مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی، دوره ۱۴، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۸
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

DOI: 10.22100/jkh.v14i2.2258

مقاله پژوهشی

بررسی فعالیت ضدمیکروبی Streptomyces tendae strain 944 جدا شده از خاک‌های مناطق شرق استان گیلان و بهینه‌سازی ترکیبات فعال زیستی آن

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

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۰۷ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۸/۳/۲۸

چکیده

مقدمه: *استرپتومایسس‌ها، میکروارگانیسم‌هایی می‌باشند که در انواع منابع طبیعی به‌خصوص در خاک حضور دارند و قادر به تولید طیف وسیعی از انواع ترکیبات ضدمیکروبی می‌باشند. شیوع مقاومت میکروبی در بین میکروارگانیسم‌های پاتوژن روبه افزایش است. هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی مولکولی استرپتومایسس تولیدکننده ترکیبات ضدمیکروبی و بهینه‌سازی شرایط تولید آن می‌باشد.*

مواد و روش‌ها: *استرپتومایسس از خاک‌های مناطق مختلف شرق استان گیلان جداسازی شد. سپس به شناسایی مورفولوژی، فیزیولوژی و بیوشیمیایی آن پرداخته شد و در نهایت شناسایی مولکولی ایزوله موردنظر با استفاده از توالی‌یابی SrRNA ۱۶ و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک انجام گرفت. بررسی فعالیت ضدمیکروبی در برابر میکروارگانیسم‌های پاتوژن آزمایش شده و بهینه‌سازی ترکیبات ضدمیکروبی تولید شده در محیط‌های تغذیه‌ای و شرایط متفاوت مانند منابع کربن و نیتروژن، pH، مدت زمان گرمخانه‌گذاری و دما انجام گردید.*

نتایج: *براساس نتایج مطالعات فیلوژنتیکی و توالی‌یابی ۱۶ SrRNA، با ۹۷/۳۴٪ اطمینان سویه Streptomyces tendae strain 944 شناسایی شد. این باکتری دارای فعالیت ضدمیکروبی علیه میکروارگانیسم‌های پاتوژن شامل 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 بوده است. پس از انجام بهینه‌سازی؛ بهترین محیط کشت، pH، دمای بهینه، منابع کربن و نیتروژن و مدت زمان انکوباسیون به‌ترتیب ISP2، 7، 0 C 28، گلوکز، عصاره مخمر و ۷ روز بودند.*

نتیجه‌گیری: *نتایج این تحقیق که اولین گزارش از غربال‌گری استرپتومایسس‌های تولیدکننده ترکیبات فعال زیستی در نواحی شرقی استان گیلان می‌باشد، نشان می‌دهد که خاک‌های نواحی شرقی استان گیلان منبع بسیار غنی از استرپتومایسس‌های تولیدکننده ترکیبات ضدمیکروبی می‌باشد که می‌تواند در تولید ترکیبات ضدمیکروبی با منشأ طبیعی بسیار حائز اهمیت باشد.*

واژه‌های کلیدی: Streptomyces tendae strain 944، ترکیبات ضدمیکروبی،SrRNA۱۶، بهینه‌سازی.

***نویسنده مسئول:** دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان- دانشکده علوم پایه- گروه میکروبیولوژی ، **تلفن:** ۰۹۱۱۲۴۲۲۷۳۰، **نمابر:** ۰۱۳۴۲۲۲۶۰۶، issa_kaam@yahoo.com **Email:**

ارجاع: میرسنبل سیده زهرا، عیسی‌زاده خسرو، ضرابی سعید، میرپور میرساسان. بررسی فعالیت ضدمیکروبی Streptomyces tendae strain 944 جدا شده از خاک‌های مناطق شرق استان گیلان و بهینه‌سازی ترکیبات فعال زیستی آن. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۳۹۸؛۱۴(۲):۳۸-۴۶.

مقدمه

میکروارگانیسم‌های موجود در خاک، منبع مناسبی جهت جداسازی و شناسایی فرآورده‌های دارای خاصیت درمانی می‌باشند (۱). جنس استرپتومایسس متعلق به گروه اکتینوباکتری‌ها می‌باشد که گونه‌های آن در محیط‌های آبی و خاکی به‌طور گسترده حضور دارند (۲ و ۳). این گروه از باکتری‌ها، گرم مثبت رشته‌ای هستند (۳ و ۴) که DNA آنها حاوی بیش از ۷۰ درصد GC می‌باشد (۵). استرپتومایسس‌ها، به‌دلیل توانایی‌شان در تولید بسیاری از متابولیت‌های ثانویه جدید از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌عنوان میکروارگانیسم‌های ارزشمند در صنعت شناخته شده‌اند (۶). باکتری‌های این جنس در صنعت به‌عنوان میزبان جهت بیان ژن‌های هتروژنوس که سبب تولیدات بهتر بیوتکنولوژی می‌گردند، مورد استفاده قرار می‌گیرند (۷). این باکتری‌ها نقش مهمی در حفظ تعادل بیوسفر از طریق تجزیه کردن ذرات نامحلول سایر ارگانیسم‌ها مانند لیگنوسلولز و کیتین ایفا می‌کنند (۷) و همچنین نقش مهمی در فرآیند معدنی شدن در طبیعت دارند (۸). گونه‌های مختلف استرپتومایسس در حدود ۷۵ درصد آنتی‌بیوتیک‌های مفید در زمینه پزشکی را تولید می‌کنند (۷ و ۱۲). از جمله آنتی‌بیوتیک‌های مهم جداسازی شده از استرپتومایسس‌ها، اریترومایسین و کلروتتراسایکلین از Streptomyces auerofaciens و استرپتومایسین از S. griseus erythaeus می‌باشند (۹). این باکتری‌ها قادر به رشد در محیط‌های متفاوت می‌باشند (۱۰). بیش از ۵۰۰ سویه از جنس استرپتومایسس شناسایی شده است (۱۱). شیوع مقاومت به آنتی‌بیوتیک در میکروارگانیسم‌های پاتوژن در حال افزایش است که منجر به ایجاد عفونت‌های جدی شده و به‌عنوان یک مشکل جهانی در قرن ۲۱ محسوب می‌گردد (۱۳) و همچنین این مقاومت، دومین عامل منجر به مرگ در جهان محسوب می‌شود (۱۴) به همین دلیل تحقیق در زمینه متابولیت‌های ثانویه میکروبی، امری مهم به جهت نیاز به آنتی‌بیوتیک‌های جدید است (۱۵).

