Original Article

Evaluation of antimicrobial activity of new *Streptomyces* species isolated from marine sediments of eastern Gilan province, Iran

Mirsonbol SZ[1], Issazadeh Kh[1*], Zarrabi S[2], Mirpour M[1]

1- Department of Microbiology, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, I.R. Iran.
2- Department of Chemistry, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, I.R. Iran.

Received: 2019/11/28 | Accepted: 2020/05/4

Abstract:

Background: *Streptomyces* have the ability to produce bioactive metabolites such as antibacterial compounds. This study aimed to isolate and evaluate the production of antibacterial compounds from marine sediments by *Streptomyces* of eastern Gilan province.
Materials and Methods: Marine sediments were collected and *Streptomyces* species were identified based on morphological, physiological, biochemical methods and molecular identification was used by 16SrRNA gene sequencing and phylogenetic analysis. Antimicrobial activity was evaluated against pathogenic microorganisms such as *Micrococcus luteus* PTCC 1408, *Bacillus cereus* PTCC 1154, *Staphylococcus aureus* PTCC 1189, *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1310, *Salmonella typhi* PTCC 1609 and *Proteus mirabilis* PTCC 1776 by using primary (Cross streak) and secondary (Well diffusion agar) methods were investigated.
Results: The isolate SN7 was collected from marine sediments of eastern Gilan province, Iran and the results of 16SrRNA gene sequencing and phylogenetic analysis revealed that the isolate belonged to *Streptomyces* genus with the highest similarity (90.17%) to uncultured *Streptomyces* sp. and it can be introduced as a new species. This isolate showed significant antimicrobial activity against pathogenic microorganisms and *P. aeruginosa* was the most resistant microorganism against antimicrobial activity of this isolate.
Conclusion: The results showed that the marine sediments of the eastern regions of Gilan province, Iran can be significant for producing antimicrobial compounds and these regions can be valuable for pharmaceutical application.

Keywords: *Streptomyces*, Antimicrobial activity, 16SrRNA, Merine sediments

***Corresponding Author:**
Email: issa_kaam@yahoo.com
Tel: 0098 911 242 2730
Fax: 0098 134 222 606

Conflict of Interests: ***No***
Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, June, 2020; Vol. 24, No 2, Pages 190-197

Please cite this article as: Mirsonbol SZ, Issazadeh Kh, Zarrabi S, Mirpour M. Evaluation of antimicrobial activity of new *Streptomyces* species isolated from marine sediments of eastern Gilan province, Iran. ***Feyz*** 2020; 24(2): 190-7.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-08]

بررسی فعالیت ضدّمیکروبی گونه‌های جدید *استرپتومایسس* جداسازی‌شده از رسوبات دریایی مناطق شرق استان گیلان، ایران

سیده زهرا میرسنبل [۱]، خسرو عیسی‌زاده [۲*]، سعید ضرابی [۳]، میرساسان میرپور [۴]

خلاصه:

سابقه و هدف: *استرپتومایسس*ها توانایی تولید ترکیبات فعال زیستی، از جمله ترکیبات ضدّباکتریایی را دارند. هدف از انجام این پژوهش، جداسازی و بررسی *استرپتومایسس*های تولیدکننده ترکیبات ضدّمیکروبی از رسوبات دریایی شرق استان گیلان، ایران بوده است.

مواد و روش‌ها: رسوبات دریایی جمع‌آوری شدند و شناسایی *استرپتومایسس* با روش‌های مورفولوژی، فیزیولوژی و بیوشیمیایی؛ و شناسایی مولکولی با استفاده از توالی‌یابی ژن 16SrRNA و آنالیز فیلوژنتیک صورت پذیرفت. فعالیت ضدّمیکروبی در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، شامل *میکروکوکوس لوتئوس* (PTCC 1408)، *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1154)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1189)، *سودوموناس آئروجینوزا* (PTCC 1310)، *سالمونلا تایفی* (PTCC 1609) و *پروتئوس میرابیلیس* (PTCC 1776) با استفاده از روش‌های غربالگری اوّلیه (کشت متقاطع خطی) و ثانویه (انتشار در چاهک) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: جدایه SN7 از رسوبات دریایی مناطق شرقی استان گیلان، ایران جداسازی شد و نتایج توالی‌یابی ژن 16SrRNA و آنالیز فیلوژنتیک نشان داد که جدایه موردنظر، متعلق به جنس *استرپتومایسس* با بیشترین میزان تشابه (۹۰/۱۷ درصد) با Uncultured *Streptomyces* sp. می‌باشد و می‌تواند به‌عنوان یک گونه جدید مطرح شود. جدایه موردنظر دارای فعالیت ضدّباکتریایی قوی است و مقاوم‌ترین میکروارگانیسم در برابر فعالیت ضدّباکتریایی جدایه، *سودوموناس آئروجینوزا* می‌باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان‌دهنده آن است که رسوبات دریایی مناطق شرقی استان گیلان، از لحاظ تولید ترکیبات ضدّمیکروبی می‌توانند بسیار مهم باشند و این مناطق، در زمینه داروسازی حائز اهمیت هستند.

