https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en

Journal of Microbial Biology
E-ISSN: 3060-7647
14rd Year, Vol. 14, No. 53, 2025 pp. 31-48
Received: 10/07/2024 Accepted: 23/11/2024

(Research Paper)

Screening and phylogenetic analysis of native halophilic Actinomycetes producing exopolysaccharide with antimicrobial activity

Laila Mosawi
Department of Microbiology, Faculty of Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
lila65mosavy@gmail.com

Seyed Soheil Aghaei [1]
Department of Microbiology, Faculty of Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
soheilaghaee@yahoo.com

Mohammad Reza Zand Monfared
Department of Chemistry, Faculty of Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
zand.monfared@gmail.com

Abstract
Exopolysaccharides (EPSs) play a crucial role in the resistance of microorganisms to various stresses, including salinity. The aim of this study was to screen the native halophilic strains of *actinomycetes*, which produce antimicrobial EPSs, isolated from the rhizosphere soils of Qom Salt Lake. *Actinomycete* isolates were obtained using ISP2 medium with different salt concentrations. A BHI liquid medium containing 2% sucrose was used for the preparation of EPS. The antimicrobial activity of the EPSs was evaluated using the agar well diffusion method, and the MIC and MBC values were determined using a 96-well microplate assay. The structure of the isolated EPS was analyzed by FTIR, HPLC and UV-Vis spectroscopy. In addition, their thermal properties and stability were evaluated by TGA. The selected isolates were identified on the basis of morphological, physiological and biochemical characteristics of EPS, as well as the 16S rRNA molecular method. A total of 30 native strains of halophilic *actinomycetes* were isolated in this study. Two of these isolates showed the ability to produce EPS with antimicrobial properties. The highest antimicrobial activity of EPS was observed against pathogenic strains at a concentration of 2% and a volume of 200 µl. FTIR results confirmed the presence of hydroxyl groups, while HPLC analysis showed that the heteropolysaccharide structure consisted of six monomers. UV-Vis analysis confirmed the presence of carboxyl, carbonyl, amine and ester functional groups. TGA showed acceptable thermal stability. Phylogenetic analysis of the isolates confirmed that the strain belonged to the genus *Streptomyces* with 100% similarity. The results of this study suggest that the native halophilic strain of *Streptomyces* isolated from the rhizosphere soils of Qom Salt Lake could serve as an important source for the production of EPS with various biotechnological applications, particularly in the food and pharmaceutical industries.

Keywords: Exopolysaccharide, Actinobacteria, Halophilic native strain, Antimicrobial properties

[1] Corresponding Author

3060-7647/ © 2025 The Authors
This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).
Mosawi L, Aghaei S S, Zand Monfared M. R. Screening and phylogenetic analysis of native halophilic Actinomycetes producing exopolysaccharide with antimicrobial activity. *Journal of Microbial Biology*. 2025; 14(53): 31-48.
10.22108/bjm.2024.142099.1602

Introduction

Exopolysaccharides (EPS) play a significant role in the resistance of microorganisms to various stresses, including salinity. In recent decades, microbial EPS have replaced plant polysaccharides and are produced in larger quantities and with higher purity. Screening for new sources of microbial EPSs could contribute to the development of new antibacterial compounds with multiple potentials. EPSs could be used as preservatives for long-term storage of food products. They also exhibit bioactive properties and have a wide range of potential applications in modern biotechnology, particularly in medicine and pharmaceuticals, where they can act as anti-allergic or antiviral agents, as well as in medical applications. Halophilic EPS are stable at high temperatures, elevated salinity and high pH levels. These unique properties of EPS produced by halophilic microorganisms can offer a wide range of applications in various industries. Saline environments are typically extreme habitats characterized by high salt concentrations and harsh living conditions. Consequently, to survive in these challenging environments, many halophiles produce EPS as a protective strategy to adapt to their environment. EPS are high molecular weight carbohydrate polymers, composed mainly of monosaccharides and their derivatives. These polysaccharides are secreted into the external environment to maintain the osmotic environment in the microbial cell, helping to protect bacteria and increase their survivability. In recent decades, EPS produced by halophilic bacteria have received considerable attention due to their structural and functional diversity. While many halophilic bacteria can produce EPS with different compositions, structures and functions, the majority of these EPS are heteropolysaccharides composed of mannose and glucose. The extensive chemical and structural diversity of EPS makes them suitable for a wide range of applications in a variety of industries, including food, pharmaceutical, biomedical, cosmetics, bioremediation and wastewater treatment. They can also act as gelling agents, stabilizers, emulsifiers and viscosity enhancers. In addition, certain halophilic EPSs exhibit beneficial health effects such as antioxidant, anticancer and anti-cytotoxic properties. Halophilic EPS can be used in bioremediation as EPS flocculants and heavy metal scavengers. Actinobacteria, a group of ubiquitous Gram-positive bacteria, are well known for the production of primary and secondary metabolites with a wide range of applications. These bacteria are also a promising source of important industrially produced enzymes. A significant proportion of antibiotics on the market are derived from actinobacteria. They produce enzyme inhibitors for the treatment of cancer and for improving the immune system. Actinobacteria can degrade a wide range of hydrocarbons, pesticides, aliphatic and aromatic compounds. They carry out microbial transformations of organic compounds, an area with good commercial value. Many members of the genus Actinobacteria have the potential to be used in the conversion of agricultural and urban wastes into high-value chemical products. Actinobacteria are also important in plant biotechnology, where strains with antagonistic activity against plant pathogens are useful in biocontrol. The metabolic processes of these bacteria are therefore an excellent subject for research. The main objective of this study was to isolate and screen indigenous halophilic actinomycetes producing antimicrobial EPSs from the rhizosphere soils of Salt Lake in Qom Province, Iran.

Materials and methods:

Soil samples were collected from the rhizosphere of plants under sterile conditions. The initial isolation of actinobacterial strains was carried out using a specific ISP2 medium with salt concentrations of 5%, 10%, 15%, 20% and 25%. During the initial screening, EPS-producing strains were selected based on macroscopic (appearance of slimy colonies) and microscopic examination. Brain heart infusion liquid medium containing 2% sucrose was used for EPS production and incubation was carried out in a shaker incubator with shaking at 200 rpm at 28-30 °C for 9 days. The antimicrobial activity of EPS against pathogenic strains including *Staphylococcus aureus* ATCC 10690, *Escherichia coli* ATCC 10708, *Salmonella typhimurium* ATCC 10707, and *Bacillus subtilis* ATCC 1080 was evaluated using the agar well diffusion method. The minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration values were determined using a 96-well microplate method. The structure of the selected EPS isolates was investigated by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), high performance liquid chromatography (HPLC), and ultraviolet-visible (UV-Vis) spectrophotometry, and their thermal stability was evaluated by thermogravimetric analysis (TGA). In addition, for the initial identification of the isolated strains, their morphological, physiological and biochemical characteristics were evaluated. This evaluation included catalase, oxidase, sugar fermentation, starch hydrolysis, urease, gelatin, casein and Tween hydrolysis, as well as nitrate reduction, motility, DNase activity and indole and melanin production. The isolate with the highest EPS yield and antimicrobial activity was selected for molecular identification using the 16S rRNA gene. Molecular identification analysis was performed according to standard methods using universal primers.

10.22108/bjm.2024.142099.1602

Discussion of Results & Conclusions

In the present study, 30 indigenous moderately halophilic actinomycete strains were isolated. Initial screening showed that two isolates were able to produce EPS with antimicrobial properties. The highest inhibition zone diameters resulting from the antimicrobial activity of EPS from the selected isolate, at a concentration of 2% and volume of 200 µl against *B. subtilis*, *E. coli*, *S. typhimurium* and *S. aureus* were 20, 18, 15 and 15 ml, respectively. FTIR results indicated the presence of hydroxyl groups in the structure of EPS from the selected isolate. HPLC analysis confirmed a heteropolysaccharide structure composed of six different monomers: rhamnose, mannose, glucose, fructose, galactose and arabinose. UV-Vis analysis at a wavelength of 267 nm confirmed the presence of carboxyl, carbonyl, amine and ester functional groups. TGA showed that the EPS under investigation had an acceptable thermal stability. Phylogenetic analysis of the target isolates confirmed that the indigenous strain isolated with 100% similarity belonged to the genus *Streptomyces*. The findings of this study reveal that indigenous halophilic actinomycetes isolated from the rhizosphere soils of Qom Salt Lake could serve as a significant source for the production of safe microbial EPS with strong antimicrobial properties and diverse biotechnological applications, especially in the food and pharmaceutical industries.

