3، ISP4، ISP5، ISP6 و ISP7 کشت شد. کلیه محیط‌های کشت به مدت ۷ تا ۲۱ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند (۱۶، ۱۷). برای جلوگیری از آلودگی قارچی از آنتی‌بیوتیک‌های سیکلوهاگزامید (۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر) و آمفوتریسین B (۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) استفاده شد. برای جداسازی و تشخیص اولیه اکتینومیست‌ها، از روش‌های رنگ‌آمیزی گرم، بوی خاک و مشاهده کلنی‌های پودری و خشک استفاده شد. برای خالص‌سازی از هریک از کلنی‌ها چندین بار روی همان نوع محیطی که جدا شده بودند، کشت خطی انجام شد (۹، ۱۱).

بررسی اثر ضدباکتریایی: به منظور سنجش فعالیت

ضدباکتریایی جدایه‌های جداشده از سویه‌های دارای شاخص استاندارد شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*^{۱۴}، *شریشیا کلی*^{۱۵}، *لیستریا مونوسیتوزنز*^{۱۶} سویه 1298 (ATCC 19115)، *شیگلا دیستری*^{۱۷} سویه ۱۱۸۸ (RI 366)، *سالمونلا تیفی*^{۱۸} سویه ۱۶۰۹، *استرپتوکوکوس پیوزنز*^{۱۹} سویه ۱۷۶۲ (ATCC19615) و *سودوموناس آئرورینوزا*^{۲۰} سویه ۱۰۷۶ (ATCC 9027) استفاده شد. همچنین اثر ضدباکتریایی این جدایه‌ها علیه تعدادی باکتری بیماری‌زای جداشده از نمونه‌های کلینیکی شامل چند سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۴۱، ۱۳۱، ۱۲۱،

۱۱۳)، *استافیلوکوکوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)*^{۲۱}، *باسیلوس سوبتیلیس*^{۲۲}، *شریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس*^{۲۳} نیز سنجیده شد. علاوه بر این، اثر آنها علیه *کاندیدا آلیکنس*^{۲۴} نیز بررسی شد. به منظور غربال‌گری باکتری‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک از روش کشت دولایه^{۲۵} استفاده شد. در این روش ابتدا تمام ایزوله‌های جداشده به صورت کشت نقطه‌ای در محیط نشاسته - کازئین آگار کشت داده و به مدت ۷-۱۰ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس باکتری‌های پاتوژن مدنظر در محیط مولر هیتون براث، تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند تا زمانی که غلظت نهایی سلولی آنها به کدورت معادل ۰/۵ مک‌فارلند برسد. از هر سوپانسیون باکتری بیماری‌زا به میزان ۵۰۰ میکرولیتر در ۳ میلی لیتر محیط مولر هیتون حاوی ۰/۶ درصد آگار، تلقیح و روی محیط رشد اکتینومیست‌ها ریخته شد. پس از ۲۴-۴۸ ساعت گرماگذاری هاله‌های عدم رشد در اطراف کلنی باکتری‌های تولیدکننده ماده ضد میکروبی نمایان شد (۱۰، ۱۸). شناسایی جدایه‌های باکتریایی به دست آمده از رسوبات و آب براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی میکروسکوپی و ماکروسکوپی و ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی انجام گرفت و در نهایت با استفاده از روش مولکولی PCR برای تأیید نهایی هویت جدایه‌ها اقدام شد. اینکار طی مراحل زیر انجام شد.

تعیین ویژگی‌های مورفولوژیکی جدایه‌ها

رنگ‌آمیزی گرم: به منظور تشخیص ابتدایی جدایه‌ها، رنگ‌آمیزی گرم انجام شد. شکل میکروسکوپی جدایه‌ها با استفاده از عدسی ۱۰ و ۱۰۰ میکروسکوپ زمینه روشن بررسی شد (۱۹).

مورفولوژی زنجیره اسپور و شکل میسلیموم: برای

بررسی مورفولوژی زنجیره اسپور، اسپورانژیوم و آرایش میسلیموم‌های هوایی و سطحی از روش کشت اسلاید و میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) استفاده شد (۱۵). در این روش بعد از ریختن محیط ISP2 در پلیت، لامل‌های استریل به صورت مورب در محیط فرو برده شدند و بعد از بسته شدن محیط کشت، جدایه‌ها با لوپ در فاصله بین لامل و محیط کشت به صورت یک خط مستقیم کشت داده و محیط‌های کشت شده به مدت ۱۰ تا ۱۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. در نهایت، با استفاده از پنس استریل لامل‌ها خارج و به مدت نیم ساعت با لایه‌ای از طلا پوشیده شدند و عکس‌برداری از آنها با بزرگنمایی‌های مختلف توسط میکروسکوپ الکترونی انجام شد (۲۰، ۲۱، ۲۲).

رنگ توده اسپوری: رنگ توده اسپوری روی

محیط‌های مختلف براساس ۷ رنگ اصلی توسط ترسنر^{۲۶} و باکوس^{۲۷} (قرمز، زرد، سبز، آبی، بنفش، خاکستری و سفید) به همان صورت عنوان شده در مقاله ISP و طبق سیستم رنگ (ISCC-NBS) گزارش شد (۱۴).

رنگ میسلیموم رویشی: برای مشاهده رنگ میسلیموم

رویشی، قسمتی از کشت بالغ رشد کرده روی آگار توسط اسکالپل، بریده و به صورت معکوس روی لام قرار داده شد. سپس رنگ کلنی براساس استاندارد ISCC-NBS تفسیر شد (۱۴).

رنگدانه‌های محلول: تولید رنگدانه‌های محلول

روی محیط‌های agar ISP2 و ISP5 بعد از ۱۴-۱۰ روز گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد بررسی شد (۱۵).