هدف از این تحقیق بررسی فعالیت ضدمیکروبی استرپتومایسس‌های جداسازی شده از خاک‌های مناطق مختلف شرق استان گیلان به‌منظور بهینه‌سازی ترکیبات ضدمیکروبی تولید شده توسط آن‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ابتدا نمونه‌های خاک از عمق ۱۰-۵ سانتی‌متری مناطق مختلف شرق استان گیلان توسط بیلچه درون ظرف‌های شیشه‌ای استریل جمع‌آوری شد و در کوتاه‌ترین زمان ممکن (کمتر از ۲۴ ساعت) به آزمایشگاه جهت انجام آزمایش‌های موردنظر منتقل شد و تا زمان آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردیدند. نمونه‌ها در ابتدا به مدت ۵ روز در دمای اتاق خشک و سپس الک شدند. در مرحله بعدی از روش رقیق‌سازی متوالی استفاده گردید (۱۱ و ۱۶) و از خاک‌ها رقت‌های ۱۰ تا ۷-۱۰ تهیه شد و ۱ میلی‌لیتر از هر رقت در محیط Starch Casein Agar(SCA) کشت داده شد. به‌منظور جلوگیری از رشد باکتری و قارچ به محیط SCA به‌ترتیب mg/L25 کانامایسین و mg/L 500 سیکلوهگزامید اضافه گردید (۹). سپس پلیت‌ها به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و جدایه‌ها بر مبنای خصوصیات موفولوژی شامل ظاهری خشک و گچی شناسایی گردیدند.

باکتری‌های جداشده در غربال‌گری اولیه با استفاده از روش Cross Streak علیه میکروارگانیسم‌های پاتوژن بررسی شدند (۱ و ۱۷). در این روش جدایه‌های استرپتومایسس به‌صورت خطی عمود در وسط پلیت حاوی محیط کشت Nutrient agar تلقیح شدند و پلیت‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند.

سپس باکتری‌های پاتوژن به‌صورت خطهای عمود بر جدایه استرپتومایسس، کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. جهت غربال‌گری ثانویه از روش Well diffusion agar استفاده شد (۱۶). در ابتدا استخراج متابولیت‌های ضدمیکروبی به روش کشت غوطه‌وری (state fermentation method submerged) انجام گردید (۱۶). در این روش، کلنی‌های موردنظر به محیط Yeast extract malt extract broth (ISP2) تلقیح شدند و به مدت ۱۴ روز در شیکرانکوباتور rmp 150 در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. پس از گذشت مدت موردنظر محیط‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شدند، سپس مایع‌رویی جداسازی گردید و برابر با حجم مایع‌رویی به آن اتیل استات اضافه شده و لایه آلی جداسازی و تغلیظ شد. در روش انتشار در چاهک، از محیط Mueller Hinton Agar استفاده شد. در ابتدا با استفاده از سوآپ استریل، از سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند میکروارگانیسم‌های پاتوژن، کشت سفره‌ای انجام شد و سپس از عصاره استخراج شده در چاهک‌های تعبیه شده، ریخته شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند و سپس به محاسبه هاله عدم رشد ایجاد شده بر حسب میلی‌متر پرداخته شد.

میکروارگانیسم‌های پاتوژن جهت بررسی مطالعات ضدمیکروبی شامل Micrococcus luteus PTCC 1408، Bacillus cereus PTCC 1154، Staphylococcus aureus PTCC 1189، Psedomonas aeruginosa PTCC 1310، Salmonella typhi PTCC 1609 و Proteus mirabilis PTCC 1776 بودند که از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند.

شناسایی استرپتومایسس با استفاده از روش‌های مورفولوژی، فیزیولوژی و بیوشیمیایی با انجام آزمایش‌هایی مانند کاتالاز، اوره آز، هیدرولیز نشاسته، SIM، MR-VP و تحمل NaCl صورت پذیرفت (۱۶) و سپس به شناسایی مولکولی آن پرداخته شد.