واژگان کلیدی: *استرپتومایسس*، رسوبات دریایی، فعالیت ضدّمیکروبی، 16SrRNA

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و چهارم، شماره ۲، خرداد - تیر ۱۳۹۹، صفحات ۱۹۷-۱۹۰

مقدمه

*اکتینومیست*ها گروه متنوعی از میکروارگانیسم‌ها می‌باشند که به‌صورت گسترده در محیط‌های خاکی، دریایی و آب شیرین توزیع شده‌اند [۱]. *اکتینومیست*های دریا به‌ویژه گونه‌های *استرپتومایسس*، منبع مفید و مناسبی جهت تولید محصولات فعال زیستی طبیعی می‌باشند [۲] و دارای فعالیت ضدّباکتریایی و ضدّقارچی هستند [۶-۳].

۱. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

۳. استادیار، گروه شیمی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

۴. استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

* **نشانی نویسنده مسؤول:**

گروه میکروبیولوژی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان

تلفن: ۰۹۱۱۲۴۲۲۷۳۰ **دورنویس:** ۰۱۳۴۲۲۲۶۰۶

پست الکترونیک: issa_kaam@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۹/۷ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۹/۲/۱۵

*استرپتومایسس*ها جزو راسته اکتینومایسیتال‌ها هستند که باکتری‌های گرم مثبت رشته‌ای، هوازی، فاقد حرکت، تولیدکننده اسپور و شیمیوارگانوتروف می‌باشند و درصد G+C بسیار بالایی دارند [۷]. اکوسیستم دریایی از اقیانوس‌ها، عمق دریا و کف دریا، مصب رود و تالاب‌ها، باتلاق نمک‌زار و نواحی جزر و مدّی، صخره‌های مرجانی و مرداب‌ها تشکیل شده است [۱]. چندین ترکیب فعال زیستی از *اکتینومیست*های آبزی جداسازی شده است. به‌عنوان مثال: rifamycin از *Micromonospora* sp.، salinosporamide-A (یک ترکیب ضدّسرطان) از *Salinispora* sp.، marinomycins از *Marinophilus* sp. و marinopyrroles از *Streptomyces* sp. [۸]. کشف متابولیت‌های ضدّباکتریایی از منابع دریایی با فعالیتی مؤثر، به اثبات رسیده است [۹]. گونه‌های *استرپتومایسس* توانایی تولید بسیاری از متابولیت‌های فعال زیستی متنوع را دارند [۹] و حدود ۷۵ درصد از آنتی‌بیوتیک‌های مفید را تولید می‌نمایند [۱۰]. پیدایش گسترده مقاومت‌های چند دارویی در سویه‌های باکتریایی و قارچی به‌خصوص آن‌هایی که مسبّب ایجاد عفونت‌های بیمارستانی می‌باشند، درمان را توسط آنتی‌بیوتیک‌های رایج با مشکل مواجه کرده‌اند [۱]. به همین دلیل جستجو جهت تولید آنتی‌بیوتیک مؤثر

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-08]

برای کنترل این پاتوژن‌های مقاوم، مورد نیاز می‌باشد [۱۱]. زیستگاه دریایی، یک منبع برجسته و جذاب برای کشف میکروارگانیسم‌های تولیدکننده ترکیبات فعال زیستی جدید و مؤثر می‌باشد. گزارش شده است که حدود ۲۳۰۰۰ متابولیت فعال زیستی ثانویه، توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند که بیش از ۱۰۰۰۰ ترکیب از آن‌ها توسط اکتینومیست‌ها تولید شده‌اند. از میان *اکتینومیست‌ها*، حدود ۷۶۰۰ ترکیب توسط گونه‌های *استرپتومایسس* تولید شده‌اند [۲]. در مقایسه با اکتینومیست‌های خاکزی مطالعات بسیار کمی بر روی اکتینومیست‌های دریایی صورت گرفته است. تنها گزارشات اندکی در ارتباط با میزان پراکندگی *استرپتومایسس*‌های دارای خاصیت آنتاگونیسمی در محیط دریا در دسترس می‌باشد. تحقیقات اخیر دربرگیرنده آن است که *اکتینومیست*‌های محیط ساحلی منبعی قوی برای آنتی‌بیوتیک‌های جدید می‌باشند [۲]. *استرپتومایسس*‌های دریایی در قیاس با گونه‌های خاکزی، منبع اصلی تولید آنتی‌بیوتیک‌های منحصربه‌فرد می‌باشند؛ به این دلیل *استرپتومایسس*‌های دریایی جهت استخراج متابولیت‌های ثانویه مورد بررسی قرار داده می‌شوند و اخیراً متابولیت‌های ثانویه بسیاری از آن‌ها جداسازی شده است [۹]. Valli و همکاران ۲۱ اکتینومیست با عملکرد ضدّمیکروبی را از محیط دریایی جداسازی نمودند و گزارش کردند که تمامی آن‌ها حداقل در برابر یکی از میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش در تحقیقشان، دارای فعالیت ضدّمیکروبی بوده است [۲]. Gebreyohannes و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مطالعه خود به جداسازی *اکتینومیست*‌ها از آب‌ها و رسوبات دریاچه تانا پرداختند و ۳۱ *اکتینومیست* را جداسازی نمودند که در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای مورد مطالعه در تحقیق خود، دارای عملکرد ضدّمیکروبی وسیع و همچنین بیشتر آن‌ها متعلق به جنس *استرپتومایسس* بودند [۱۲]. با توجه به مقاومت روزافزون باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، در این پژوهش جداسازی و بررسی مولکولی *استرپتومایسس*‌های تولیدکننده ترکیبات ضدّمیکروبی از رسوبات دریایی مناطق شرقی استان گیلان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