تست‌های بیوشیمیایی

ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی شامل توانایی مصرف منابع مختلف کربنی و نیتروژنی، توانایی رشد در دما و pH مختلف و غلظت‌های مختلف نمک، تولید هیدروژن سولفید، تولید اندول، تست حرکت، هیدرولیز اسکولین، تست کاتالاز، تست اوره‌آز، احیای نترات، پیگمان‌های ملانوئیدی، تست لیپاز، تولید آنزیم آمیلاز، تست DNase، تولید آنزیم پروتئاز، تولید آنزیم ژلاتیناز، تولید آنزیم کربوکسی متیل سلولاز بودند که بررسی شدند (۲، ۱۴، ۲۱).

توانایی مصرف منابع مختلف کربنی: منابع کربنی

مانند سلولز، آرابینوز، مانیتول، فروکتوز، سوکروز، اینوزیتول، گزیلوز و دکستروز به صورت استریل با غلظت ۱ درصد بعد از اتوکلاو به محیط پایه^{۲۸} اضافه شدند که ترکیب آن در جدول ۳ ذکر شده است و از گلوکز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. منابع کربن به صورت استریل با غلظت ۱ درصد بعد از اتوکلاو اضافه شدند، کشت ایزوله‌ها روی آن انجام شد و پس از گذشت ۷، ۱۴ و ۲۱ روز گرماگذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد توانایی رشد آنها روی این محیط‌ها بررسی شد (۲۲، ۲۳).

جدول ۳- ترکیب محیط پایه

ترکیبات	مقدار (گرم در لیتر)
(NH ₄) ₂ SO ₄	۲/۶۴
KH ₂ PO ₄ (بدون آب)	۲/۳۸
K ₂ HPO ₄	۵/۶۵
MgSO ₄ ·7H ₂ O	۱
CuSO ₄ ·5H ₂ O	۰/۰۰۶۴
FeSO ₄ ·7H ₂ O	۰/۰۰۱۱

استفاده از پرایمرهای مناسب، تکثیر و برای تعیین توالی فرستاده شد.

الف. کشت و تهیه بیومس: سویه‌های مدنظر در مرحله اول روی محیط آگاردار عصاره مخمر - عصاره مالت (ISP2) کشت شده و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ تا ۷ روز گرماگذاری شده‌اند. بعد از حصول اطمینان از خلوص آن با بررسی ماکروسکوپی (نبود آلودگی در پلیت) و میکروسکوپی (تهیه اسمیر از سویه و رنگ آمیزی گرم) یک لوپ از باکتری در محیط ISP2 Broth کشت داده شد و به مدت ۳-۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکر با دور ۲۲۰ rpm گرماگذاری شد.

ب. استخراج DNA: برای استخراج DNA از روش Salting out استفاده شد (۲۰). برای تأیید استخراج انجام شده، الکتروفورز ژل آگارز صورت گرفت. به این صورت که ۵ میکرولیتر نمونه روی ژل (۱/۵ w/v) درصد بارگذاری شد. سپس به مدت ۵۰ دقیقه در جریان ولتاژ ۸۰ میلی‌ولت در تانک الکتروفورز قرار گرفت و بعد از آن، رؤیت باندها در دستگاه ژل‌داک انجام شد. همچنین برای بررسی کیفیت DNA ژنومی استخراج شده و تعیین میزان خلوص آن، غلظت محصول استخراج و میزان جذب نوری آن در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد.

پ. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز^{۲۹}: تکثیر ژن 16S rRNA با استفاده از پرایمرهای عمومی پروکاریوتی 27F و 1492R صورت گرفت. توالی پرایمرها به همراه تعداد بازها در جدول ۴ آمده است.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با روش استاندارد و مواد

MnCl ₂	۰/۰۰۷۹
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	۰/۰۰۱۵
آگار	۱۵
pH	۶/۸ - ۷/۰

توانایی مصرف منابع مختلف نیتروژن: توانایی استفاده از منابع نیتروژن (از جمله ال-آسپاراژین، تریپتوفان، D-آلانین، تیروزین، سیستین، آرژنین و پتاسیم نترات) بررسی شد که به صورت جداگانه به میزان ۰/۱ درصد به محیط پایه افزوده شد. گفتنی است ال-آسپاراژین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. سویه‌ها روی این محیط‌های مذکور کشت شدند و پس از گذشت ۱۴ روز، توانایی رشد یا عدم رشد سویه‌ها بررسی شد (۱۴).

توانایی رشد در دما و pH مختلف و غلظت‌های مختلف نمک: توانایی رشد سویه‌های برتر از نظر تولید آنتی‌بیوتیک در دماهای مختلف (۴، ۲۸، ۳۵ و ۴۵)، pHهای متفاوت (۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰) و توانایی تحمل سدیم کلرید در غلظت‌های ۰، ۵ و ۱۰ درصد بررسی شد. علاوه بر انجام این تست‌ها و شناسایی سویه‌های برتر برای تعیین نهایی هویت آنها مطالعات مولکولی PCR نیز انجام گرفت (۱۵، ۲۵).

مطالعات مولکولی: از بین ۲۴ ایزوله جدا شده، ۲۰ سویه تولیدکننده آنتی‌بیوتیک برای مطالعات مولکولی انتخاب شد. برای تعیین ترادف 16SrRNA و بررسی فیلوژنی، ابتدا از کلیه سویه‌ها روی محیط‌های مناسب کشت داده و بیومس سلولی جمع‌آوری شد. در مرحله بعد، جداسازی DNA سلولی با استفاده از روش‌های مختلف شکست سلولی، پیگیری و DNA خالص سلولی استخراج شد؛ در نهایت، توالی 16SrRNA با

یکنواخت شود. سپس ژنوم و نیز مخلوط واکنش به میکروتیوب‌های ۲۰۰ میکرولیتری اضافه شدند؛ درنهایت، پس از میکروفیوژ نمونه‌ها آنزیم تک - پلیماز به هر میکروتیوب اضافه شد.