10.22108/bjm.2024.142099.1602

زیست‌شناسی میکروبی
سال چهاردهم، شماره ۵۳، ۱۴۰۴، صفحه ۳۱-۴۸
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۰۳
مقاله پژوهشی

غربالگری و آنالیز فیلوژنتیکی اکتینومیست شورپسند بومی تولیدکنندهٔ اگزوپلی‌ساکارید با فعالیت ضدمیکروبی

لیلا موسوی
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم.
lila65mosavy@gmail.com

سید سهیل آقائی *
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم.
soheilaghaee@yahoo.com

محمدرضا زند منفرد
گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم.
zand.monfared@gmail.com

چکیده
اگزوپلی‌ساکاریدها نقش مهمی در مقاومت میکروارگانیسم‌ها در مقابل انواع تنش‌ها ازجمله شوری دارند. هدف اصلی این تحقیق جداسازی و غربالگری سویه‌های بومی *اکتینومیست‌های* نمک‌دوست مولد اگزوپلی‌ساکارید ضدمیکروبی از خاک ناحیه ریزوسفری گیاهان دریاچه نمک قم بود. جداسازی ابتدایی *سویه‌های اکتینوباکتری* با استفاده از محیط کشت ISP2 دارای غلظت نمک‌های مختلف انجام شد. برای تولید اگزوپلی‌ساکارید از محیط کشت مایع BHI حاوی ۲ درصد ساکارز استفاده شد. فعالیت ضدمیکروبی با روش انتشار در آگار و MIC و MBC با روش میکروپلیت ۹۶ چاهکی تعیین شد. ساختار اگزوپلی‌ساکارید با آزمون‌های FTIR، HPLC و UV-Vis و آنالیز حرارتی و پایداری با آزمون TGA بررسی شد. جدایه‌های منتخب براساس خصوصیات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی و روش مولکولی 16S rRNA شناسایی شدند. در این تحقیق ۳۰ سویه بومی نمک‌دوست نسبی *اکتینومیست* جداسازی شد. ۲ جدایه دارای توانایی تولید اگزوپلی‌ساکارید با خاصیت ضدمیکروبی بودند. بیشترین فعالیت ضدمیکروبی اگزوپلی‌ساکارید علیه سویه‌های بیماری‌زا درغلظت ۲ درصد و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر به دست آمد. نتایج حاصل از FTIR حضور عوامل هیدروکسیل و آنالیز با روش HPLC ساختار هتروپلی‌ساکاریدی شامل ۶ مونومر را تأیید کرد. آنالیز با روش UV-Vis وجود گروهای عاملی کربوکسیل، کربونیل و آمین و استری را ثابت کرد. بررسی آزمون TGA پایداری حرارتی قابل قبول را نشان داد. آنالیز فیلوژنتیکی جدایه ها تأیید کرد سویه جداشده با ۱۰۰ درصد تشابه متعلق به جنس *استرپتومایسس* بود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد جدایه استرپتومیست شورزی بومی دریاچه نمک قم می‌تواند به‌عنوان منبع قابل ملاحظه‌ای برای تولید اگزوپلی‌ساکارید با کاربردهای زیست‌فناوری مختلف به‌ویژه در صنایع غذایی و دارویی مطرح باشد.

واژگان کلیدی: غربالگری، اگزوپلی‌ساکارید، اکتینوباکتری، نمک‌دوست بومی، خواص ضدمیکروبی

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

موسوی، لیلا، آقایی، سید سهیل، زند منفرد، محمد رضا. غربال گری و آنالیز فیلوژنتیکی آکتینومیست شورپسند بومی تولید کننده اگزوپلی ساکارید با فعالیت ضد میکروبی. *زیست شناسی میکروبی*، ۱۴۰۴؛ ۱۴(۵۳): ۳۱-۴۸. doi: 10.22108/bjm.2024.142099.1602

3060-7647/ © 2025 The Authors
This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

مقدمه

در سال‌های اخیر توجه پژوهشگران به استفاده از متابولیت‌های باکتریایی به‌علت تنوع بالا، دوستدار محیط زیست بودن و قابلیت استفاده در صنایع مختلف بیشتر شده است (۱, ۲). اگزوپلی‌ساکاریدها از واحدهای قندی عمدتاً گلوکز، گالاکتوز و رامنوز در نسبت‌های مختلف تشکیل شده‌اند و در دو گروه هموپلی ساکاریدها و هتروپلی‌ساکاریدها قرار می‌گیرند (۳). در دهه‌های اخیر پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی ریزموجودات جایگزین پلی‌ساکاریدهای گیاهی شده‌اند که به مقدار فراوان و با درجه خلوص بالاتری به دست می‌آیند. توانایی تولید اگزوپلی‌ساکارید در میان باکتری‌ها بیشتر از قارچ‌ها و مخمرها است (۴). توجه ویژه به EPS (Exopolysaccharide) اغلب به‌دلیل تنوع آنها است. این تنوع، با تفاوت در تعداد و انواع عملکرد گروه‌های متصل به EPS است که پلیمرهایی با خواص مختلف ایجاد می‌کنند؛ درنتیجه، به آنها اجازه می‌دهد دارای یک طیف گسترده‌ای از عملکردهای فیزیولوژیکی درون‌ریز موجودات مانند حفظ مواد مغذی برای جلوگیری از گرسنگی، تشکیل بیوفیلم برای ایجاد روابط همزیستی یا برای محافظت در برابر خشک شدن و سموم یا آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط اطراف آنها باشد (۵). پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی ریزموجودات هالوفیل دارای ثبات در دما، شوری و حتی pH بالا هستند. این ویژگی‌های منحصربه‌فرد EPS تولیدشده توسط هالوفیل‌ها، برنامه‌های کاربردی متنوعی را در زمینه‌های مختلف صنعت ارائه می‌دهد (۶). در سال‌های اخیر ترکیبات متعدد جدید با خواص ضدمیکروبی کشف شدند که بخش عمده‌ای از آنها توسط *اکتینوباکتری‌ها* تولید می‌شوند. روش‌های جدید و فناوری‌های کشف محصولات طبیعی جدید نظیر پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی از منابع میکروبی موجود در نواحی شور از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. در شرایط آزمایشگاهی پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی تولیدشده توسط *L.rhamnosus* جداشده از شیر مادر فعالیت ضدباکتریایی چشمگیری را در برابر عوامل بیماری‌زا مانند *سالمونلا انتریکا سروار تیفی موریوم* و *E.coli* از خود نشان داده‌اند (۷). همچنین اگزوپلی‌ساکارید تولیدشده توسط *Bifidobacterium longum* تقسیم سلول عوامل بیماری‌زای باکتریایی یعنی *Vibrio parahaemolyticus*، *Typhimurium Salmonella*، *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* را مختل می‌کند. از طرف دیگر، اگزوپلی‌ساکارید *Lactobacillus gasseri hetero* فعالیت ضدباکتریایی را در برابر چندین مورد از عوامل بیماری‌زا نشان داده است؛ ازجمله *لیستریا مونوسایتوژنز* MTCC ۶۵، که به‌طور چشمگیری بدین وسیله مهار می‌شود. اگزوپلی‌ساکارید تولیدشده توسط *L. plantarum C70* جدا شده از شیر شتر باعث کاهش رشد ۲ تا ۳ برابری باکتری‌های بیماری‌زای *E .coli* و *S .aureus* در شرایط آزمایشگاهی شدند. اگزوپلی‌ساکارید تولیدشده توسط *Lactobacillus kefiranofaciens DN1* فعالیت ضدباکتری و فعالیت های باکتریواستاتیک علیه *Listeria Monocytogenes* و *S. enterica serovar Enteritidis* ازخود نشان می‌دهند که تأثیر آن متناسب با غلظت پلی‌ساکارید خارج سلولی است. همچنین، EPS تولیدشده از *spp Lactobacillus*، اثر آنتی‌باکتریال چشمگیری را در برابر *Salmonella enterica* و *Micrococcus luteus Ca6* از خود نشان می‌دهد. پلی‌ساکارید خارج سلولی *لاکتوباسیلوس* حاوی چندین نوع گروه‌های عملکردی است؛ برای مثال، کربونیل، فسفات و گروه‌های هیدروکسیل که به نظر نقش اساسی در اعمال اثرات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی EPS دارند. مطالعات اخیر، اهمیت نقش آنتاگونیستی EPSها برای عوامل ضدمیکروبی مانند ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها را

10.22108/bjm.2024.142099.1602

آشکار کرده است. همچنین، از پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی برای درمان آلودگی‌های ناشی از باکتری و ویروس، افزایش پاسخ‌های واکسیناسیون و کاهش آلرژی گزارش شده است. طول زنجیره EPS و وزن مولکولی آنها بر فعالیت‌های بیولوژیکی آنها مانند فعالیت‌های ضدمیکروبی تأثیر می‌گذارند. حضور گروه‌های فسفات و آهنی می‌تواند فعالیت بیولوژیکی ضدمیکروبی و ضدسرطانی EPS را بهبود ببخشد (۸).