به‌دلیل این‌که نمونه‌های مورد بررسی در این پژوهش، رسوبات دریایی بودند، نیاز به کد اخلاق نبود. به هر صورت بررسی عملکرد ضدّمیکروبی بر روی میکروارگانیسم‌ها به‌طور دقیق و با رعایت موازین آزمایشگاهی انجام شد.

جهت انجام این پژوهش تجربی، رسوبات دریایی از عمق ۱۰ - ۵ سانتی‌متری از نواحی شرقی استان گیلان توسط بیلچه درون ظرف‌های استریل درب‌دار جمع‌آوری گردیدند و در شرایط استریل به آزمایشگاه جهت اندازه‌گیری رطوبت و pH انتقال داده شدند. همچنین برای جداسازی *استرپتومایسس*‌ها از روش رقیق‌سازی متوالی استفاده شد [۱۲]. در این مرحله، از رسوبات دریایی رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-7} تهیه گردید و ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت در محیط Starch Casein Agar (SCA) کشت داده شد. سپس به مدت ۳ هفته در دمای $28^{o}C$ گرمخانه‌گذاری شدند. سپس جدایه‌ها براساس خصوصیات مورفولوژی، مانند ظاهری خشک، چروکیده و چرمی و پودری‌شکل جداسازی و چندین مرتبه جهت خالص‌سازی به محیط SCA ساب کالچر داده شدند. سپس کلنی‌های خالص به محیط کشت مایع حاوی ۲۰ درصد گلیسرول انتقال یافتند و در دمای $-20^{o}C$ جهت نگهداری طولانی‌مدت قرار داده شدند. میکروارگانیسم‌های پاتوژن مورد آزمایش در این تحقیق، *میکروکوکوس لوتئوس* (PTCC 1408)، *باسیلوس سرئوس* (PTCC1154)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1189)، *سودوموناس آئروجینوزا* (PTCC 1310)، *سالمونلا تایفی* (PTCC 1609) و *پروتئوس میرابیلیس* (PTCC 1776) بودند که از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند و اثرات ضدّمیکروبی *استرپتومایسس* در برابر این میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌هایی که از خود فعالیت ضدّمیکروبی نشان دادند، مورد بررسی‌های مورفولوژی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک قرار گرفتند. آزمایش‌هایی مانند رنگ‌آمیزی گرم و اسپور، آزمایش اسید فست، رشد در محیط کشت‌های مختلف و دماهای متفاوت، تست کاتالاز، اوره آز، هیدرولیز نشاسته و ژلاتین، SIM، MR-VP، رشد در دماهای متفاوت، تحمل NaCl و مقاومت آنتی‌بیوتیکی صورت پذیرفت [۱۲]. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌ها با استفاده از روش دیسک دیفیوژن مطابق CLSI صورت گرفت. در این روش با کمک سواب استریل، از سوسپانسیون نیم مک فارلند جدایه‌ها، روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد [۱۳]. جهت انجام تست آنتی‌بیوگرام از دیسک‌های کلرامفنیکل (۳۰µg)، تتراسایکلین (۳۰µg)، پنی‌سیلین (۱۰µg) و اریترومایسین (۱۵µg) ساخت شرکت پادتن طب ایران استفاده گردید. سپس میزان هاله عدم رشد ایجادشده در اطراف هر دیسک محاسبه شد و نتایج با استفاده از جدول استاندارد CLSI بررسی گردید.

شناسایی مولکولی استرپتومایسس‌ها با استفاده از توالی‌یابی ژن 16 SrRNA و آنالیز فیلوژنتیک

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-08]