تهیه‌شده از شرکت سیناژن انجام شد. برای انجام واکنش، مخلوط واکنش با توجه به تعداد نمونه‌ها و حجم مورد نیاز (حجم نهایی برای هر واکنش ۲۵ میکرولیتر) مطابق جدول ۵ تهیه و ورتکس شد تا مخلوط

جدول ۴- پرایمرهای استفاده‌شده در واکنش زنجیره‌ای پلیماز

تعداد باز	توالی پرایمر	نوع پرایمر
20	5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'	27F
22	5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'	1492R

جدول ۵- مواد و مقادیر استفاده‌شده در مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیماز

مقدار استفاده‌شده	غلظت نهایی	غلظت اولیه	مواد PCR
2.5ul	1x	10X	PCR buffer
0.5ul	0.2mM	10mM	dNTP
1.5ul	3mM	50mM	Mgcl2
1ul	1uM	25ul	Primer F
1ul	1uM	25ul	Primer R
0.3ul	1.5u	5u/ ul	Taq polymerase
1ul	-	-	Genome
17.2ul	-	-	Distilated Water
25ul	-	-	total volume

جدول ۶- برنامه دمایی تنظیم‌شده برای واکنش زنجیره‌ای پلیماز

مراحل	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد
مرحله اول (واسرشت اولیه)	۹۴	۵	۱
مرحله دوم	واسرشت	۹۴	۱
	اتصال پرایمر	۵۵	۴۰ ثانیه
	سنتز	۷۲	۱/۵ دقیقه
مرحله سوم (سنتز نهایی)	۷۲	۱۰	۱

محصولات PCR توسط شرکت توپاژن انجام شد. داده‌های حاصل از توالی‌خوانی 16SrRNA با استفاده از نرم‌افزار Finch TV مرتب شدند و شناسایی نزدیکان فیلوژنیک باکتری با برنامه Blast در پایگاه اینترنتی NCBI انجام شد. به این ترتیب، نزدیک‌ترین باکتری‌ها با توالی ژنومی مشابه سویه‌های مدنظر تعیین شدند.

برای بررسی درستی عمل واکنش انجام‌شده و تأیید دستیابی به باند 16SrRNA باکتری مدنظر، الکتروفورز انجام شد. درباره نمونه‌هایی که باند آنها ضعیف بود، با استفاده از چندین روش بهینه‌سازی PCR انجام گرفت تا زمانی که باند پررنگ مشاهده شد. پس از مشاهده تک باندهای مشخص و بدون گستردگی و فقدان دایمر پرایمر، خالص‌سازی و تعیین توالی

نتایج

به طور کلی ۲۴ جدایه اکتینوباکتر از نمونه های مختلف جمع آوری شده (شامل آب ساحلی، آب سطحی، آب عمقی، رسوب ساحلی و رسوب عمقی) جداسازی شد.

فراوانی جدایه ها با توجه به نوع نمونه، نوع محیط کشت استفاده شده و عمق نمونه برداری به شرح زیر هستند. از مجموع ۲۴ جدایه، ۱۳ جدایه (۵۴ درصد) از آب و ۱۱ جدایه (۴۶ درصد) از رسوب جدا شدند. ۴۶ درصد جدایه ها با استفاده از محیط ISP5، ۴۱/۵ درصد با استفاده از محیط SCA و ۱۲/۵ درصد با استفاده از محیط ISP3 جدا شدند. این در حالی است که با استفاده از محیط های ISP2، ISP4، ISP6 و ISP7 هیچ نوع اکتینوباکتری جداسازی نشد. همچنین، ۷۱ درصد از جدایه ها از عمق ۵ متر، ۲۱ درصد از عمق ۳ متر و ۸

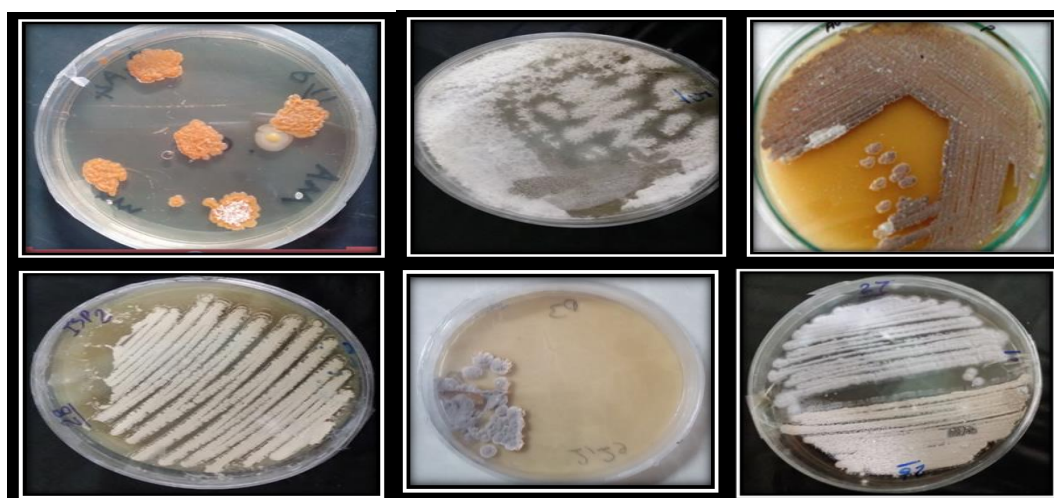
درصد از عمق ۲/۵ متر از سطح دریا جداسازی شدند (جدول ۵). (جدول ۷).