با توجه به مطالب اشاره‌شده و اهمیت تنوع و خواص زیستی و دارویی پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی ریزموجودات، هدف تحقیق حاضر، غربالگری و جداسازی *اکتینومایست*‌های شورپسند خاکزی دریاچه نمک قم با توانایی تولید EPS و ارزیابی اثرات ضدباکتری این متابولیت‌های ارزشمند است. شایان ذکر است این تحقیق برای اولین‌بار در کشور در رابطه با دریاچه نمک قم انجام شد. از مهم‌ترین جنبه‌های نوآوری و کاربردی این طرح تحقیقاتی دستیابی به پلی ساکاریدهای خارج سلولی با خواص ضدباکتریایی خواهد بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

برای جمع‌آوری نمونه‌های خاک، ابتدا بخش‌های سطحی (حدود ۵ سانتی‌متر) خاک‌های اطراف ریشه گیاهان و درختچه‌های (گز، سودا، پرند، سالسولا، درمنه بیابانی، اشنان و تاغ زرد) مسیر دریاچه نمک قم (میسله) کنار زده شدند و با بیلچه کاملاً تمیز و استریل از عمق ۱۵ تا ۳۰ سانتی‌متر و به‌طور تصادفی حدود ۱۰۰ نمونه خاک برداشت شد و در بسته‌های پلی‌تن استریل قرار داده شدند. سپس تمامی نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس به آزمایشگاه انتقال یافتند و تاریخ و محل نمونه‌گیری روی نمونه‌ها درج شد (۹).

غربالگری و شناسایی اولیه جدایه‌ها

برای جداسازی *اکتینوباکترها*، نمونه‌های خاک با روش رقت‌سازی متوالی رقیق شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از رقت هـای ۲- تا ۱۰- در محیط کشت اختصاصی ISP_2 (pH ۷/۲ با درصد نمک‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد) کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۱۴-۷ روز در دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه نگهداری شدند. سویه‌هایی با کلنی‌ها و ظاهری پودری و خشک جداسازی شدند. شناسایی اولیه براساس مشخصات ظاهری کلنی، اندازه کلنی، تولید اسپور و نیز مشخصات میکروسکوپی میسلیوم هوایی، وضعیت اسپور و شکل انشعابات اسپور انجام شد (۱۰).

ارزیابی تولید پلی‌ساکارید خارج سلولی در جدایه‌های *اکتینومیست* نمک‌دوست

جدایه‌ها در ارلن مایر حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط BHI مایع با ۲ درصد ساکارز تلقیح شدند. ارلن‌ها به مدت ۹ روز در دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند (۱۱).

استخراج اگزوپلی‌ساکارید در جدایه‌های منتخب

در این مرحله محیط کشت با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس به سوپرناتانت تری‌کلرو استیک اسید (۵ درصد) اضافه شد و یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده و دوباره با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۳ برابر حجم مایع رویی اتانول مطلق، اضافه و یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پلی‌ساکاریدهای رسوب داده شده با سرعت ۱۲۰۰۰ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. دو بار با استون شسته شد و سپس در زیر هود برای خشک‌شدن قرار داده شد (۱۲).

10.22108/bjm.2024.142099.1602

هیدرولیز پلی‌ساکارید خارج سلولی جدایه‌های منتخب

۰/۰۱ گرم پلی‌ساکارید خارج سلولی با ۱/۲۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۷۲ درصد حل شد و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه قرار داده شد. سپس ۱۳ میلی‌لیتر آب دیونیزه به محلول مدنظر اضافه شد. محلول به مدت ۴ ساعت داخل حمام آب گرم دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس محلول در دمای محیط قرار داده شد تا خنک شود. سپس ۳/۱ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۳۲ درصد و ۷/۶۵ میلی‌لیتر متانول به نمونه اضافه شد. حجم نهایی باید ۲۵ میلی‌لیتر باشد. مابقی محلول با اتانول به حجم رسانده شد (۱۳).

بررسی فعالیت ضدمیکروبی پلی‌ساکارید خارج سلولی جدایه‌های منتخب

برای ارزیابی خاصیت ضدمیکروبی از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران باکتری‌های بیماری‌زای *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 10690، *اشریشیا کلای* ATCC 10708، *سالمونلا تیفی موریوم* ATCC 10707 و *باسیلوس سوبتیلیس* ATCC 1080 استفاده شد. فعالیت ضدمیکروبی پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی جدایه‌های منتخب (کشت ۲۴ ساعته و با غلظت نیم مک فارلند) به روش چاهک‌گذاری روی محیط مولر هینتون آگار (با اندکی تغییر) انجام شد. از آب دیونیزه به‌عنوان حلال اگزوپلی‌ساکارید استفاده شد و با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ درصد به مقدار ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه شدند. یک چاهک حاوی آب دیونیزه به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، گرماگذاری و ازنظر وجود هاله عدم رشد بررسی شدند (۱۴).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی به روش رقیق‌کردن در محیط مایع میکرو

در این مرحله از میکروپلیت‌های ۹۶ چاهک از جنس پلی‌استیرن استفاده شد. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط مایع مولر هینتون براث اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول اگزوپلی‌ساکارید که با غلظت ۰/۱ گرم اگزوپلی‌ساکارید در ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه استریل تهیه شده است، درون چاهک اول هر ردیف ریخته و با چاهک‌های بعد سریال رقت شد. این کار به‌طور متوالی تا چاهک شماره ۱۰ تکرار شد و درنهایت ۱۰۰ میکرولیتر اضافی دور ریخته شد. سپس ۱۵-۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نیم مک فارلند باکتری بیماری زا (کشت ۲۴ ساعت) مدنظر به چاهک‌ها اضافه شد. چاهک برای کنترل مثبت (بدون EPS) و منفی (بدون باکتری) در نظر گرفته شد. میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گرماگذاری و میزان رشد در دستگاه میکروپلیت ریدر (Epoch2c- آمریکا) با طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. کمترین غلظت از محلول اگزوپلی‌ساکارید که مانع رشد باکتری‌های مورد آزمایش شد، به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی گزارش شد (۱۵).

شناسایی بیوشیمیایی جدایه منتخب

برای شناسایی اولیه جدایه‌های منتخب از ویژگی‌های مورفولوژی کلنی، رنگ‌آمیزی گرم و سایر آزمون‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی براساس کتاب مرجع برجی استفاده شد (۱۶).

تعیین ساختار اگزوپلی‌ساکارید با آزمون FTIR

ساختار اگزوپلی‌ساکارید تولیدشده ازطریق دستگاه طیف‌سنجی تبدیل فوریه- مادون قرمز (FT-IR) Rayleigh مدل WQF-510 ساخت کشور چین تجزیه و تحلیل شد.

10.22108/bjm.2024.142099.1602

در این آزمون باندهای جذبی مادون قرمز، اجزا و ساختارهای مولکولی خاص مشخص می‌شوند. برای انجام این تکنیک ۱ تا ۲ میلی‌گرم پودر اگزوپلی‌ساکارید خشک‌شده با ۱۰۰ میلی‌گرم پتاسیم برماید سائیده شد و تحت فشار ۷۵۰۰ کیلوگرم به مدت ۳۰ ثانیه در دستگاه FTIR قرار داده شد (۱۲).

بررسی اگزوپلی‌ساکارید جدایه منتخب با آزمون HPLC

برای این منظور ۵ میلی‌گرم اگزوپلی‌ساکارید هیدرولیزشده در آب، حل و با فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ میکرون صاف شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از آن را به دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) شرکت Knauer مدل Pump k-100 آشکارساز K-2301 ستون C18 با ابعاد ۴/۶×۲۵۰ تزریق شد. کروماتوگرام به‌دست‌آمده با استانداردها برای شناسایی تحلیل شد. فاز متحرک استونیتریل / آب با نسبت ۲۰/۸۰ حجمی سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه انجام شد (۱۷).