شناسایی مولکولی ایزوله‌ی جداسازی شده با استفاده از توالی‌یابی ژن SrRNA۱۶ و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک صورت گرفت. استخراج DNA با روش جوشاندن (boiling) انجام شد (۱۸). در این روش، میکروتیوب حاوی کلنی باکتری که در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به‌صورت سوسپانسیون در آمده بود، در حرارت آب جوش به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و سپس در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع‌رویی جهت انجام واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از پرایمرهای F27(AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3')'۵ و R 1492(GGTTACCTTGTTACGACTT3') 5'، انجام پذیرفت (۱۹). حجم و غلظت مواد استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز عبارت بودند از: DNA الگو با غلظت ۱۰میکروگرم بر میکرولیتر، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR X10، 1 میکرولیتر از هر یک از پرایمرها با غلظت ۲۰ پیکومولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP 10 میلی‌مولار، ۱/۵ میکرولیتر منیزیم کلراید ۵۰ میلی‌مولار، ۲/۵ میکرولیتر آنزیم تک پلی مراز. مراحل واکنش PCR شامل واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۳۵ سیکل واسرشت‌سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مراحل اتصال در ۵۲ درجه سانتی‌گراد، بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب زمانی ۳۰ ثانیه، ۴۵ ثانیه و ۵ دقیقه صورت گرفت. پس از تکثیر قطعه bp 1500 ژن SrRNA۱۶ ، الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ حاوی بافر تریس X1 به مدت حدود یک ساعت در ولتاژ ۷۲ انجام شد. در نهایت برای مشاهده نتایج ژل، از دستگاه ژل داک استفاده شد و سپس محصول PCR به‌دست آمده برای تعیین توالی به شرکت بیونر 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 بررسی گردید. سپس ترسیم درخت فیلوژنی با استفاده از روش Neighbor Joining انجام شد (۲۰).

شرایط محیطی و شاخص‌های تغذیه‌ای نقش مهمی را در تولید ترکیبات ضدمیکروبی ایفا می‌کنند (۲۱). در این تحقیق به بررسی شرایط بهینه موردنیاز جهت بیشترین میزان تولید ترکیبات ضدمیکروبی توسط S.tendae strain 944 پرداخته شد.

جدایه موردنظر در محیط‌های متفاوت مانند Inorganic salt agar (ISP4)، Starch casein broth (SCB)، Mueller hinton broth(MHB)، ISP1 (Tryptone Yeast extract broth) و Yeast extract malt extract broth) ISP2) تلقیح شد و به مدت ۷ روز در شیکر انکوباتور ۲۸ درجه سانتی‌گراد با دور rpm 150 گرمخانه‌گذاری گردید و سپس به بررسی مطلوب‌ترین محیط کشت جهت بالاترین میزان تولید ترکیبات ضدمیکروبی پرداخته شد.

جهت تولید بالاترین میزان متابولیت‌های فعال به بررسی pHهای مختلف شامل ۵ تا ۱۱ پرداخته شد. S. tendae strain 944 درمحیط کشت بهینه با pHهای موردنظر کشت داده شد و به مدت ۷ روز در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با دور rpm 150 گرمخانه‌گذاری گردید.

جدایه موردنظر در محیط کشت و pH بهینه در دماهای مختلف اعم از ۴۵، ۳۷، ۳۲، ۲۸ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد تلقیح گردید و به مدت ۷ روز در شیکر انکوباتور با دماهای موردنظر و دور rpm150 جهت بررسی حداکثر تولید ترکیبات ضدمیکروبی گرمخانه‌گذاری شد.

جهت بررسی بیش‌ترین میزان تولید ترکیبات ضدمیکروبی از منابع کربن و نیتروژن متفاوتی استفاده شد. منابع کربن مورد استفاده در محیط کشت شامل گلوکز، سوکروز، آرابینوز، گلیسرول و مالتوز هرکدام در حجم v/v 1% و منابع نیتروژنی به‌کار برده شده شامل پپتون، کازئین، عصاره مالت و عصاره مخمر هر کدام به میزان v/v 1% بوده است. S. tendae strain 944 به محیط کشت حاوی منابع مختلف کربن و نیتروژن، تلقیح گردید و به مدت ۷ روز در شیکر انکوباتور با دمای بهینه با دور rpm150 گرمخانه‌گذاری شد.

جهت بررسی مدت زمان بهینه در تولید بیشترین میزان ترکیبات ضدمیکروبی، S. tendae strain 944 در محیط کشت بهینه حاوی منابع کربن و نیتروژن، دما و pH بهینه در زمان‌های متفاوت مانند ۱۹۲، ۱۶۸، ۱۴۴، ۱۲۰، ۹۶، ۷۲، ۴۸، ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور، گرمخانه‌گذاری گردید.

نتایج

جداسازی S. tendae strain 944 از خاک‌های مناطق شرق استان گیلان صورت پذیرفت. جدایه موردنظر از لحاظ ویژگی‌های مورفولوژی مورد بررسی قرار گرفت که در محیط SCA به‌صورت ظاهری خشک و چروکیده و چسبیده به محیط کشت مشاهده شد (شکل ۱). بررسی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک این جدایه در جدول ۱ آمده است.

تجزیه و تحلیل ژن 16SrRNA با استفاده از نرم‌افزار BLAST با سایر باکتری‌ها در پایگاه داده‌های ژنتیکی (NCBI) نشان داد که این توالی با ۹۷/۳۴٪ اطمینان، سویه S. tendae strain 944 می‌باشد. نتایج PCR و بررسی ارتباط خویشاوندی S. tendae strain 944 با سایر گونه‌های استرپتومایسس با استفاده از روش Neighbor joining، به‌ترتیب در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است.