استخراج DNA با روش جوشاندن صورت پذیرفت. نمونه‌هایی که دارای قدرت ضدّمیکروبی قوی‌تری بودند (با محاسبه هاله عدم رشد ایجادشده در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا) در محیط SCA کشت داده شدند و به مدت ۷ روز در دمای ۲۸°C گرمخانه‌گذاری گردیدند. سپس چند کلنی از باکتری در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به صورت سوسپانسیون در آورده شدند و به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش، جوشانده و در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی که حاوی DNA بود، به میکروتیوپ جدید انتقال داده شد [۱۴]. وجود تک باند واضح و شفاف و همچنین عدم حضور اسمیر، بیانگر کیفیت مطلوب DNA استخراج‌شده، بود که در PCR مورد استفاده قرار گرفت. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از پرایمرهای 27F(5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') و 1492R(5'GGTTACCTTGTTACGACTT3') انجام پذیرفت [۱۵]. حجم و غلظت مواد استفاده‌شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز عبارت بودند از: DNA الگو با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میکرولیتر، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR 10 X، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها با غلظت ۲۰ پیکومولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP۱۰ میلی‌مولار، ۱/۵ میکرولیتر منیزیم کلراید ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم DNA-Taq پلیمراز. مراحل واکنش PCR شامل واسرشت‌سازی اوّلیه (۲ دقیقه در ۹۵°C)، ۳۵ سیکل واسرشت‌سازی (۳۰ ثانیه در ۹۵°C)، اتصال (۳۰ ثانیه در ۵۲°C)، بسط (۴۵ ثانیه در ۷۲°C) و بسط نهایی (۵ دقیقه در ۷۲°C) صورت گرفت [۱۵]. پس از تکثیر قطعه 1500 bp ژن 16SrRNA، الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد انجام شد. در نهایت برای مشاهده نتایج ژل، از دستگاه ژل داک استفاده شد و سپس محصول PCR به‌دست‌آمده برای تعیین توالی به شرکت بیونر (Bioneer) کره جنوبی ارسال گردید. جهت شناسایی باکتری، توالی‌های حاصله با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌ها (NCBI) با استفاده از نرم‌افزار BLAST توالی‌یابی شد و میزان شباهت آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی فعالیت ضدّمیکروبی

جهت بررسی فعالیت آنتاگونیسمی، از دو روش غربالگری اوّلیه و ثانویه استفاده شد. غربالگری اوّلیه به روش Cross streak انجام شد [۱۷،۱۶]. جدایه *استرپتومایسس* به‌صورت خطی عمود در وسط پلیت حاوی محیط کشت Nutrient Agar (NA) تلقیح و پلیت‌ها به‌مدت ۷ روز در دمای ۲۸°C گرمخانه‌گذاری گردید. سپس باکتری‌های پاتوژن به‌صورت خط‌های عمود بر *استرپتومایسس*، کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری شدند. در غربالگری ثانویه از روش Well diffusion agar استفاده شد. *استرپتومایسس*‌های دارای فعالیت ضدّمیکروبی، به محیط Yeast Extract Malt Extract Broth(ISP2) تلقیح شدند و به مدت ۲ هفته در شیکرانکوباتور ۲۰۰ rpm قرار گرفتند و پس از انجام سانتریفیوژ از مایع رویی جهت بررسی فعالیت ضدّمیکروبی استفاده شد [۱۲]. در روش انتشار در چاهک، از محیط کشت Mueller Hinton Agar(MHA) استفاده شد و پس از تعبیه چاهک‌ها، از سوپرناتانت کشت مایع *استرپتومایسس*‌ها در داخل هر چاهک ریخته شد و پلیت‌های حاوی سوسپانسیون باکتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند و سپس قطر هاله عدم رشد ایجادشده، محاسبه شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون ANOVA تجزیه و تحلیل گردید و $P<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

از رسوبات دریایی نواحی شرقی استان گیلان جدایه *استرپتومایسس* SN7 جداسازی شد. SN7 مخفف Sample Number و عدد ۷ نیز مرتبط با شماره جدایه‌ها، در این تحقیق می‌باشد و جهت تسهیل در نام‌گذاری استفاده شده است. جدایه موردنظر از لحاظ ویژگی‌های مورفولوژی مورد بررسی قرار گرفت که در محیط SCA ظاهری خشک و چروکیده و چسبیده به محیط کشت مشاهده شد (شکل شماره ۱). نتایج تست‌های بیوشیمیایی نشان می‌دهد که این جدایه کاتالاز و اکسیداز مثبت، قادر به هیدرولیز نشاسته و اوره، غیراسید فست و بدون حرکت می‌باشد. بررسی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژی در جدول شماره ۳ آمده است. همچنین ویژگی‌های ظاهری این جدایه در محیط‌های کشت مختلف در جدول شماره ۴ نشان داده شده است.

شناسایی مولکولی جدایه

جهت شناسایی مولکولی، مکان قطعه‌ی تکثیرشده در محدوده 1500bp با استفاده از مارکر، توسط الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR تأیید شد. نتایج حاصل از توالی‌یابی ژن 16SrRNA در پایگاه داده‌های ژنتیکی (NCBI) نشان داد که جدایه موردنظر دارای بیشترین میزان تشابه (۹۰/۱۷ درصد) با Uncultured *Streptomyces* sp. Clone RSS38 است و می‌توان نتیجه‌گیری نمود که جدایه موردنظر از جنس *استرپتومایسس* می‌باشد و می‌تواند به‌عنوان یک گونه جدید مطرح شود. نتایج PCR و آنالیز فیلوژنتیک با استفاده از روش

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-08]

neighbour joining این جدایه با سایر گونه‌های *استرپتومایسس* به‌ترتیب در شکل‌های شماره ۲ و ۳ نشان داده شده است. بررسی فعالیت ضدّمیکروبی جدایه به ۲ روش Cross streak و Well diffusion agar انجام شد. نتایج نشان داد که جدایه موردنظر دارای فعالیت ضدّمیکروبی قوی در برابر باکتری‌های پاتوژن مورد آزمایش می‌باشد و همان‌گونه که در جدول شماره ۵ مشاهده می‌شود، حساس‌ترین میکروارگانیسم در برابر فعالیت ضدّمیکروبی این جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر هاله عدم رشد برابر با ۰/۵±۲۴ میلی‌متر بود، در حالی‌که مقاوم‌ترین میکروارگانیسم *سودوموناس آئروجینوزا* با قطر هاله عدم رشد برابر با ۰/۵±۱۰ میلی‌متر بود (جدول‌های شماره ۵ و ۶). با توجه به آنالیز نتایج، در میزان اثربخشی جدایه SN7 در برابر باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت و گرم منفی، تفاوت معناداری ($P<0/05$) وجود دارد.