بررسی اگزوپلی‌ساکارید جدایه منتخب با آزمون حرارتی (TGA)

برای آزمون حرارتی و پایداری اگزوپلی‌ساکارید جدایه منتخب، نمونه در ظرف Al_2O_3 قرار داده شد و با سرعت گرمایش ۱۰ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه در محدوده ۱۰۰۰-۳۰ درجه، گرم و نمودار آن بررسی شد (۱۸).

بررسی اگزوپلی‌ساکارید جدایه منتخب با آزمون طیف نورسنجی (UV-Vis)

برای بررسی انتقالات الکترونی و بررسی میزان متابولیت، از طیف‌سنجی جذبی مرئی – فرابنفش استفاده شد (۱۱).

شناسایی مولکولی جدایه منتخب

به‌منظور تکثیر ژن *16s rRNA* از پرایمرهای یونیورسال 8F (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG- 3') و 1541R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') استفاده شد. پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی استفاده‌شده در این واکنش، سکانس نوکلئوتیدی ژن s *16rRNA* است که محصول ۱۵۲۰ جفت‌باز را ردیابی می‌کند. برنامه PCR با استفاده از آنزیم تک‌پلیمراز و به روش زیر انجام گرفت:

دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه انجام شد. به‌منظور جداشدن دو رشته DNA الگو از یکدیگر ۳۰ سیکل که شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای دناتوراسیون، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد به‌منظور اتصال پرایمرها به توالی DNA و ۴۰ ثانیه طویل‌سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. نمونه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ران‌کردن روی ژل، برای اثبات وجود باندهای مدنظر انجام شد. باند تشکیل‌شده برای تشخیص این ژن روی ژل آگارز ۱۵۲۰ جفت‌باز است.

تعیین توالی ژن

بعد از خالص‌سازی برای تمامی نمونه‌های مثبت OD هریک از نمونه‌ها خوانده شد. سپس ارسال محصول PCR به کمپانی میکروسینس سوئیس برای تعیین توالی به روش سنگر ازطریق شرکت توپازژن با حجم حدود ۱۰ میکرولیتر و غلظت (۳۰ نانوگرم بر میکرولیتر) از هر نمونه انجام شد؛ درنهایت بررسی سکانس‌ها با برنامه CLC Sequence Viewer با سکانس‌های اورجینال موجود در بانک اطلاعاتی NCBI ثبت شد (۱۹).

10.22108/bjm.2024.142099.1602

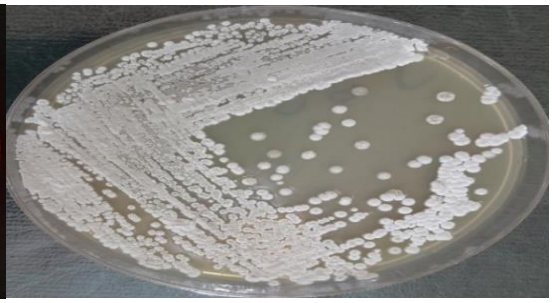
نتایج

غربالگری و جداسازی اولیه *اکتینومیست‌ها* از نمونه‌های خاک

در این تحقیق ۳۰ سویه *اکتینوباکتر* از نمونه‌های خاک جدا شدند. از این تعداد ۴ جدایه توانستند نمک ۱۰ درصد را تحمل کنند و ۳ جدایه قادر به تولید اگزوپلی‌ساکارید بودند. در مراحل بعدی جدایه‌ای انتخاب و ارزیابی شد که اگزوپلی‌ساکارید آن خاصیت ضدمیکروبی نشان داد.

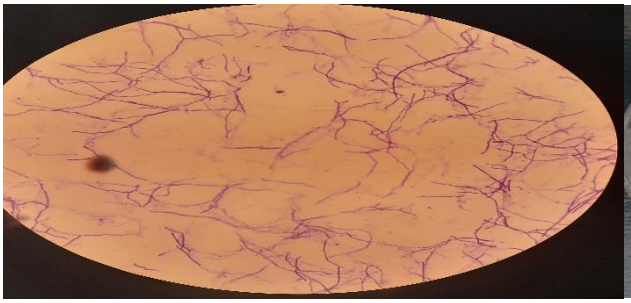
شناسایی ماکروسکوپی و میکروسکوپی

جدایه‌های *اکتینوباکتر* دارای کلنی‌های سفت و گچی بودند (شکل-۱). مشخصات میکروسکوپی *اکتینوباکترها* در شکل-۲ که حاوی میسلیوم هوایی بودند و همچنین وضعیت اسپور و شکل انشعابات اسپور نشان داده شده‌اند.



شکل ۱- تصویر ماکروسکوپی کلنی‌های *اکتینوباکتر* جدایه منتخب

Figure 1- Macroscopic image of *Actinobacteria* colonies of the selected isolate



شکل ۲- تصویر میکروسکوپی رنگ‌آمیزی گرم بزرگ‌نمایی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری اکتینوباکتر منتخب

Figure 2-Microscopic image of gram staining, magnification of 100 optical microscopes of selected *Actinobacteria*

ویژگی‌های بیوشیمیایی جدایه منتخب *اکتینومیست*

جدایه منتخب کاتالاز مثبت و محدوده رشد آن در سدیم کلراید (۱۰٪-V/W) است. محدوده دمایی جدایه در دمای ۳۰ -۲۸ درجه سانتی‌گراد و بهینه pH آنها ۷/۲ بود. هیدرولیز ژلاتین و نشاسته، منفی و اوره و لستیناز مثبت بود. سایر اطلاعات در جدول-۱ آمده است. با توجه به نتایج آنالیز بیوشیمیایی نام جنس باکتری *استرپتومایسس* تعیین شد.

تولید اگزوپلی‌ساکارید جدایه منتخب

سویه منتخب قادر به تولید ۳-۲/۸ گرم بر لیتر بیشترین تولید اگزوپلی‌ساکارید در محیط BHI براث با ۲ درصد ساکارز به مدت ۹ روز در انکوبه شیکردار در دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد با ۲۰۰ rpm مشاهده شد (شکل-۳).

بررسی خاصیت بازدارندگی اگزوپلی‌ساکارید جدایه منتخب

نتایج خواص ضدمیکروبی اگزوپلی‌ساکارید تولیدشده توسط جدایه با کد شماره ۱، در غلظت ۲۰۰ درصد (۲۰۰ میکرولیتر)، هاله عدم رشد در باکتری‌های بیماری زای *Staphylococcus aureus* ۱۵ میلی‌متر، *Escherichia coli* ۱۸ میلی‌متر، *Salmonella Typhimurium* ۱۵ میلی‌متر و *Bacillus subtilis* در غلظت‌های ۲۰۰ درصد و ۱۵۰ درصد (۲۰۰ و ۱۵۰ میکرولیتر) به‌ترتیب ۲۵ و ۱۵ میلی‌متر هاله عدم رشد مشاهده شد. بیشترین هاله عدم رشد در *باسیلوس سوبتیلیس* مشاهده شد (شکل-۴).

10.22108/bjm.2024.142099.1602

جدول ۱- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی جدایه منتخب

Table 1- Results of biochemical tests of selected isolates

نوع آزمون	نتایج	نوع آزمون	نتایج	نوع آزمون	نتایج
کاتالاز	+	هیدرولیز نشاسته	–	فروکتوز	–
اکسیداز	–	لستیناز	+	گزیلوز	+
هیدرولیز اوره	+	احیای نیترات	+	رافینوز	+
احیا نیترات	–	ژلاتیناز	–	آرابینوز	+
حرکت	–	تولید ملانین	–	ساکارز	+
اندول	–	DNase	–	محدوده pH	۷/۲
تجزیهٔ توئین	–	گلوکز	–		