بررسی فعالیت ضد میکروبی جدایه ها: ارزیابی تولید مواد ضد میکروبی در باکتری های جداسازی شده به صورت کیفی (از طریق کشت نقطه ای و بررسی وجود و عدم وجود هاله عدم رشد) انجام گرفت. از میان ۲۴ جدایه اکتینوباکتری، ۱۸ جدایه تولیدکننده آنتی بیوتیک براساس قطر هاله عدم رشد غربالگری شدند (شکل ۱). گفتنی است جدایه ها توانایی تولید مواد ضد میکروبی علیه طیف وسیعی از باکتری های بیماری زا شامل باکتری های گرم مثبت و گرم منفی را داشتند. نتایج نشان دادند هر کدام از ۱۸ جدایه مولد آنتی بیوتیک، حداقل علیه یکی از باکتری های بیماری زا مؤثر بود (جدول ۸ و ۹).

جدول ۷- جدایه ها و نوع محیط جداسازی و عمق جداسازی آنها

شماره نمونه	نام نمونه ها	محیط جداسازی	عمق برداشت نمونه ها (متر)
۱	R1A4	SCA	۵
۲	N3A3	SCA	۳
۳	R1A4(2)	SCA	۵
۴	R1A4(1)	SCA	۵
۵	N2A1	SCA	۳
۶	N4A3	SCA	۵
۷	R4A2	ISP5	۳
۸	N6A4(1)	ISP5	۵
۹	N5A4	ISP5	۵
۱۰	R5A4	ISP5	۵
۱۱	N3A2	ISP5	۳
۱۲	R6A3	ISP5	۵
۱۳	N6A4(2)	SCA	۵
۱۴	N5A1(2)	SCA	۲/۵
۱۵	N5A1(1)	SCA	۲/۵

۳	ISP5	R1A4	۱۶
۵	ISP5	N5A4	۱۷
۵	ISP3	N6A1	۱۸
۵	SCA	N5A1	۱۹
۵	ISP5	R4A2(1)	۲۰
۵	ISP5	R4A2(2)	۲۱
۵	ISP3	N5A4	۲۲
۵	ISP5	R6A3	۲۳
۵	ISP3	R5A4	۲۴



شکل ۱- ویژگی‌های ماکروسکوپی جدایه‌ها روی محیط‌های مختلف

جدول ۸- میزان فعالیت ضدباکتریایی اکتینوباکتری‌های مولد آنتی‌بیوتیک علیه باکتری‌های بیماری‌زای استاندارد

<i>B. subtilis</i>	<i>L. monosytogenes</i>	<i>Sh. dysenteria</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	باکتری‌های مورد آزمایش
							شماره نمونه
-	-	-	-	++	-	-	۲
++	-	+++	-	++	-	-	۳
-	-	+++	-	++	-	-	۴
+++	++	+++	+++	+++	-	-	۵
+++	+++	+++	+++	+++	-	-	۶
+++	++	+++	+++	+++	-	-	۷
+	++	-	-	+	-	-	۸
+++	-	++	+	+	-	-	۹
+++	+	++	-	++	-	-	۱۰
+++	-	+	+	++	-	-	۱۱
+	-	++	-	+	-	-	۱۴
+	-	++	-	+++	-	-	۱۵
+	-	-	-	++	-	-	۱۸

++	-	-	-	+++	-	-	۱۹
++	-	-	-	++	-	-	۲۰
++	-	-	-	+++	-	-	۲۱
+	-	-	-	-	-	-	۲۲
++	-	-	-	++	-	-	۲۴

-: عدم فعالیت آنتی‌باکتریال؛ +: فعالیت آنتی‌باکتریالی ضعیف؛ ++: فعالیت آنتی‌باکتریالی متوسط؛ +++: فعالیت آنتی‌باکتریالی عالی

DNA ژنومی، نسبت جذب نوری در طول موج ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر انجام گرفت که باید بین ۱/۶۵ تا ۱/۸۵ باشد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به‌منظور تکثیر قطعه‌ای 16SrRNA برای ۱۰ نمونه انتخابی انجام و محصول این واکنش روی ژل آگارز الکتروفورز شد. پس از تعیین توالی و مشخص شدن مترادف قطعه‌های ژنومی 16SrRNA مربوط به سویه‌های منتخب، توالی‌های مربوط به آنها توسط نرم‌افزار finch TV مرتب شدند؛ درنهایت، با برنامه BLAST در پایگاه اینترنتی NCBI ارزیابی شدند و درخت فیلوژنتیکی رسم شد (شکل ۳). نتایج به‌دست آمده در جدول شماره ۱۲ آورده شده است.

تعیین هویت سویه‌های منتخب با استفاده از مشاهده برخی از ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی: ویژگی‌های ماکروسکوپی سویه‌های برتر در محیط کشت مختلف بررسی شدند (شکل ۱). برخی از ویژگی‌های میکروسکوپی سویه‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی‌های مختلف تعیین شدند (شکل ۲).