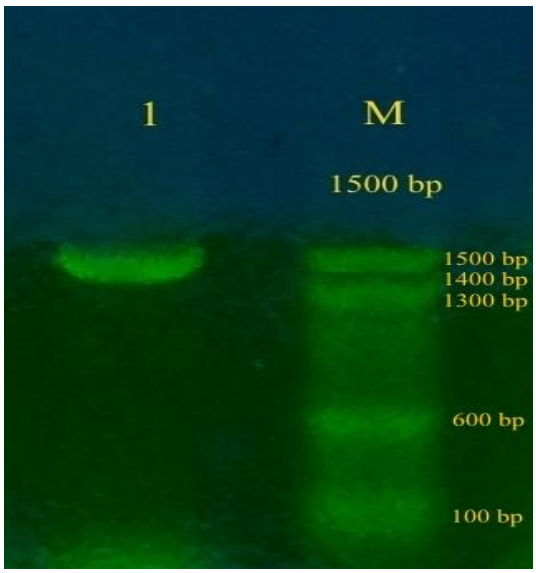
نتایج حاصله نشان می‌دهد که جدایه موردنظر دارای فعالیت ضدمیکروبی علیه میکروارگانیسم‌های پاتوژن بوده و همان‌گونه که در جدول‌های ۲ و ۳ مشاهده می‌گردد دارای بیش‌ترین فعالیت ضدمیکروبی علیه M. luteus می‌باشد.

شکل ۱- تصویر ماکروسکوپی S. tendae strain 944 در محیط کشت SCA

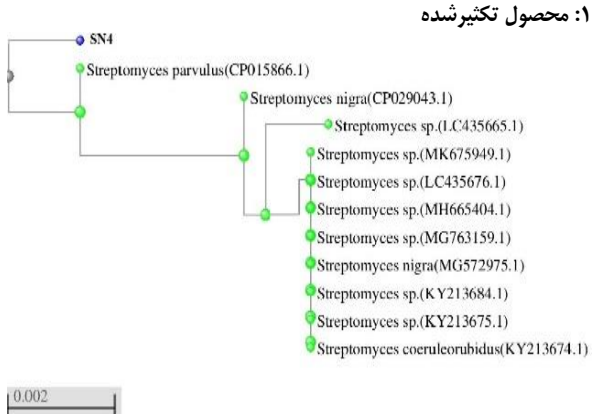
جدول ۱- خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژی S. tendae strain

نام آزمایش	نتایج
رنگ‌آمیزی گرم	+
رنگ‌آمیزی اسید فست	-
رنگ‌آمیزی اسپور	+
کاتالاز	+
اکسیداز	+
هیدرولیز نشاسته	+
حرکت	-
MR	-
VP	-
اندول	-
تولید H_2S	-
اوره آز	+
رشد در	
4^0C-	-
28^0C-	+
37^0C-	+
45^0C-	-
رشد در ۱٪ NaCl	+
رشد در ۳٪ NaCl	+
رشد در ۵٪ NaCl	+
رشد در ۷٪ NaCl	-
مقاومت آنتی‌بیوتیکی:	
مقاومت به کلرامفنیکل	+
مقاومت به تتراسایکلین	-
مقاومت به پنی‌سیلین	+

نتایج نشان می‌دهد که محیط کشت ISP2 در مقایسه با سایر محیط‌های کشت آزمایش شده، دارای بالاترین فعالیت ضدمیکروبی علیه میکروارگانیسم‌های پاتوژن می‌باشد (نمودار ۱).



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪. ستون M: مارکر، ستون ۱: محصول تکثیرشده



شکل ۳- ارتباط خویشاوندی S. tendae strain 944 با سایر گونه‌های استرپتومایسس براساس توالی ژن 16SrRNA با استفاده از روش Neighbor joining SN4: S. tendae strain 944 (Accession number HQ607409.1)

در ارتباط با اثر pHهای مختلف در تولید ترکیبات ضدمیکروبی، بیش‌ترین فعالیت در pH برابر با ۷ مشاهده شد که علیه B. cereus می‌باشد (نمودار ۲).

همان‌گونه که در نمودار ۳ ملاحظه می‌گردد، بیش‌ترین فعالیت ضدمیکروبی در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد علیه S. aureus است.

در مقایسه منابع کربن و نیتروژن مختلف که در این تحقیق به کار برده شد، گلوگز و عصاره مخمر به‌ترتیب به‌عنوان مناسب‌ترین منبع کربن و نیتروژن، با بالاترین فعالیت ضدمیکروبی علیه پاتوژن‌ها مشاهده گردیدند (نمودار ۴ و ۵).

بالاترین اثر مهارکنندگی رشد پاتوژن‌ها در زمان ۱۴۴ ساعت علیه B. cereus و M. luteus می‌باشد (نمودار ۶).