شکل ۳- اگزوپلی‌ساکارید خشک‌شده جدایه منتخب

Figure 3- Dried EPS of the selected isolate

باکتری *باسیلوس سوبتیلیس*

باکتری *سالمونلا تیفی موریوم*

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

باکتری *اشریشیا کلای*

شکل ۴- هاله عدم رشد در سویه‌های مورد آزمون

Figure 4- Inhibition zone in the test strains

Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus, Escherichia coli

10.22108/bjm.2024.142099.1602

جدول ۲- نتایج آزمون MIC اگزوپلی‌ساکارید جدایه منتخب

Table 2- The results of the MIC test of the selected isolate EPS

نوع ماده	۱۰	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	چاهک
اگزوپلی‌ساکارید	۰/۰۵ گرم بر میلی‌لیتر	۰ گرم بر میلی لیتر	۰/۰۰۰۳ گرم بر میلی‌لیتر	۰/۰۰۰۷ گرم بر میلی‌لیتر	۰/۰۰۱ گرم بر میلی‌لیتر	۰/۰۰۳ گرم بر میلی لیتر	۰/۰۰۶ گرم بر میلی لیتر	۰/۰۱۲ گرم بر میلی لیتر	۰/۰۲۵ گرم بر میلی لیتر	۰/۰۵ گرم بر میلی لیتر	غلظت اگزوپلی‌ساکارید
اگزوپلی‌ساکارید	کنترل –	کنترل +	+	+	+	+	+	+	–	–	*اشریشیا کلای*
اگزوپلی‌ساکارید	کنترل –	کنترل +	+	+	+	+	+	–	–	–	باسیلوس سوبتیلیس
اگزوپلی‌ساکارید	کنترل –	کنترل +	+	+	+	+	+	+	–	–	*سالمونلا تیفی موریوم*
اگزوپلی‌ساکارید	کنترل –	کنترل +	+	+	+	+	+	+	+	–	*استافیلوکوکوس اورئوس*

نتایج MIC-MBC

کمترین غلظت از محلول اگزوپلی‌ساکارید مدنظر که مانع رشد باکتری‌های بیماری‌زا شد، به‌عنوان MIC گزارش شد. نتایج MIC در جدول-۲ آورده شده‌اند.

باکتری *Escherichia coli* در چاهک اول و دوم رشد نکرد و چاهک دوم (۰/۰۲۵ گرم بر میلی‌لیتر) که چاهک ماقبل چاهک رشد است، به‌عنوان MIC گزارش شد. *Salmonella Typhimurium* نیز مشابه *Escherichia coli* جواب داد. باکتری *Staphylococcus aureus* در چاهک اول (۰/۰۵ گرم بر میلی‌لیتر) رشد نداشت. باکتری *Bacillus subtilis* در ۳ چاهک اول رشد نداشت و چاهک سوم (۰/۰۱۲ گرم بر میلی‌لیتر) که چاهک ماقبل چاهک رشد است، به عنوان MIC گزارش شد.

آنالیز کمی اگزوپلی‌ساکارید طیف‌سنجی FTIR

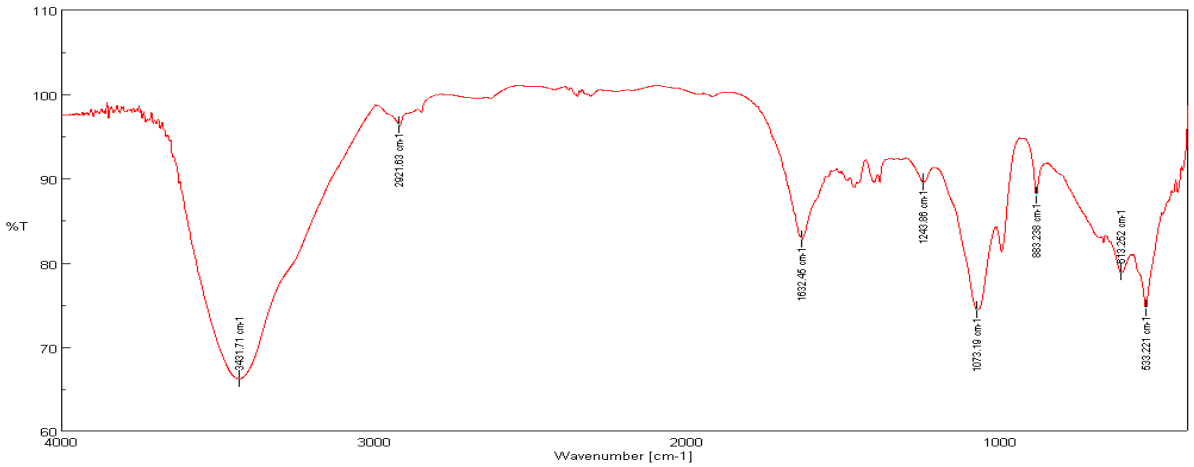
بررسی ساختار متابولیت تولیدشده با آزمون FTIR انجام شد که تحلیل گراف تولیدشده تأییدکنندهٔ تولید ساختار مدنظر است. گراف به‌دست‌آمده در شکل ۵ آورده شده است (شکل-۵).

نوار جذبی $3431\ cm^{-1}$ نشان‌دهندهٔ تعداد زیادی گروه‌های هیدروکسیل (-OH) است؛ بنابراین، پلیمر خالص پلی‌ساکارید است. در $2921\ cm^{-1}$ ، $1632\ cm^{-1}$ و $1243\ cm^{-1}$ به‌ترتیب مربوط به پیوند (C-H)، پیوند (C=O) و پیوند (C-O-C) است.

آنالیز کیفی اگزوپلی‌ساکارید با آزمون UV-Vis

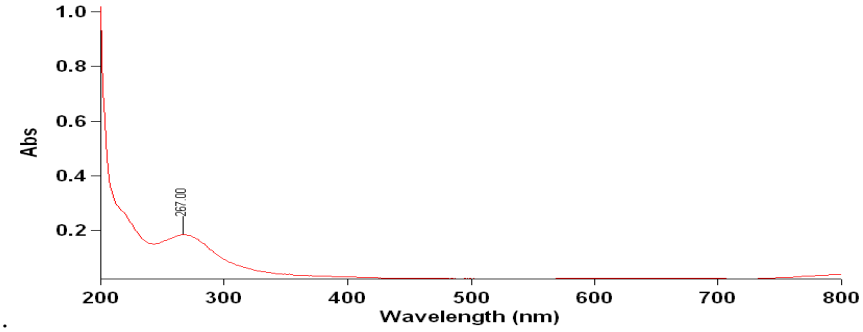
اگزوپلی‌ساکارید جدایه منتخب با آزمون طیف‌سنجی UV-Vis بررسی شد (شکل-۶).

همان‌طور که در طیف مشاهده می‌شود، طول موج ماکزیمم ۲۶۷ نانومتر است و آنالیز کمی میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید است. در این محدوده احتمال انتقالات در گروه‌های کربوکسیل، کربونیل، آمین و استری وجود دارند که نشان‌دهندهٔ کونژوگه‌شدن با پروتئین‌ها است. در طیف رزونانس مغناطیسی هسته مربوط به اگزوپلی‌ساکارید در ناحیه ۳-۲ پروتون‌های پلی‌ساکارید مشاهده می‌شوند و در ناحیه ۴-۳ رزونانس پروتون وضعیت آنومریک را تأیید می‌کند.



شکل ۵- گراف آنالیز FTIR اگزوپلی‌ساکارید تولیدشده توسط جدایه منتخب

Figure 5- FTIR analysis graph of theEPS produced by selected isolated



شکل ۶- طیف UV-Vis اگزوپلی‌ساکارید جدایه منتخب

Figure 6- UV-Vis spectrum of selected isolated EPS

آنالیز کیفی اگزوپلی‌ساکارید با آزمون HPLC

اگزوپلی‌ساکارید جدایه منتخب با آزمون کروماتوگرافی HPLC بررسی شد. کروماتوگرام به‌دست‌آمده در شکل-۷ آورده شده است.

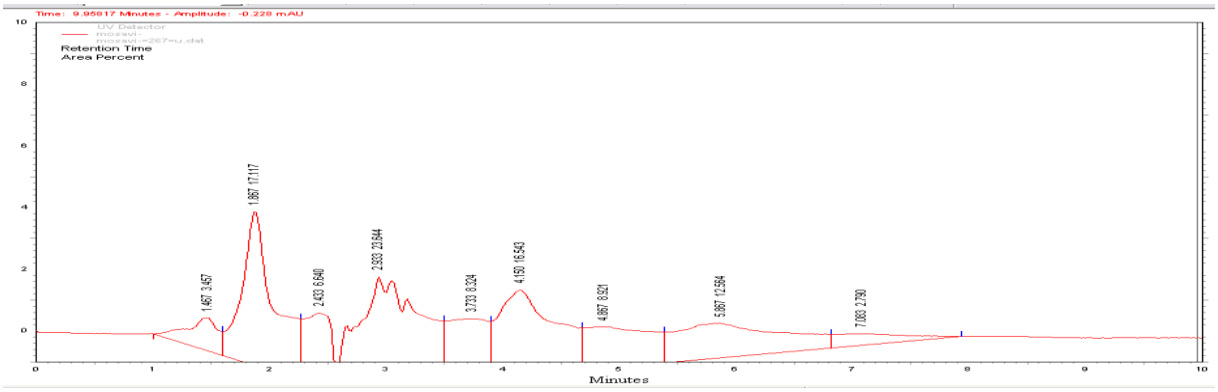
نتایج براساس استانداردها نشان دادند اگزوپلی‌ساکارید ۶ مونوساکارید رامینوز، مانوز، گلوکز ، فروکتوز، گالاکتوز و آرابینوز است و درواقع یک هتروپلی ساکارید است.