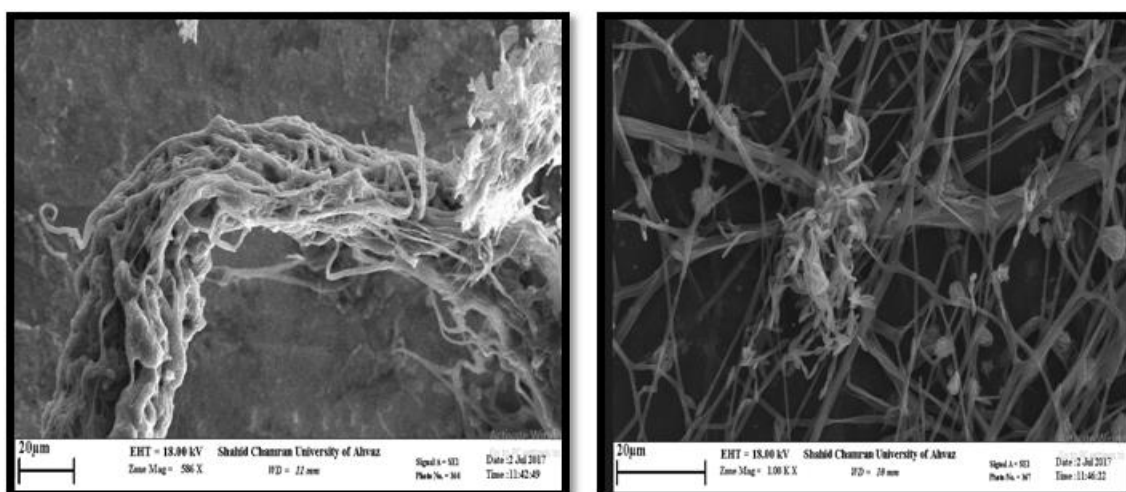
تأیید هویت جدایه‌های به‌دست آمده به روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): به‌منظور اطمینان از هویت جدایه‌های به‌دست آمده به روش خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، از روش PCR نیز استفاده شد. پس از استخراج ژنوم سویه‌های منتخب با روش استخراج Salting out به‌منظور تأیید خالص بودن

جدول ۹- فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های مولد آنتی‌بیوتیک علیه باکتری‌های بیماری‌زای جداشده از نمونه‌های کلینیکی

S. aureus 131	S. aureus 121	S. aureus 141	S. aureus 113	S. aureus (MRSA)	E. coli	Candida albicans	باکتری‌های مورد آزمایش
							شماره نمونه‌ها
-	-	-	-	-	-	-	۲
-	++	++	-	-	-	-	۳
-	++	++	-	-	-	-	۴
+++	++	++	-	++	-	-	۵
+++	+++	++	-	++	-	-	۶
++	+++	++	-	-	-	-	۷
-	-	-	-	-	-	-	۸
-	-	-	-	-	-	-	۹
++	++	++	-	-	-	-	۱۰
-	-	-	-	-	-	-	۱۱
++	++	++	-	-	-	-	۱۴

+++	-	-	-	-	-	-	۱۵
-	-	-	-	-	-	-	۱۸
+++	-	-	-	-	-	-	۱۹
++	-	-	-	-	-	-	۲۰
++	++	+	-	-	-	-	۲۱
-	-	-	-	-	-	-	۲۲
++	++	+	-	-	-	-	۲۴

-: عدم فعالیت آنتی‌باکتریال؛ +: فعالیت آنتی‌باکتریالی ضعیف؛ ++: فعالیت آنتی‌باکتریالی متوسط؛ +++: فعالیت آنتی‌باکتریالی عالی