جدول ۲- فعالیت ضدمیکروبی S. tendae strain 944 به روش Cross Streak

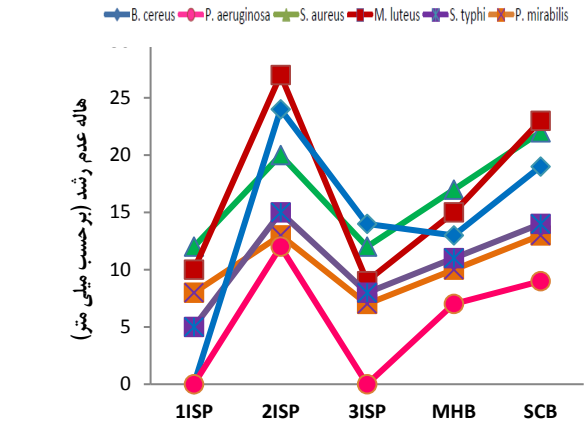
ایزوله	S. aureus	B. cereus	M. luteus	P. aeruginosa	S. typhi	P. mirabilis
SN4	++	++	+++	_	+	++

هاله عدم رشد کمتر از ۵ میلی‌متر: (–) هاله عدم رشد بین ۵ تا ۱۰ میلی‌متر: (+) هاله عدم رشد بین ۱۱ تا ۱۵ میلی‌متر: (++) هاله عدم رشد بیشتر از ۱۵ میلی‌متر: (+++)SN4: S. tendae strain 944

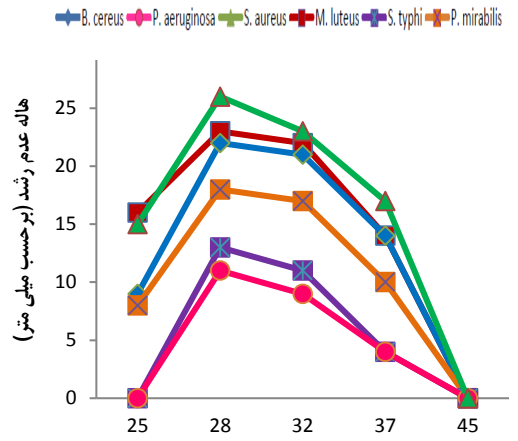
جدول ۳- فعالیت ضدمیکروبی S. tendae strain 944 به روش Well diffusion agar

ایزوله	S.aureus	B.cereus	M.luteus	P.aeruginosa	S.typhi	P.mirabilis
SN4	++	++	+++	+	+	++

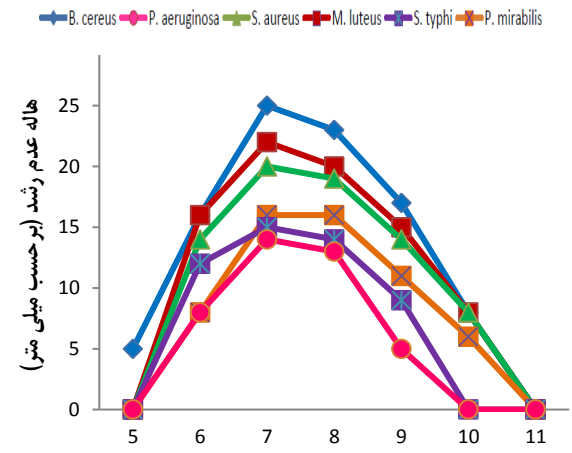
هاله عدم رشد کمتر از ۵ میلی‌متر: (–) هاله عدم رشد بین ۵ تا ۱۰ میلی‌متر: (+) هاله عدم رشد بین ۱۱ تا ۱۵ میلی‌متر: (++) هاله عدم رشد بیشتر از ۱۵ میلی‌متر: (+++)N4: S. tendae strain 944



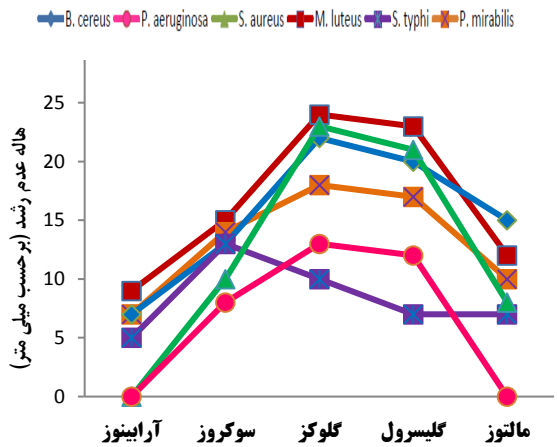
نمودار ۱- تأثیر محیط‌های کشت متفاوت در فعالیت ضدمیکروبی S. tendae strain 944



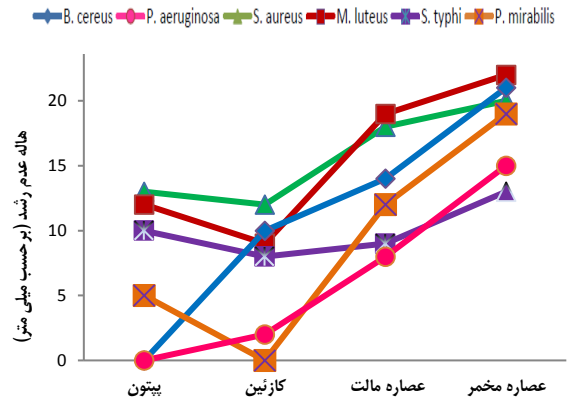
نمودار ۳- تأثیر دماهای متفاوت در فعالیت ضدمیکروبی S. tendae strain 944