آنالیز ساختار مولکولی اگزوپلی‌ساکارید با آزمون TGA

اگزوپلی‌ساکارید جدایه منتخب با آزمون حرارتی TGA بررسی شد (شکل-۸).

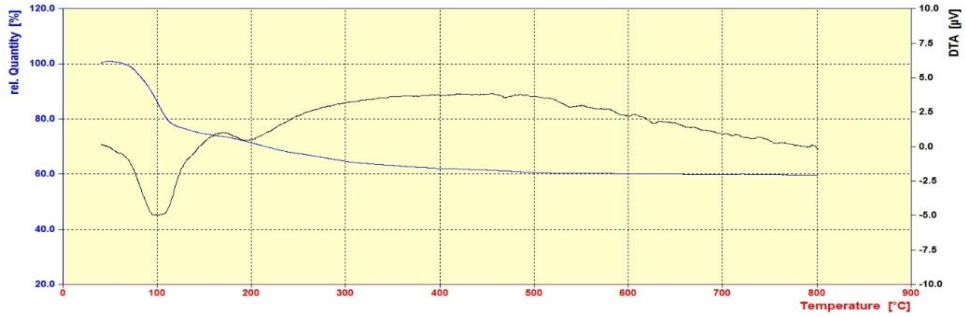
کاربرد اگزوپلی‌ساکاریدها تا حد زیادی به رفتار حرارتی آنها بستگی دارد. تجزیه و تحلیل گرماسنجی براساس کاهش وزن مواد به‌عنوان تابعی از دما است؛ بنابراین، ویژگی حرارتی یک مشخصه مهم برای کاربرد تجاری پلی‌ساکاریدها است. همان‌طور که در شکل نشان داده شده است، اولین مرحله حدود ۲۴ درصد کاهش وزن در دامنه ۱۲۰-۳۰ درجه است که مربوط به کاهش وزن حذف آب و تخریب کربوکسیل است. در مرحله بعد، کاهش وزن تا ۴۰ درصد در محدوده ۵۰۰-۱۲۰ درجه اتفاق می‌افتد که به تخریب پلی‌ساکارید نسبت داده می‌شود. تفاوت ساختار اگزوپلی‌ساکاریدها تفاوت پایداری حرارتی را نشان می‌دهد و در صنایع غذایی اهمیت پیدا می‌کند.

10.22108/bjm.2024.142099.1602



شکل ۷- کروماتوگرام HPLC اگزوپلی‌ساکارید جدایه منتخب

Figure 7- HPLC chromatogram of selected isolated EPS



شکل ۸- گراف TGA اگزوپلی‌ساکارید جدایه منتخب

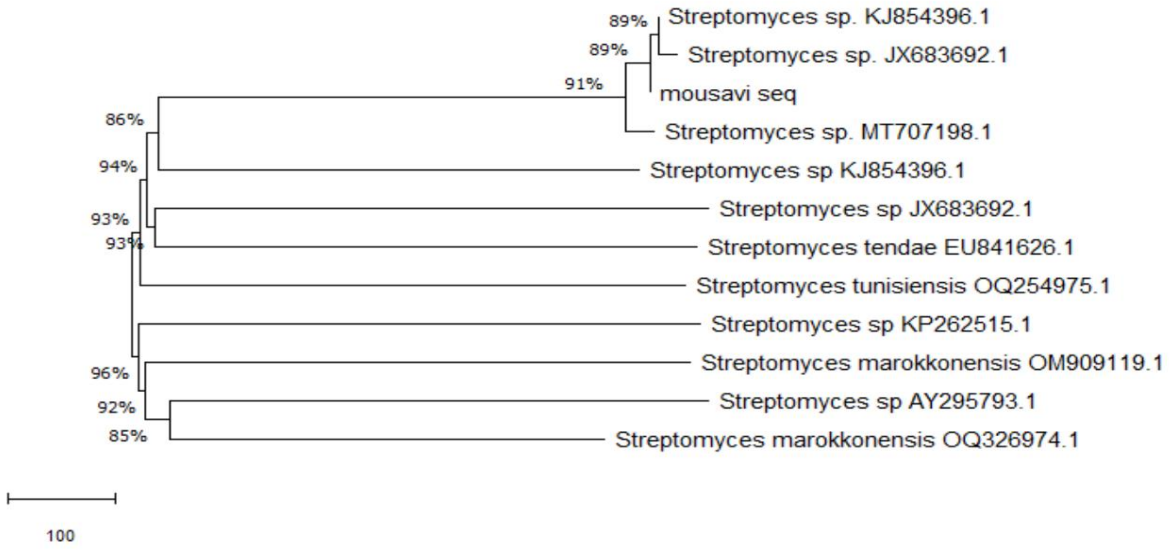
Figure 8 - TGA graph of selected isolated EPS

تکثیر توالی ژن *16srRNA* توسط واکنش PCR

نتایج الکتروفورز نمونه‌ها براساس پرایمرهای استفاده‌شده برای انجام واکنش PCR باند ۱۵۲۰ جفت بازی روی ژل آگارز ۱ درصد است که تکثیر ژن مدنظر را نشان داد.

شناسایی مولکولی جدایه منتخب

تصویر درختچه (شکل-۹) براساس متد Neighbor joining به روش اختلاف نوکلئوتیدی رسم شد که نشان‌دهندهٔ شباهت ۱۰۰ درصدی جدایه فوق با طول قطعه ۱۵۲۰ جفت‌باز نوکلئوتیدی با باکتری *استرپتومایسس* به شماره KJ854396 است و در رسم دندروگرام فیلوژنتیک در یک شاخه قرار می‌گیرند.



شکل ۹- نتایج حاصل از ترسیم دندروگرام فیلوژنتیک، تعیین توالی و درختچه فیلوژنتیک که شباهت به استرپتومیست‌ها را نشان می‌دهد. رسم درختچه براساس متد neighbor joining به روش اختلاف نوکلئوتیدی رسم شد که نشان‌دهندهٔ میزان شباهت نوکلئوتیدها براساس نرم‌افزار MEGA X است.

Figure 9- The results of drawing the phylogenetic dendrogram and determining the sequence and the phylogenetic tree show a similarity to *Streptomyces*. The tree was drawn based on the neighbor-joining method using the nucleotide difference method, which shows the degree of nucleotide similarity based on the MEGA X software.

بحث

با توجه به استفاده بیش‌ازحد و بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک ها، بسیاری از عوامل بیماری‌زا به درمان آنتی‌بیوتیکی مقاوم شده‌اند. این عوامل بیماری‌زا با داشتن تعداد زیادی از ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک در بین ژنوم اصلی و پلاسمیدها سبب محدودشدن انتخاب‌های درمانی شده‌اند (۲۰). امروزه مطالعات بسیار زیادی برای کشف و توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید به‌عنوان عامل مؤثر در برابر عوامل بیماری‌زای کشنده مورد نیاز است. *اکتینومایست*‌ها با ارزش‌ترین میکروارگانیسم‌ها برای تولید و سنتز ترکیبات درمانی و آنتی‌بیوتیک‌های جدید هستند. مطالعات زیادی توسط دانشمندان برای جداسازی *اکتینومیست*‌ها، به‌عنوان منبع اصلی تولیدکنندهٔ آنتی‌بیوتیک‌ها و متابولیت‌های ثانویه متنوع انجام شده است؛ اما در دو دهه گذشته میزان کشف متابولیت‌های جدید جداشده از *اکتینومایست*‌های بارز اعضای جنس *استرپتومایسس*‌ها کاهش یافته است؛ بنابراین، *اکتینومیست*‌های کمیاب به‌عنوان منابع جدید متابولیت فعال زیستی درخور توجه قرار گرفته‌اند (۲۱). الیاکس و همکاران (۲۰۱۹) از نمونه آب‌های ساحلی جزیره موریس گونه‌های باکتریایی تولیدکنندهٔ اگزوپلی ساکارید با خواص ضدباکتریایی در برابر جنس *استنیتوباکتر* را جداسازی کردند و درنهایت جدایه‌ها را با آنالیز مولکولی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک شناسایی کردند (۲۲). فاطمه نهال و همکاران (۲۰۱۹) خصوصیات تولید بالا و فعالیت ضدمیکروبی اگزوپلی‌ساکاریدها از *لاکتوکوکوس لاکتیک* شیر شتر را بررسی کردند (۲۳). پالانیاپان سیدویا و همکاران (۲۰۱۸) سنتز سبز نانوذرات نقره به همراه اگزوپلی ساکارید به‌عنوان ماده واسط را انجام دادند و خواص ضدباکتریایی آن را بررسی کردند (۲۴). کووان کیما و همکاران (۲۰۱۳) اگزوپلی‌ساکارید خارج سلولی یک *اکتینوباکتر* دریایی را بررسی کردند که ممکن است به عنوان منبع جدیدی از آنتی‌اکسیدان طبیعی با ارزش