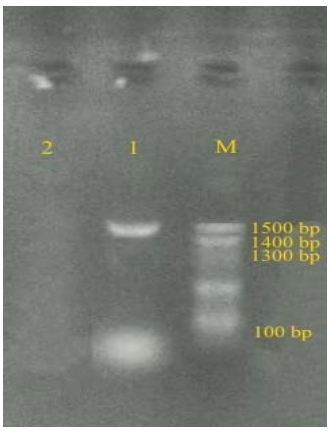
شکل شماره ۱- تصویر ماکروسکوپی ایزوله SN7 در محیط کشت SCA

جدول شماره ۳- خصوصیات مورفولوژی جدایه SN7 در محیط‌های کشت متفاوت پس از ۷ روز انکوباسیون در دمای ۲۸ °C

محیط کشت	میزان رشد	رنگ پشت کلنی	رنگ روی کلنی	پیگمان
Starch casein agar	عالی	سفید	طوسی روشن	+
Tryptone yeastextract agar(ISP1)	متوسط	کرم	بژ	+
Yeast extract malt extract agar (ISP2)	عالی	کرم	خاکستری	+
Inorganic salts starch agar(ISP4)	متوسط	سفید	کرم	-
Peptone yeast extract iron agar (ISP6)	ضعیف	کرم	نقره‌ای	-
Raffinose histidine agar	متوسط	سفید	کرم	-

جدول شماره ۴- خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژی جدایه SN7

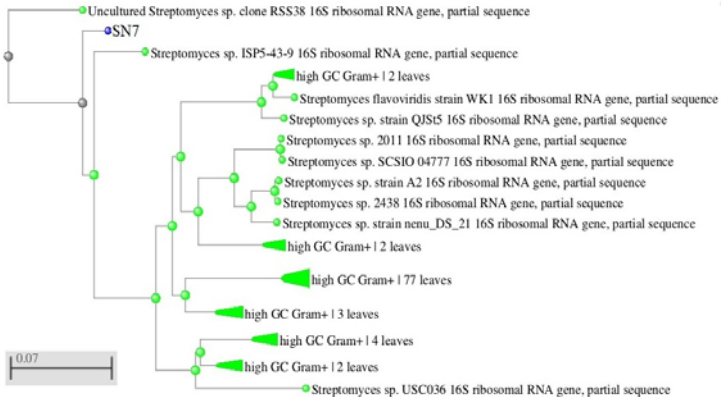
خصوصیات	نتایج	خصوصیات	نتایج	خصوصیات	نتایج	خصوصیات	نتایج
رنگ‌آمیزی گرم	+	تولید اوره	+	تحمل NaCl (%w/v)	٪۱-۳	دمای بهینه رشد	۲۸ °C
رنگ‌آمیزی اسید فست	-	تولید H_2S	-	رشد در ۴°C	-	مقاومت به کلرامفنیکل	-
تولید کاتالاز	+	تست MR	-	رشد در ۲۵°C	+	مقاومت به تتراسایکلین	-
تولید اکسیداز	+	تست VP	-	رشد در ۳۷°C	+	مقاومت به پنی‌سیلین	+
هیدرولیز نشاسته		تولید اندول	-	رشد در ۴۵°C	-	مقاومت به اریترومایسین	-



شکل شماره ۲- الکتروفورز محصول PCR جدایه SN7 بر روی ژل آگارز ۱ درصد

ستون M: مارکر، ستون ۱: محصول تکثیرشده، ستون۲: کنترل منفی

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-08]



شکل شماره ۳- ارتباط خویشاوندی جدایه SN7 با سایر گونه‌های *استرپتومایسس* براساس توالی‌یابی ژن 16SrRNA با استفاده از روش neighbour joining

جدول شماره ۵- بررسی فعالیت ضدّمیکروبی جدایه SN7 با استفاده از تکنیک Cross Streak (قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر)

جدایه	*M. luteus*	*B. cereus*	*S. aureus*	*P. mirailis*	*S. typhi*	*P. aeruginosa*
SN7	۱۵±۰/۵	۱۲±۰/۵	۱۱±۰/۸	۸±۰/۵	۱۰±۰/۸	۶±۰/۵

جدول شماره ۶- بررسی فعالیت ضدّمیکروبی جدایه SN7 با استفاده از تکنیک Well Diffusion Agar (قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر)