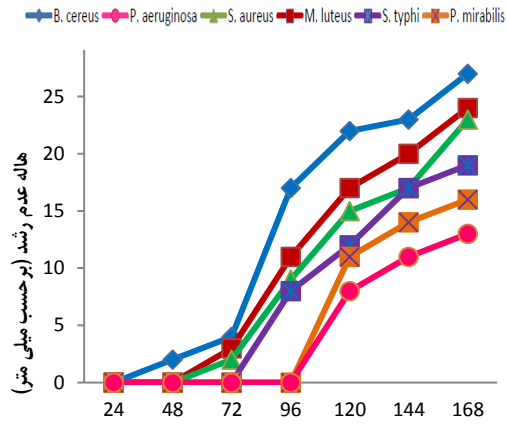
نمودار ۲- تأثیر pH های متفاوت در فعالیت ضدمیکروبی S. tendae strain 944



نمودار ٤- تأثیر منابع کربن متفاوت در فعالیت ضدمیکروبی S. tendae strain 944



نمودار ۵- تأثیر منابع نیتروژن متفاوت در فعالیت ضدمیکروبی S. tendae strain 944



نمودار ٦- تأثیر مدت زمان انکوباسیون متفاوت در فعالیت ضدمیکروبی S. tendae strain 944

بحث

جستجوی فرآورده‌های طبیعی نوین با خاصیت دارویی مفید، اغلب شامل جداسازی گونه‌های استرپتومایسس از نمونه‌های خاک می‌باشد (۲۲). استرپتومایسس‌ها به دلیل قابلیت تولید ترکیبات فعال زیستی متنوع (۱۹ و ۲۳) چندین دهه است که توجه محققان زیادی را به خود جلب نموده‌اند (۱۹). آنزیم کیتیناز تولید شده توسط استرپتومایسس، در کنترل عوامل ایجادکننده خسارت در گیاهان دارای اهمیت بوده (۲۴) و همچنین به‌عنوان محرک رشد گیاه می‌باشد (۲۵). اسکای و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که خاک‌های کشاورزی دارای تنوع بالایی از اکتینومیست‌ها بوده (۱۱) که با نتایج به‌دست آمده در این تحقیق همخوانی دارد. استرپتومایسس‌ها قادر به تولید آنتی‌بیوتیک‌ها (۳۲-۲۶)، آنزیم‌ها (۱۷، ۲۶، ۳۳ و ۳۴)، ویتامین‌ها، مواد آرایشی، عوامل ضد تومور بوده و نقش اصلی در بازیافت مواد معدنی در خاک را ایفا می‌کنند (۴ و ۲۷). ۴۵ درصد از متابولیت‌های فعال زیستی توسط اکتینومیست‌ها تولید می‌گردد که از این میان استرپتومایسس‌ها تولید حدود ۷۶۰۰ ترکیب را به عهده دارند (۳۱). امروزه مقاومت به داروهای ضدمیکروبی در بیماری‌های عفونی، دومین عامل منجر به مرگ و میر در جهان است (۱۴).

در این تحقیق باکتری S. tenade strain 944 از مناطق شرقی استان گیلان جداسازی گردید و از طریق روش‌های بیوشیمیایی، مورفولوژی، فیزیولوژی و روش‌های مولکولی شناسایی شد. این سویه، فعالیت ضدمیکروبی با طیف وسیعی را علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در غربال‌گری اولیه و ثانویه از خود نشان داد. می‌توان گفت که اثر ضدمیکروبی سویه موردنظر، دارای تأثیر بالاتر در برابر باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد. در تحقیقی که از سوی گبریوهاننس و همکاران در سال ۲۰۱۳ در اتیوپی صورت گرفت، نشان داده شد که باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با گرم مثبت‌ها، دارای مقاومت بیشتری به اثر ضدمیکروبی بوده که می‌توان آن را به ساختار متفاوت غشای خارجی در باکتری‌های گرم منفی که دارای ترکیبات لیپوپلی ساکاریدی می‌باشند که منجر به غیرقابل نفوذ بودن آنها در برابر مواد ضدمیکروبی می‌گردد (۱۶ و ۳۵). از میان روش‌های مولکولی مختلف، سنجش سکانس‌های rRNA ابزاری بسیار قدرتمند در رده‌بندی استرپتومایسس‌ها می‌باشد (۳۶) که در این تحقیق هم جهت شناسایی باکتری جداسازی شده از روش بررسی تعیین توالی ژن SrRNA۱۶ استفاده گردید. در این تحقیق به بررسی بهینه‌سازی محیط کشت، دما، pH، منابع کربن و نیتروژن و در نهایت مدت زمان انکوباسیون در تولید بالاترین میزان ترکیبات ضدمیکروبی پرداخته شد. بهینه‌سازی محیط کشت یک امر مهم جهت بالاترین میزان تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد و تولید این ترکیبات توسط استرپتومایسس‌ها تحت شرایط مختلف تغذیه‌ای می‌تواند افزایش یا کاهش یابد (۲۱). در ارتباط با بهینه‌سازی محیط کشت، گرچه این جدایه در ۵ محیط مورد آزمایش، قادر به رشد بوده است اما بیش‌ترین رشد و فعالیت ضدمیکروبی در محیط ISP2 و SCB به‌عنوان مناسب‌ترین محیط‌های کشت جهت تولید بالاترین ترکیبات ضدمیکروبی مشاهده شدند. در تحقیقی که توسط خاطاب و همکاران در سال ۲۰۱۶ انجام شد، بهینه مدت زمان انکوباسیون جهت تولید بیشترین ترکیبات ضدمیکروبی ۷ روز عنوان شد (۳۷) که با نتایج به‌دست آمده در این تحقیق مشابهت دارد. در تحقیقی که از سوی نایک و همکاران در سال ۲۰۱۵ در هند، در ارتباط با بهینه‌سازی شرایط محیطی در تولید متابولیت‌های ثانویه S. zaomyceticus RC 2073 انجام شد، دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و pH برابر با ۷، به‌ترتیب به‌عنوان بهینه دما و pH در تولید بیشترین متابولیت‌های ثانویه معرفی شدند (۲۱) و نیز در تحقیقی دیگر که توسط دزفولی و همکاران در کشور هند انجام گردید و به بهینه‌سازی ترکیبات ضدمیکروبی تولید شده توسط S. flavogriseus strain ACTK2 پرداخته شد، بهینه دما جهت بیشترین میزان تولید