بالقوه برای سلامتی، غذا و درمان بررسی شود (۲۵). در این تحقیق هاله عدم رشد پاتوژن‌ها به نسبت دیگر پژوهش‌های انجام‌شده به‌مراتب بیشتر بود و هاله عدم رشد ۳۵ میلی‌متر در باکتری *E.coli* بود که مزیت مهمی در *اکتینوباکترهای* نمک‌دوست تولیدکنندهٔ اگزوپلی‌ساکارید در این پژوهش است. همچنین، تاکنون در داخل کشور روی جداسازی و شناسایی انواع باکتری‌های تولیدکنندهٔ اگزوپلی‌ساکارید در دریاچه نمک قم کار تحقیقی انجام نشده است. شناسایی و تعیین ویژگی‌های متابولیت *اکتینومایست*‌ها به‌خصوص *استرپتومیست*‌های نمک‌دوست، زمینه پژوهشی جدید و تازه‌ای محسوب می‌شود؛ بنابراین، انجام این تحقیق قدم‌های مؤثری در تهیه اطلاعات لازم و مفید برای به کارگیری این ریزموجودات در تولید اگزوپلی‌ساکاریدهای ضدمیکروبی و کاربردی‌کردن این محصولات زیستی در صنایع دارویی و غذایی است. گونه‌های باکتری استرپتومایسس منبع اصلی آنتی‌بیوتیک‌های مهم بالینی هستند. اکثر این ترکیبات بسیار پیچیده و توسط شیمی ترکیبی سنتز می‌شوند. ازلحاظ ساختاری و عملکردی ترکیبات فعال زیستی متنوعی از *اکتینومیست‌ها* به‌عنوان آنتی‌بیوتیک‌ها با عنوان ضدباکتری، ضدقارچ و ضدانگل جدا شده‌اند (۲۶). مطالعات زیادی توسط دانشمندان برای جداسازی *اکتینومیست*‌ها انجام شده است؛ اما در دو دهه گذشته میزان کشف متابولیت‌های جدید جداشده از *اکتینومیست*‌های بارز اعضای جنس *استرپتومایسس*‌ها کاهش یافته است؛ بنابراین، *اکتینومیست*‌های کمیاب به عنوان منابع جدید متابولیت فعال زیستی درخور توجه قرار گرفته‌اند (۲۷). *اکتینوباکترها* یکی از اصلی‌ترین منابع ترکیبات زیست‌فعال طبیعی به‌ویژه آنتی‌بیوتیک‌ها هستند و نزدیک به دو سوم آنتی‌بیوتیک‌های موجود در بازار منشأ *اکتینوباکتریایی* دارند. *اکتینوباکترها* باوجود شباهت‌های مورفولوژیکی با قارچ‌ها، به‌دلیل داشتن برخی ویژگی‌های اختصاصی باکتری‌ها ازجمله ساختار دیواره سلولی، وجود پپتیدوگلیکان و محتوای ژنومی تک کروموزومی با درصد G+C بالا، جزء سلسله باکتری‌ها محسوب می‌شوند (۲۸). به‌عنوان یکی از بزرگ‌ترین راسته‌های باکتریایی در جدیدترین تقسیم بندی‌های فیلوژنتیکی، در ۶ کلاس و ۲۰ راسته به همراه ۶۶ خانواده قرار گرفته‌اند. مهم‌ترین و شناخته‌شده‌ترین جنس‌های *اکتینوباکترها* شامل *نوکاردیا*، *مایکوباکتریوم*، *کورینه باکتریوم*، *استرپتومایسس* و *رودوکوکوس* هستند که به‌دلیل کاربردهای دارویی، پزشکی، بیوتکنولوژی و صنعتی و در موارد کمتر به‌دلیل بیماری‌زایی شایان توجه قرار گرفته‌اند (۲۹). با توجه به توانایی *اکتینوباکترها* در سازگاری و زندگی در محیط‌های مختلف و پیدایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها و همچنین کاهش روزافزون منابع جدید برای جداسازی ترکیبات دارویی، توجه محققان را به خود جلب کرده‌اند (۳۰). اکثر متابولیت‌های تولیدشده توسط *اکتینوباکترهای* هالوفیلیک، مربوط به جنس *استرپتومایسس* است و حدود ۵۰ درصد از کل آنتی بیوتیک‌های تولیدشده را سنتز می‌کنند (۳۱). مشخصات ساختاری پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی مانند وزن مولکولی، تعداد و اتصالات ساکاریدی می‌تواند نقش مهمی در کاربرد وسیع آنها در صنایع مختلف داشته باشند. در دهه‌های اخیر، پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی ریزموجودات جایگزین پلی‌ساکاریدهای گیاهی شده‌اند که به مقدار فراوان و با درجه خلوص بالاتری به دست می‌آیند. اگزوپلی‌ساکاریدها در هنگام رشد باکتری‌ها توسط باکتری‌های مختلف تولید می‌شوند. مطالعات مختلف نشان می‌دهد توانایی تولید اگزوپلی‌ساکارید در میان باکتری‌ها بیشتر از قارچ‌ها و مخمرها است (۴). اثر باکتری‌های مولد اگزوپلی‌ساکارید بر خصوصیات فیزیکی ریزوسفر خاک نشان می‌دهد کلنیزاسیون متراکم ریزوسفر گیاه همراه باکتری مولد

10.22108/bjm.2024.142099.1602

اگزوپلی‌ساکارید با خاکدانه‌سازی و پایداری خاک چسبیده به ریشه همراه بوده است. همچنین، جوانه‌زنی بذر در گیاهان همراه با کاربرد اگزوپلی‌ساکارید باکتریایی بهبود یافته است. این باکتری‌ها در خاک‌های شور اگزوپلی‌ساکارید بیشتری تولید می‌کنند و باعث افزایش دانه‌بندی اطراف ریشه گیاهان در خاک شور می‌شوند. در تحقیق حاضر می‌توان رشد گیاه تحت تنش شوری را توسط سویه منتخب جداسازی‌شده افزایش داد. همچنین، اگزوپلی‌ساکاریدها طیف گسترده‌ای از کاربردهای بالقوه را در فناوری زیستی نوین به‌ویژه در پزشکی و داروسازی به‌عنوان عوامل ضدحساسیت دارند (۳۲). اگزوپلی‌ساکارید باکتری‌های شورپسند دارای ثبات در درجه حرارت و همچنین اگزوپلی‌ساکریدهای با وزن مولکولی کم و بار منفی بیشتر می‌توانند پاسخ ایمنی را در میزبان انسان نسبت به باکتری‌های بیماری‌زا بهبود بخشند. حضور گروه‌های فسفات و آهنی می‌تواند فعالیت بیولوژیکی ضدمیکروبی و ضدسرطانی اگزوپلی‌ساکارید را بهبود ببخشد. این مکانیزم که توسط اگزوپلی‌ساکاریدها روی عوامل بیماری‌زای میکروبی کار می‌کند و بر سیستم ایمنی ذاتی تأثیر می‌گذارد، خیلی پیچیده است و هنوز به‌خوبی شناخته نشده است؛ بنابراین، تحقیقات بیشتری لازم است؛ به‌ویژه روی مکانیسم‌هایی که در آن اگزوپلی‌ساکاریدها اثرات خود را می‌گذارند (۳۳).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل نشان می‌دهند خاک اطراف ریشه گیاهان دریاچه نمک قم دارای *اکتینومیست*‌های نمک‌دوست مولد اگزوپلی‌ساکارید با خواص ضدمیکروبی است. بررسی و مقایسه پژوهش حاضر و پژوهش‌های مشابه ازجمله جداسازی سویه‌های *اکتینومیست* تولیدکنندهٔ اگزوپلی‌ساکارید، آنالیز ساختاری اگزوپلی‌ساکارید و بررسی خصوصیات ضدباکتریایی جدایه حاضر تأییدکنندهٔ صحت نتایج پژوهش حاضر و همچنین انتخاب درست نوع پژوهش و مکان نمونه‌برداری است.