جدایه	*M. luteus*	*B. cereus*	*S. aureus*	*P. mirailis*	*S. typhi*	*P. aeruginosa*
SN7	۲۲±۰/۵	۲۱±۰/۸	۲۴±۰/۵	۱۳±۰/۸	۱۴±۰/۸	۱۰±۰/۵

بحث

شناسایی مواد آنتی‌بیوتیکی جدید به‌دلیل ظهور پاتوژن‌های جدید و مقاومت آنتی‌بیوتیکی بسیار مهم می‌باشد [۱۸،۱۹]. *استرپتومایسس‌ها* قادر به تولید متابولیت‌های فعال زیستی ثانویه [۲۰]، از جمله تعداد زیادی آنتی‌بیوتیک می‌باشند [۲۱]. اکتینومیست‌ها نقش با اهمیتی را نه‌تنها در کاربردهای درمانی بلکه در بازیافت ماده آلی ایفا می‌کنند [۲۱]. حدود دوسوم آنتی‌بیوتیک‌های شناخته‌شده توسط جنس *استرپتومایسس* تولید می‌شود [۲۲]. رسوبات دریایی منابعی قدرتمند جهت جداسازی اکتینومیست‌های تولیدکننده محصولات جدید هستند و به‌عنوان منبع آنتی‌بیوتیکی جدید و مواد ضدّسرطان شناخته می‌شوند [۲۱]. رسوبات دریایی دربردارنده طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌های منحصربه‌فرد هستند که در محیط‌های خاکی قابل یافت نمی‌باشند [۲۳]. اکثر متابولیت‌های تولیدشده توسط *استرپتومایسس* دارای فعالیت‌های ضدّمیکروبی قوی می‌باشند [۲۴]. طبق مطالعات انجام‌شده توسط Sibanda و همکاران، اکتینومیست‌های جداسازی‌شده از آب‌های شیرین دارای فعالیت ضدّمیکروبی می‌باشند [۲۵]. در مطالعه انجام‌شده توسط Locci در سال ۱۹۹۸ نشان داده شد که *استرپتومایسس‌ها* معمولاً جهت رشد، شرایط اسیدی خنثی و قلیایی را ترجیح می‌دهند و در شرایط خشک و با رطوبت متوسط فراوان می‌باشند [۲۶] که با نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق همخوانی دارد. در تحقیق حاضر، جدایه SN7 از رسوبات دریایی مناطق شرق استان گیلان جداسازی گردید. جدایه موردنظر، از طریق روش‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مولکولی مورد شناسایی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این جدایه دارای فعالیت ضدّمیکروبی قوی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا در طی غربالگری اوّلیه و ثانویه می‌باشد. نتایج فعالیت ضدّمیکروبی ایزوله موردنظر نشان داد که مقاوم‌ترین باکتری در برابر فعالیت ضدّمیکروبی، *سودوموناس آئروجینوزا* (با قطر هاله عدم رشد ۱۰±۰/۵) می‌باشد؛ در حالی‌که حساس‌ترین باکتری، *استافیلوکوکوس اورئوس* (با قطر هاله عدم رشد ۲۴±۰/۵) و پس از آن *میکروکوکوس لوتئوس* (با قطر هاله عدم رشد ۲۲±۰/۵) می‌باشد. در تحقیق انجام‌شده توسط هارون‌آبادی و همکاران نیز نشان داده شد که باکتری *سودوموناس آئروجینوزا* در برابر خاصیت ضدّمیکروبی *استرپتومایسس* دارای مقاومت بالایی است [۲۷] که با تحقیق حاضر مشابهت دارد. تفاوت حساسیت در میان باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌تواند به‌دلیل تفاوت‌های مورفولوژیکی مانند غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی باشد که دیواره سلولی را در برابر عصاره‌های لیپوفیلیک غیرقابل نفوذ می‌گرداند. باکتری‌های گرم مثبت به‌دلیل عدم وجود غشای خارجی بسیار حساس‌تر می‌باشند [۱۲]. محسنی و همکاران در سال ۲۰۱۳ تحقیقی را در رابطه با غربالگری اکتینومیست‌های تولیدکننده مواد

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-08]