ترکیبات ضدمیکروبی، ۲۸ درجه سانتی‌گراد نتیجه‌گیری شد (۲۰) که با تحقیق انجام شده پیش‌رو، دارای هماهنگی است.

در این مطالعه نتیجه‌گیری شد که pH به‌عنوان یک عامل مهم در تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد که با تحقیقات انجام شده توسط بهاوانا و همکاران (۳۸) در سال ۲۰۱۴، هماهنگی دارد که در pH نزدیک به خنثی دارای بالاترین میزان تولید ترکیبات ضدمیکروبی است. همچنین در تحقیق انجام شده توسط هارون آبادی و همکاران در سال ۱۳۹۳ در بررسی فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های جداسازی شده از دریای خزر، نتیجه گرفتند که در pH برابر با ۷ دارای بالاترین اثر ضدمیکروبی است (۳۹). در تحقیق پیش رو، از میان منابع مختلف کربن آزمایش شده نظیر گلوکز، گلیسرول، سوکروز، آرابینوز و مالتوز، گلوکز به‌عنوان بهترین منبع کربن در تولید ترکیبات ضدمیکروبی مشاهده شد. اهمیت گلوکز در محیط جهت سنتز طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها توسط سویه‌های متفاوت استرپتومایسس به‌وسیله محققین گزارش شده است (۶، ۲۰ و ۴۰). بهاوانا و همکاران در سال ۲۰۱۴ که مطالعه بر روی بهینه‌سازی شرایط محیطی S. carpaticus MTCC-11062 جهت تولید ترکیب ضدمیکروبی را انجام دادند، گلوکز و پس از آن گلیسرول را به‌عنوان بهترین منابع کربن در تولید مواد ضدمیکروبی معرفی کردند (۳۸) که با این تحقیق مطابقت دارد. همچنین در تحقیق حاضر عصاره مخمر و عصاره مالت به‌عنوان مطلوب‌ترین منابع نیتروژن در بالاترین میزان تولید ترکیبات ضدمیکروبی بوده‌اند که با نتایج به‌دست آمده از سوی بهاوانا و همکاران در سال ۲۰۱۴ که در آن پپتون و soybean meal به‌عنوان بهترین منابع نیتروژن در بالاترین میزان تولید ترکیبات ضدمیکروبی بوده‌اند (۳۸)، مغایرت دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

1 .Chaudhary HS, Yadav J, Shrivastava AR, Singh S, Singh AK, 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.doi: 10.4103/2231-4040.111528

2. Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim SK. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. Microbial Res 2013;169:262-78. doi: 10.1016/j.micres.2013.07.014

3. Oskay M, Üsame Tamer A, Azeri C. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. African Journal of Biotechnology 2004;3:441-6.

4. Velayudham S, Murugan K. Diversity and antibacterial screening of actinomycetes from javadi hill forest soil, tamilnadu, India. Journal of Microbiology Research 2012;2:41-6. doi:10.5923/j.microbiology.20120202.07

5. Maleki H, Dehnad A , Hanifian SH, Khani S. Isolation and Molecula Identification of *Streptomyces spp*. with Antibacterial Activity from Northwest of Iran. *BioImpacts*, 2013;3:129-134.[Persian]. doi: 10.5681/bi.2013.017

6. Sujatha P, Bapi Raju KV, Ramana T. Studies on a new marine *streptomycete* BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiol Res 2005;160:119-126.doi: 10.1016/j.micres.2004.10.006

7. Zhou Z, Gu J, Li YQ, Wang Y. Genome plasticity and systems evolution in *Streptomyces*. BMC Bioinformatics 2012;13:S8. doi: 10.1186/1471-2105-13-S10-S8

8. Manteca A and Sanchez J. *Streptomyces* Development in Colonies and Soils. Applied and Environmental Microbiology2009;75:2920-4. doi:10.1128/AEM.02288-08

9. Amirmozaffari N, Darvishi Vizaneh S, Isazadeh K, Taheri AR. Isolation of actinomycetes producing antibacterial against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from soils of Astara region.Qom Univ Med Sci J 2014;8:59-68.[Persian].

10. Mohanraj G, Sekar T. Isolation and screening of actinomycetes from marine sediments for their potential to produce antimicrobials. Int J LifeSc. Bt&Pharm. Res 2013;2:115-26.