References

(1) Rasouli A, Aghaei SS, Zargar M. Bio-production of Single-cell Oil by *Rhodococcus Erythropolis* PTCC 1767 Bacterial using Low-cost Carbon Sources. Journal of Microbial Biology. 2020; 9(35):71-85. [In Persian] https://doi.org/10.22108/bjm.2020.121878.1281.

(2) Rasouli A, Aghaei SS, Zargar M. Single-cell oil production using low-cost carbon sources by newly isolated *Kocuria* Y205. Archives of Hygiene Sciences. 2021; 10(2):143-54. http://dx.doi.org/10.52547/ArchHygSci.10.2.143

(3) Moshabaki F, Tahmoorespour A, Ataabadi M, Mohamadi A. Isolation and identification of indigenous saline soil exopolysaccharide-producing bacteria. Journal of Sol Biology. 2017;5(1):37-47. [In Persian] https://doi.org/10.22092/sbj.2017.113119.

(4) Larpin S, Sauvageot N, Pichereau V, Laplace J-M, Auffray Y. Biosynthesis of exopolysaccharide by a *Bacillus licheniformis* strain isolated from ropy cider. International Journal of Food Microbiology. 2002;77(1-2):1-9. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00058-2

(5) Harada K, Inoue H, El-Morsy MA, Itoh M, Umegaki S, Yatagai T. Holographic recording and control of diffraction efficiency using photoinduced surface deformation on azo-polymer films. Japanese Journal of Applied Physics. 2002;41(3S):1851. https://doi.org/10.1143/JJAP.41.1851

(6) Wan WAAQI, Young L, Abbott GM, Clements C, Harvey LM, McNeil B. Antimicrobial properties and cytotoxicity of sulfated (1, 3)-β-D-glucan from the mycelium of the mushroom *Ganoderma lucidum*. Journal of Microbiology and Biotechnology. 2016;26(6):999-1010. https://doi.org/10.4014/jmb.1510.10018

(7) Zhao X, Zhou L, Riaz Rajoka MS, Yan L, Jiang C, Shao D, et al. Fungal silver nanoparticles: synthesis, application and challenges. Critical Reviews in Biotechnology. 2018;38(6):817-35. https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1414141

(8) Sadati R, Barghi A. Urmia hypersaline lake: A potential source of actinomycetes possessing. Iranian Journal of Public Health. 2014;43(2):149 . https://B2n.ir/h78789

(9) Aghaei S. Biosurfactant Production in Halotolerant *Actinomycets* sp. Isolated from Saline Lack Soil in Qom city. Applied Biology. 2014;4(15):1-18.

(10) Khalili BS, Hamedi J ,Haghighat S. Isolation and Identification Rare Actinobacteria from Persian Gulf and Oman Sea. Journal of Arak University of Medical Sciences. 2019;21(7):28-38. [In Persian] http://jams.arakmu.ac.ir/article-1-5109-.pdf.

(11) Tavanaeian S, Hamedi J, Haghighat S. Introducing antimicrobial exopolymer-producing actinobacteria from soils of Iran. Nova Biologica Reperta. 2020; 7(1):55-63. [In Persian] http://dx.doi.org/10.29252/nbr.7.1.55.

(12) Asker MS, El Sayed OH, Mahmoud MG, Yahya SM, Mohamed SS, Selim MS, et al. Production of exopolysaccharides from novel marine bacteria and anticancer activity against hepatocellular carcinoma cells (HepG2). Bulletin of the National Research Centre. 2018;42:1-9. https://doi.org/10.1186/s42269-018-0032-3

(13) Kanmani P, Yuvaraj N, Paari K, Pattukumar V, Arul V. Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity in vitro. Bioresource Technology. 2011; 102(7): 4827-33. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.118

(14) Rahnama Vosough P, Habibi Najafi MB, Edalatian Dovom MR, Javadmanesh A, Mayo B. Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxicity activities of exopolysaccharide from *Enterococcus* strains isolated from traditional Iranian Kishk. Journal of Food Measurement and Characterization. 2021;15:5221-30 . https://doi.org/10.1007/s11694-021-01092-5

(15) Elyasifar B, Jafari S, Hallaj-Nezhadi S, Chapeland-Leclerc F, Ruprich-Robert G, Dilmaghani A. Isolation and identification of antibiotic-producing halophilic bacteria from Dagh Biarjmand and Haj Aligholi salt deserts, Iran. Pharmaceutical Sciences. 2019;25(1):70-7. https://doi.org/10.15171/PS.2019.11

(16) Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity G. The Proteobacteria: Part A Introductory Essays: Springer Science+ Business Media, Incorporated; 2005.

(17) Liu L, Salam N, Jiao J-Y, Jiang H-C, Zhou E-M, Yin Y-R, et al. Diversity of culturable thermophilic actinobacteria in hot springs in Tengchong, China and studies of their biosynthetic gene profiles. Microbial Ecology. 2016;72:150-62. https://doi.org/10.1007/s00248-016-0756-2

(18) Vijayabaskar P, Babinastarlin S, Shankar T, Sivakumar T, Anandapandian K. Quantification and characterization of exopolysaccharides from *Bacillus subtilis* (MTCC 121). Adv Biol Res. 2011;5(2):71-6. https://B2n.ir/r61786

(19) EFSA. EFSA panel on additives and products or substances used in animal feed, guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA J. 2012;10:1-10. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2740

(20) Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED ,Johnston MD, et al. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. PloS one. 2012;7(4):e34953. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034953

(21) Vijay V, Kavitha A, Rebecca SR. Automated brain tumor segmentation and detection in MRI using enhanced Darwinian particle swarm optimization (EDPSO). Procedia Computer Science. 2016;92:475-80. https://doi.org/10.1016/j.procs.2016.07.370

(22) Aullybux AA, Puchooa D, Bahorun T, Jeewon R. Phylogenetics and antibacterial properties of exopolysaccharides from marine bacteria isolated from Mauritius

seawater. Annals of Microbiology. 2019;69:957-72. https://doi.org/10.1007/s13213-019-01487-2

(23) Cameron MC, Lee E, Hibler BP, Barker CA, Mori S, Cordova M, et al. Basal cell carcinoma: Epidemiology; pathophysiology; clinical and histological subtypes; and disease associations. Journal of the American Academy of Dermatology. 2019;80(2):303-17. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.03.060

(24) Sivasankar P, Seedevi P, Poongodi S, Sivakumar M, Murugan T, Sivakumar L, et al. Characterization, antimicrobial and antioxidant property of exopolysaccharide mediated silver nanoparticles synthesized by Streptomyces violaceus MM72. Carbohydrate Polymers. 2018;181:752-9. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.082

(25) Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim S-K. RETRACTED: Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives. Microbiological Research. 2013;168(6):311-32. https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.02.002

(26) Kaur S, Kaur HP, Prasad B, Bharti T. Production and optimization of pectinase by *Bacillus* sp. isolated from vegetable waste soil. Indo American Journal of Pharmaceutical Research. 2016;6(1):4185-90.https://doi.org/10.1044/1980-iajpr.160120

(27) Vijaymeena M, Kavitha K. A survey on similarity measures in text mining. Machine Learning and Applications: An International Journal. 2016;3(2):19-28. https://B2n.ir/n39674

(28) Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk H-P, et al. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2016;80(1):1-43. https://doi.org/10.1128/mmbr.00019-15

(29) Fernández-Cabezón L, Galán B, García JL. New insights on steroid biotechnology. Frontiers in Microbiology. 2018;9:958. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00958

(30) Dhakal D, Pokhrel AR, Shrestha B, Sohng JK. Marine rare actinobacteria: isolation, characterization, and strategies for harnessing bioactive compounds. Frontiers in Microbiology. 2017;8:1106. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01106

(31) Procópio REdL, Silva IRd, Martins MK, Azevedo JLd, Araújo JMd. Antibiotics produced by *Streptomyces*. Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2012;16:466-71. https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014

(32) Vandamme EJ, Soetaert W. Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology. 2002;77(12):1323-32. https://doi.org/10.1002/jctb.722

(33) Abdalla AK, Ayyash MM, Olaimat AN, Osaili TM, Al-Nabulsi AA, Shah NP, et al. Exopolysaccharides as antimicrobial agents: Mechanism and spectrum of activity. Frontiers in Microbiology. 2021;12:664395. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.664395