ضدّمیکروبی از رسوبات دریای کاسپین انجام دادند و مشاهده کردند که اکتینومیست‌های جداسازی‌شده دارای فعالیت بیشتری علیه باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی می‌باشند [۸] که با نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق نیز همخوانی دارد. Valli و همکاران در سال ۲۰۱۲ در تحقیق خود نشان دادند که گونه‌های *استرپتومایسس* در مقایسه با سایر اکتینومیست‌ها فعالیت آنتاگونیسمی مؤثرتری از خود بروز می‌دهند. همچنین مشاهده شد که گونه‌های *استرپتومایسس* فعالیت ضدّمیکروبی قوی علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروجینوزا* داشته‌اند [۲]. در تحقیق حاضر نیز *استرپتومایسس* جداسازی‌شده دارای فعالیت ضدّمیکروبی قوی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* بود، اما *سودوموناس آئروجینوزا* مقاومت بالایی در برابر عملکرد ضدّمیکروبی ایزوله جداسازی‌شده داشت. Gebreyohannes و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مطالعه خود به جداسازی اکتینومیست‌ها از آب‌ها و رسوبات دریاچه تانا در کشور اتیوپی پرداختند و بیان نمودند که باکتری‌های گرم مثبت در برابر خاصیت ضدّمیکروبی حساس‌تر می‌باشند [۱۲] که با نتایج تحقیق حاضر مشابهت دارد. در مطالعه انجام‌شده از سوی Kokare و همکاران در سال ۲۰۰۴ دیده شد که باکتری‌های گرم مثبت در برابر خاصیت ضدّمیکروبی اکتینومیست‌ها دارای حساسیت بیشتری می‌باشند [۲۸] که مشابه نتایج به‌دست‌آمده در تحقیق حاضر است. از میان روش‌های مولکولی مختلف، مقایسه توالی‌های rRNA به‌مثابه ابزاری قدرتمند در رده‌بندی *استرپتومایسس*‌ها می‌باشد [۲۹]. در تحقیق حاضر، برای شناسایی مولکولی *استرپتومایسس* جداسازی‌شده، ژن 16S rRNA توالی‌یابی گردید و آنالیز آن توسط نرم‌افزار BLAST انجام شد. محیط کشت SCA به‌عنوان بهترین محیط جهت رشد بالای اکتینومیست‌ها شناسایی شده و در مقایسه با سایر محیط‌های کشت بسیار مطلوب‌تر است [۳۱،۳۰] که این امر می‌تواند به‌دلیل وجود میزان کافی مواد تغذیه‌ای در این محیط باشد [۱۲]. در تحقیق حاضر مشاهده شد که از میان محیط کشت‌های مختلف مورد بررسی قرارگرفته، مناسب‌ترین محیط کشت جهت رشد *استرپتومایسس*‌ها، محیط کشت SCA است و در محیط کشت فوق، *استرپتومایسس*‌ها دارای بالاترین میزان رشد می‌باشند و پس از آن نیز محیط کشت YEME مناسب‌ترین محیط، جهت رشد *استرپتومایسس*‌ها بود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که رسوبات دریایی مناطق شرقی استان گیلان از جنبه تولید متابولیت‌های فعال زیستی ثانویه مفید در زمینه صنعت داروسازی بسیار ارزشمند می‌باشند و با توجه به مقاومت روزافزون میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها توجه به پتانسیل این مناطق در زمینه تولید ترکیبات ضدّمیکروبی حائز اهمیت می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از تمامی عزیزانی که ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند، بسیار سپاسگزاریم.

References:

[1] Das A, Bhattacharya S, Mohammed A, Rajan S. *In vitro* Antimicrobial Activity and Characterization of Mangrove Isolates of Streptomycetes Effective against Bacteria and Fungi of Nosocomial Origin. ***Braz Arch Biol Technol*** 2014; 57(3): 349-56.

[2] Valli S, Suvathi S, Aysha O, Aysha OS, Nirmala P, Vinoth Kumar P, Reena A. Antimicrobial potential of actinomycetes species isolated from marine environment. ***Asian Pac J Trop Biomed*** 2012; 2(6): 469-73.

[3] Jabari M, Matroodi S, Zolgharnein H, Sharafi A, Zamani I. Screening, isolation and study of antifungal activity of marine actinomycetes from Deylam nearshore sediments. ***Iran J Med Microbiol*** 2016; 9(4): 87-94. [in Persian]

[4] Usha Y, Koppula S, Vishnuvardhan Z. Bioactive metabolites from marine sediments (Streptomyces species) of three coastal areas. ***Drug Invent Today*** 2011; 2(6): 114-17.

[5] Reddy N, Ramakrishna D, Rajagopal S. A morphological physiological and biochemical studies of *Streptomyces rochei* MTCC 10109 showing antagonistic activity against selective Human Pathogenic Microorganisms. ***Asian J Biol Sci*** 2011; 4(1): 1-14.

[6] Arasu MV, Duraipandiyan V, Valan S, Asha K, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S, et al. Characterization and phylogenetic analysis of novel polyene type antimicrobial metabolite producing actinomycetes from marine sediments: Bay of Bengal India. ***Asian Pac J Trop Biomed*** 2012; 2(10): 803-10.

[7] Claessen D, De Jong W, Dijkhuizen L, Wosten H. Regulation of Streptomyces development: reach for the sky. ***Trends Microbiol*** 2006;14:313-19.

[8] Mohseni M, Norouzi H, Hamedi J, Roohi A. Screening of Antibacterial Producing Actinomycetes from Sediments of the Caspian Sea. ***Int J Mol Cell Med*** 2013; 2(2): 64-71.