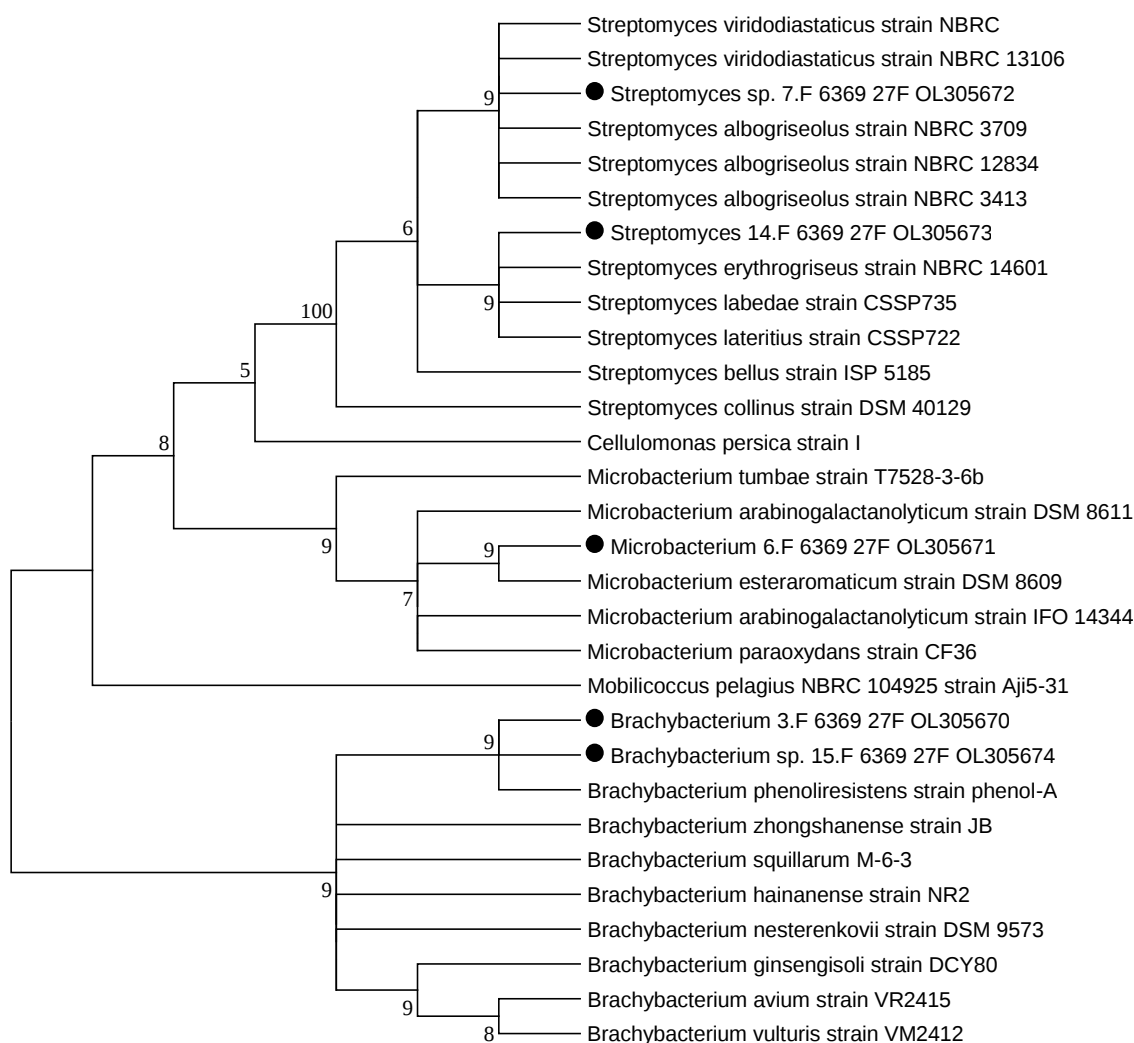
شکل ۲- آرایش زنجیره‌ای سوبه‌های ۴ و ۷

جدول ۱۰- ویژگی‌های ماکروسکوپی سوبه‌های منتخب در محیط کشت‌های مختلف

شماره نمونه	میسلیوم‌های هوایی	میسلیوم‌های سطحی	نوع محیط کشت
۳	White (f2f3f4)	Yellowish-White (foead6)	SCA
۴	White (f2f3f4)	Brilliant-Yellow (fada5e)	SCA
۵	White (f2f3f4)	Strong-Orange-Yellow (eaa221)	ISP2
۶	White (f2f3f4)	Brilliant-Yellow (fada5e)	ISP5
۷	Brownish-Pink	Strong-Brown (80461b)	SCA
۱۰	Grayish-Yellowish-Brown (635147)	Dark-Yellow (ab9144)	ISP2
۱۱	Pale-Yellow-Green (dadfb7)	Strong-Orange-Yellow (eaa221)	ISP2
۱۴	Moderate-Yellowish-Brown (826644)	Strong-Brown (80461b)	ISP2
۱۵	Grayish-Yellow (c2b280)	Strong-Brown (80461b)	ISP2
۲۰	Light-Yellow (f 8de7e)	Strong-Orange-Yellow (eaa221)	ISP2
۲۴	Yellowish-White (foead6)	Brilliant-Yellow (fada5e)	SCA

جدول ۱۱- نتایج تست‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

شماره نمونه آزمون	۳	۴	۵	۶	۷	۱۰	۱۱	۱۴	۱۵	۲۰	۲۴
حرکت	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
رنگ گرم	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
رنگدانه قابل انتشار	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
رنگدانه ملانین	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
هیدرولیز اسکولین	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
احیای نیترات	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
تخمیر اندول	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
تولید H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
اوره آز	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
کاتالاز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ژلاتیناز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
آمیلز	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
پروتئاز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
DNase	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
لیپاز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CMCase	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-



شکل ۳- درخت فیلوژنی ۵ سویه برتر

جدول ۱۲- نتایج تعیین توالی جدایه‌های منتخب

نمونه	جنس‌ها و گونه‌ها	درصد شباهت (%)
۳	<i>Brachybacterium Phenoliresistens</i>	۹۹
۴	<i>Brachybacterium nesterenkovi</i>	۹۸
۵	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	۹۹
۶	<i>Microbacterium Azadirachtae</i>	۱۰۰
۷	<i>Streptomyces sp. strain Vc74B-19</i>	۹۹
۱۰	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	۹۴
۱۱	<i>Streptomyces sp. R7</i>	۸۲
۱۴	<i>Streptomyces sp. strain KMSt15</i>	۱۰۰
۱۵	<i>Streptomyces sp. E4N275b</i>	۹۹
۲۴	<i>Streptomyces sp. HA07011</i>	۱۰۰

بحث و نتیجه گیری

پس از معرفی پنی سیلین، گروه های زیادی از آنتی بیوتیک ها، کشف و بیشتر بیماری های عفونی کنترل شدند. با این حال، به دنبال افزایش مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها در بخش های کلینیکی، مقاومت به آنتی بیوتیک ها روز به روز افزایش یافت. در واقع مقاومت در میکروارگانیسم ها طی چند سال بعد از معرفی آنتی بیوتیک ها به حرفه پزشکی شروع شد و ثابت کرد امکان پیدا کردن درمان نهایی برای تمام بیماری های باکتریایی یک رویا است؛ بنابراین، به طور مدام بشر درگیر مبارزه با مقاومت باکتریایی است و نیاز به توسعه پایدار و تأمین آنتی بیوتیک های جدید برای مقابله با عوامل بیماری زای مقاوم است. اخیراً بسیاری از آنتی بیوتیک هایی که استفاده می شوند از فرآورده های طبیعی مشتق شده اند. این ترکیبات ساختار متنوع و پیچیده ای با گروه های عملکردی فشرده ای دارند که سنتز شیمیایی آنها را بسیار مشکل می کند. سیستم های طبیعی، یک منبع بزرگ برای ترکیبات فعال بیولوژیکی اند (۲۶). همان طور که قبلاً ذکر شد اکتینومیسیت ها یکی از تولیدکننده های مهم آنتی بیوتیک های جدید هستند و با توجه به گسترش تحقیقات انجام شده درباره اکتینومیسیت های خاک، مشخص شده است بیشتر ترکیبات زیستی فعال جدا شده، قبلاً شناسایی شده اند؛ بنابراین، جستجو برای منابع جدید به سمت محیط های آبی جهت دهی شد. ماگاروی^{۳۰} و همکاران (۲۰۰۴) از رسوبات سواحل پاپوا گینه آ، ۱۰۲/اکتینوباکتر جدا کردند که بیشتر جدایه ها فعالیت ضدباکتریایی نشان دادند (۲۷). رمیا^{۳۱} و همکاران (۲۰۰۸)، ۱۷۳/اکتینوباکتر از سواحل