[9] Khattab A, Babiker E, Saeed H. Streptomyces: isolation, optimization of culture conditions and

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-08]

extraction of secondary metabolites. ***Int Curr Pharm J*** 2016; 5(3): 27-32.
[10] Kumar PS, Al-Dhabi NA, Duraipandiyan V, Balachandran C, Kumar P, Lgnacimuthu S. In vitro antimicrobial, antioxidant and cytotoxic properties of *Streptomyces lavendulae* strain SCA5. ***BMC Microbiol*** 2014; 14(1): 291.
[11] Naine SJ, Devi C, Mohanasrinivasan N, Vaishnavi B. Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activity of Marine *Streptomyces parvulus* VITJS11 Crude Extract. ***Braz Arch Biol Technol*** 2015; 58(2):198-207.
[12] Gebreyohannes G, Moges F, Sahile S. Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. ***Asian Pac J Trop Biomed*** 2013; 3(6): 426-35.
[13] Mathai D, Rhomberg P, Biedenbach D, Jones R. Evaluation of the in vitro activity of six broadspectrum β-lactam antimicrobial agents tested against recent clinical isolates from India: a survey of ten medical center laboratories. ***Diag Microbiol Infect Dis*** 2002; 44(4): 367-77.
[14] Ntsaluba L, Agundiade Q, Mabinya L, Okoh A. Studies on bioflocculant production by *Methylobacterium* sp. Obi isolated from a freshwater environment in South Africa. ***African J Microbiol Res*** 2011; 5: 4533-40.
[15] Alijani H, Matroodi S, Sharafi A, Zamani I. Diversity and antimicrobial activities of streptomyces isolated from intertidal sediments of Deylam, Iran. ***Razi J Med Sci*** 2017; 24(165): 22-31. [in Persian]
[16] Chaudhary SH, Yadav J, Shrivastava A, Singh S, Singh A, Gopalan N. Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). ***J Adv Pharm Tech Res*** 2013; 4: 118-23.
[17] Thirumalairaj J, Shanmugasundaram T, Sivasankari K, Natarajaseenivasan K, Balagurunathan R. Isolation, Screening and Charactrization of potent Marine *Streptomyces* sp. PM105 against antibiotic resistant pathogenes. ***Asian J Pharm Clin Res*** 2015; 8(2): 439-43.
[18] Axenov-Gibanov DV, Voytsekhovskaya I, Tokovenko B, Protasov E, Gamaiunov S, Rebets Y. Actinobacteria Isolated from an Underground Lake and Moonmilk Speleothem from the Biggest Conglomeratic Karstic Cave in Siberia as Sources of Novel Biologically Active Compounds. ***PLoS ONE*** 2016; 11(2): e0149216.
[19] Monciardini P, Iorio M, Maffioli S, Sosio M, Donadio S. Discovering new bioactive molecules from microbial sources. ***Microb Biotech*** 2014; 7: 209-20.
[20] Sajid I, Shaaban K, Hasnain S. Identification, isolation and optimization of antifungal metabolites from the *Streptomyces Malachitofuscus* ctf9. ***Braz J Microbiol*** 2011; 2: 592-604.
[21] Sweetline C, Usha R, Palaniswamy M. Antibacterial Activity of Actinomycetes from Pichavaram Mangrove of Tamil Nadu. ***Appl J Hygien*** 2012; 1(2): 15-18.
[22] Bhavana M, Talluri V, Kumar K, Rajagopal S. Optimization of culture conditions of *Streptomyces carpaticus* (MTCC-11062) for the production of antimicrobial compound. ***Int J Pharm Pharm Sci*** 2014; 6(8): 281-5.
[23] Stach JE, Maldonado L, Masson D, Ward A, Goodfellow M, Bull A. Statistical approaches for estimating actinobacteria diversity in marine sediments. ***Appl Environ Microbiol*** 2003;69:6189-200.
[24] Singh LS, Sharma H, Talukdar N. Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, *Streptomyces sannanensis* strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India. ***BMC Microbiol*** 2014; 14: 278.
[25] Sibanda T, Mabinya L, Mazomba N, Akinpelu D, Bernard K, Olaniran A, et al. Antibiotic producing potentials of three freshwater actinomycetes isolated from the Eastern Cape Province of South Africa. ***Int J Mol Sci*** 2010; 11: 2612-23.
[26] Locci R. Streptmyces and related genera in. ***Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*** 41998. p. 2451-508.
[27] Harounabadi S, Shokouhi Mostafavi S, Eghbali Shamsabad P, Meybodi S. Measurement of antimicrobial activity of isolated bacteria from the Caspian sea and molecular identification of strains with antimicrobial effect. ***BJM*** 2015; 4(15): 167-78. [in Persian]
[28] Kokare CR, Mahadik K, Kadam S, Chopade B. Isolation, characterization and antimicrobial activity of marine halophilic Actinopolyspora species AH1 from the west coast of India. ***Curr Sci*** 2004; 86(4): 593-7.
[29] Kumar V, Bharti A, Gusain O, Bisht G. An Improved Method for Isolation of Genomic DNA from Filamentous Actinomycetes. ***J Sci Engg Tech Mgt*** 2010; 2(2): 10-13.
[30] Remya M, Vijayakumar R. Isolation and characterization of marine Antagonistic Actinomycetes from west coast of India. ***J Med Biol*** 2008; 15(1): 13-19.
[31] Senthilkumar S, Sivakumar K, Kannan L. Mercury resistant halophilic Actinomycetes from the salt marsh environment of velar estuary, southeast coast of India. ***J Aqua Biol*** 2005; 20(1): 141-5.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-08]