غربی در هند جدا کردند که ۴۷ درصد آنها به عنوان اکتینومیسیت شناسایی شدند و ۲۱ سویه از آنها توانایی تولید آنتی بیوتیک داشتند (۲۸). باسکاران^{۳۲} و همکاران (۲۰۱۰) گزارش دادند از ۴۲ سویه اکتینوباکتر جدا شده، ۵۲/۴ درصد فعالیت ضدباکتریایی نشان داده اند (۲). کفیل زاده^{۳۳} و همکاران (۲۰۱۱)، ۸۳ سویه اکتینوباکتر جدا کردند که ۸۰ درصد آنها فعالیت ضدباکتریایی نشان دادند (۲۹). گبریوهانس^{۳۴} و همکاران در سال ۲۰۱۳، ۳۱ سویه اکتینومیسیت را از آب و رسوبات دریاچه تانا جدا کردند که ۱۳ جدایه، حداقل علیه یک باکتری مورد آزمایش، فعالیت ضدباکتریایی نشان دادند (۱۰). در این مطالعه اثر مواد به دست آمده از مواد تولیدی سویه های جدا شده علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی آزمایش شد. نتایج نشان دادند ۹۵ درصد آنتی بیوتیک های به دست آمده از این سویه ها علیه باکتری های گرم مثبت، ۶۰ درصد علیه باکتری های گرم منفی، ۶۰ درصد علیه هر دو گروه از باکتری ها مؤثرند. اکتینوباکتری های جدا شده توسط والیس^{۳۵} و همکاران (۲۰۱۲)، فعالیت آنتاگونیستی بیشتری علیه باکتری های گرم مثبت مانند استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس نسبت به باکتری های گرم مثبت دیگر نشان دادند (۶). ویجایاکامار^{۳۶} و همکاران (۲۰۱۰)، ۱۹۲/اکتینوباکتر از نمونه های دریایی جدا کردند که ۳۶/۸ درصد آنها فعالیت ضد میکروبی نشان دادند. از جدایه های مولد آنتی بیوتیک، ۸۸ درصد فعالیت ضدباکتریایی، ۶۴ درصد فعالیت ضدقارچی و ۵۲ درصد نیز فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی نشان دادند (۳۰). در مطالعه منادی^{۳۷} و

- (2) Baskaran R, Vijayakumar R, Mohan P. Enrichment method for the isolation of bioactive *actinomycetes* from mangrove sediments of Andaman Islands, India. *Malaysian Journal of Microbiology*. 2011; 7 (1): 26-32.
- (3) Trujillo M.E, Salamanca U.D, Spain S. *Actinobacteria*. 2016; Published online.
- (4) Jabari M, Matroodi S, Zolgharnein H, Sharafi A, Zamani I. Screening, isolation and study of antifungal activity of marine actinomycetes from Deylam nearshore sediments. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2016; 9 (4): 87-94.
- (5) Sapkota A, Thapa A, Budhathoki A, Sainju M, Shrestha P, Aryal S. Isolation, Characterization, and Screening of Antimicrobial-Producing Actinomycetes from Soil Samples. *International Journal of Microbiology*; 2020.
- (6) Valli S, Suvathi Sugasini S, Aysha OS, Nirmala P, Vinoth Kumar P, Reena A. Antimicrobial potential of *Actinomycetes* species isolated from marine environment. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012; 2 (6): 469-473.
- (7) Schumacher RW, Talmage SC, Miller SA, Sarris KE, Davidson BS, Goldberg A. Isolation and structure determination of an antimicrobial ester from a marine sediment derived bacterium. *Journal of natural products*. 2003; 66 (9):1291-1293.
- (8) Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim SK. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiological research*. 2014; 169 (4): 262-78.
- (9) Biji M, Rosamma P. *Marine Actinomycetes as Source of Antimicrobial Compounds and as Probiotics and Single Cell Protein for Application in Penaeid Prawn Culture Systems* (Doctoral dissertation, Cochin University of Science and Technology; 2003.

همکاران (۱۳۹۳)، ۴۸/۵ درصد از اکتینوباکتری‌های جدا شده تولید کننده آنتی‌بیوتیک بودند، ۹۴ درصد جدایه‌های مولد آنتی‌بیوتیک فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت داشتند، ۶۴ درصد علیه باکتری‌های گرم منفی و ۵۸ درصد علیه هر دو گروه باکتری‌ها فعالیت نشان دادند (۲۰). در پژوهش فتاح‌زاده و همکاران (۱۳۹۱)، ۳۸ درصد اکتینوباکتری‌های جداسازی شده توانایی تولید آنتی‌بیوتیک داشتند و ۷۸/۹ درصد از اکتینوباکتری‌های مولد آنتی‌بیوتیک، علیه باکتری‌های گرم مثبت مؤثر بودند؛ اما هیچ کدام از سویه‌های مولد آنتی‌بیوتیک روی باکتری‌های گرم منفی تأثیر بازدارندگی نداشتند (۳۱). در همین راستا این تحقیق به جداسازی اکتینومیسیت‌ها از خلیج فارس پرداخت که همچنان محیط بکری برای تحقیقات میکروبیولوژی محسوب می‌شود و ۲۴ جدایه از شاخه اکتینوباکتر از نمونه‌های آب و رسوب جدا شدند که ۱۸ جدایه یا به عبارتی ۷۵ درصد آنها فعالیت ضدباکتریایی داشتند. یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهند اکتینوباکتری‌های دریایی مفید و متنوعی برای تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیکی از آب‌های خلیج فارس قابل جداسازی‌اند و همچنین با توجه به گسترده‌گی سواحل خلیج فارس در جنوب ایران، این منبع می‌تواند جایگاه جدید و مهمی برای تحقیق در زمینه دستیابی به آنتی‌بیوتیک‌های جدید باشد.

References

- (1) Bhattacharjee MK. *Chemistry of Antibiotics and Related Drugs*. Switzerland: Springer; 2016.

- (10) Gebreyohannes G, Moges G, Sahile S, Nagappan R. Isolation and characterization of potential antibiotic producing *actinomycetes* from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2013; 3 (6): 426-435
- (11) Mohan YS, Sirisha B, Haritha R, Ramana T. Selective screening, isolation and characterization of antimicrobial agents from marine *actinomycetes*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013; 5: 443-449.
- (12) Ramesh S, Rajesh M and Mathivanan N. Characterization of a thermostable alkaline protease produced by marine *Streptomyces fungicidicus* MML1614. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2009; 32 (6): 791-800.
- (13) Janaki T, Nayak BK, Ganesan T. Different Pre-treatment methods in Selective Isolation of *Actinomycetes* from Mangrove sediments of Ariyankuppam, Back water Estuary, Puducherry. *Int. J Adv. Res. Biol. Sci*. 2014; 1 (6): 154-63.
- (14) Shirling ET, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species1. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1966; 16 (3): 313-40.
- (15) Wink JM. Compendium of Actinobacteria from Dr. Joachim M. Wink, University of Braunschweig, an electronic manual including the important bacterial group of the *actinomycetes*; 2012.
- (16) Das S, Lyla PS, Khan SA. Distribution and generic composition of culturable marine *actinomycetes* from the sediments of Indian continental slope of Bay of Bengal. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 2013; 26 (2): 166-177.
- (17) Mohseni M, Norouzi H. Antifungal Activity of *Actinomycetes* Isolated from Sediments of the Caspian Sea. *Journal of Mazandaran University of Medical Science*. 2013; 23 (104): 1-9
- (18) Ramazani A, Moradi S, Sorouri R, Javani S, Garshasbi M. Screening for antibacterial activity of *streptomyces* species isolated from zanzan province, Iran. *Int J Pharm Chem Biol Sci*. 2013; 3(2): 342-9
- (19) Basavaraj KN, Chandrashekhar S, Shamarez AM, Goudanavar PS, Manvi FV. Isolation and morphological characterization of antibiotic producing *actinomycetes*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2010; 9 (3).
- (20) Monadi M. Isolation and identification of antibiotic production *streptomyces* from the northeastern Persian Gulf. [Dissertation] Ahvaz: Shahid Chamran University of Ahvaz; 2015.
- (21) Sivakumar Dr K. *Actinomycetes*. Centre of Advanced Study in Marine Biology Annamalai University. <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=assetKey>. (198-204).
- (22) Mostafa ES, Saad MM, Awad HM, Selim MH, Hassan HM. Optimization conditions of extracellular proteases production from a newly isolated *Streptomyces pseudogrisiolus* NRC-15. *Journal of Chemistry*. 2012; 9 (2): 949-961.
- (23) Pridham T.G, Gottlieb D. The utilization of carbon compounds by some *Actinomycetales* as an aid for species determination. *Journal of bacteriology*. 1948; 56 (1): 107.
- (24) Williams ST, Sharpe ME, Holt JG. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Advanced Drug Delivery of Reviews. Vol 4. Berlin: Springer Nature; 1986.
- (25) Chu X, Li S, Chen W, Asem MD, Duan YQ, Nie GX & et al. *Hamadaea flava* sp. nov, isolated from a soil sample and emended description of the genus *Hamadaea*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2016; 66 (4): 1818-1822.
- (26) Penesyan A, Gillings M, Paulsen IT. Antibiotic discovery: combatting bacterial

- resistance in cells and in biofilm communities. *Molecules*. 2015; 20 (4): 5286-5298
- (27) Magarvey NA, Keller JM, Bernan V, Dworkin M, Sherman DH. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Applied and environmental microbiology*. 2004; 70 (12): 7520-7529.
- (28) Remya M, Vijayakumar R. Isolation and characterization of marine antagonistic actinomycetes from west coast of India. *Medicine and Biology*. 2008; 15 (1): 13.
- (29) Kafilzadeh F, Dehdari F, Namdar N. Isolation and Evaluation of Marine Actinomycetes from Mangrove Forests in South of Iran against Some Human Bacterial Pathogens. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences*. 2013; 13 (1): 69-77.
- (30) Vijayakumar R, Panneerselvam K, Muthukumar C, Thajuddin N, Panneerselvam A, Saravanamuthu R. Optimization of antimicrobial production by a marine actinomycete *Streptomyces afghaniensis* VPTS3-1 isolated from Palk Strait, east coast of India. *Indian journal of microbiology*. 2012; 52 (2): 230-239.
- (31) Fatahzadeh S. Isolation and identification of actinomycetes producing antibiotics from northern Persian Gulf. [Dissertation] Ahvaz: Shahid Chamran University of Ahvaz; 2015.
- 21- Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
 22- *Bacillus subtilis*
 23- *Staphylococcus epidermidis*
 24- *Candida albicans*
 25- Over Layer
 26- Tresner
 27- Backus
 28- Basal medium
 29- Polymerase Chain Reaction
 30- Magarvey
 31- Remya
 32- Baskaran
 33- Kafilzadeh
 34- Gebreyohanes
 35- Vallis
 36- Vijayakumar
 37- Monadi
- 1- Vaxman
 2- *Streptomyces antibioticus*
 3- Abraham
 4- *Streptomyces griseus*
 5- Bonactin
 6- *Streptomyces sp. BD21-2*
 7- Kauai
 8- Oahu
 9- Hawaii
 10- Trioxacarcins A ,B and C
 11- *Streptomyces ochraceus*
 12- *Streptomyces bottropensis*
 13- Grap
 14- *Staphylococcus aureus*
 15- *Escherichia coli*
 16- *Listeria monocytogenes* 1298
 17- *Shigella dysenteriae* 1188
 18- *Salmonella typhi* 1609
 19- *Streptococcus pyogenes* 1762
 20- *Pseudomonas aeruginosa* 1076