11. Rotich M.C, Magiri E, Bii C, Maina N. Bio-Prospecting for Broad Spectrum Antibiotic Producing Actinomycetes Isolated from Virgin Soils in Kericho County, Kenya. Advances in Microbiology 2017;7: 56-70. doi: 10.4236/aim.2017.71005

12. Subakaran M, Joshua SA, Jansi M, Vincent SGP. Isolation and Identification of antibacterial compound producing *Streptomyces* parvulus ICN698 from a Wetland Ecosystem of Kanyakumari. *Indian* Journal of Pharmacy andPharmacology2015;2:217-21. doi: 10.5958/2393-9087.2015.00006.0

13. Ceylan O, Okmen G, Ugur A. Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. Eur Asian Journal of Biosciences 2008;2:73-82.

14. Carlet J. The gut is the epicentre of antibiotic resistance. Antimicrobial Resistance and Infection Control 2012;1:39. doi: 10.1186/2047-2994-1-39

15. Hakvag S, Fjaervik E, Josefsen KD, Ian E, Ellingsen TE, Zotchev SB. Characterization of streptomyces spp. Isolated from the Sea Surface Microlayer in the Trondheim Fjord, Norway. Mar Drugs 2008;6:620-35. doi: 10.3390/md6040620

16. Gebreyohannes G, Moges F, Sahile S, Raja N. Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2013;3:426-35. doi: 10.1016/S2221-1691(13)60092-1

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;8:439-43.

18. Zamani I, Bouzari M, Emtiazi G. Comparison of FTIR and 16SrDNA sequencing methods for identification and taxonomy of methylotroph bacteria. Taxonomy and Biosystematics 2013;5:83-94.

19. Alijani H, Matroodi S, Sharafi A, Zamani I. Diversity and antimicrobial activities of streptomyces isolated from intertidal sediments of Deylam, Iran. Razi Journal of Medical Sciences 2017; 24:22-31.[Persian].

20. Khandan Dezfully N, Ramanayaka JG. Isolation, Identification and Evaluation of Antimicrobial Activity of *Streptomyces flavogriseus*, strain ACTK2 from Soil Sample of Kodagu, Karnataka State (India). Jundishapur J Microbiol 2015;8:e15107. doi: 10.5812/jjm.15107

21. Naik G, Shukla S, Mall R, Misha SK. Optimization of culture condition of *Streptomyces zaomyceticus* RC 2073 by shake flask method. European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences 2015;2:620-9.

22. Oskay M. Effects of some environmental conditions on biomass and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp.,KGG32. Int J Agric Biol 2011;13:317-24.

23. Singh LS, Sharma H, Talukdar NC. Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, *Streptomyces* sannanensis strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India. BMC Microbiology 2014;14:278. doi: 10.1186/s12866-014-0278-3

24. Dehnad A, Esmaili E, Solouki M. Isolation and molecular identification chitinase-producing *Streptomyces* strains and examination of their in-vitro antagonistic effects. Biological Journal of Microorganism 2015;(15):123-134.[Persian]

25. Karimi E, Sadeghi A. Study on optimum growth condition and designing formulation for increasing shelf life of *Streptomyces rimosus* strain sp. SAS16. Biological Journal of Microorganism 2015;4:109-22.

26. Charousova I, Sona Javorekova S, Medo J, Romy Schade R. Characteristic of selected soil *Streptomyces* with antimicrobial potential against phytophatogenic microorganisms. J Microbiol Biotech Food Sci 2016;5:64-8. doi: 10.15414/jmbfs.2016.5.special1.64-68

27. Deepa S, Kanimozhi K. and Panneerselvam A. 16 SrDNA Phylogenetic Analysis of Actinomycetes Isolated from Marine Environment Associated with Antimicrobial Activities. Journal for Drugs and Medicines 2014;5:43-50.

28. Higginbotham SH, Murphy CD. Identification and characterisation of a Streptomyces sp. Isolate exhibiting activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Microbiological Research 2010;165:82-6. doi: 10.1016/j.micres.2008.12.004

29. Salehghamari E, Hosseini M, Taheri F. Isolation of antibacterial material-producing bacteria from saline soil. Nova Biologica Reperta 2019;5:372-8.[Persian].

30. Sweetline C, Usha R, Palaniswamy M. Antibacterial activity of actinomycetes from pichavaram mangrove of tamil nadu. Applied Journal of Hygiene 2012;1:15-8. doi: 10.5829/idosi.ajh.2012.1.2.7183

31. Valli S, Suvathi Sugasini S, Aysha OS, Nirmala P, Vinoth Kumar P, Reena A. Antimicrobial potential of actinomycetes species isolated from marine environment. Asian Pac J Trop Biomed 2012;2:469-73. doi: 10.1016/S2221-1691(12)60078-1

32. Zhao H, Parry RL, Ellis DI, Griffith GW, Goodacre R. The rapid differentiation of *Streptomyces* isolates using Fourier transform infrared spectroscopy. Vibrational Spectroscopy2006;40:213-8. doi: 10.1016/j.vibspec.2005.09.006

33. Satapathy S, Mohapatra SB. Optimization of cultural parameters for enhanced production of antimicrobial bioactive metabolites by *arthrobacter* PM105 against antibiotic resistant pathogenes. Asian J Pharm Clin Res 2015;8:439-43. doi: 10.17485/ijst/2017/v10i38/90363

34. Usha Nandhini SU, Selvam MM. Bioactive compounds produced by streptomyces strain. Int J Pharm Pharm Sci 2013;5:176-8.

35. Harounabadi S, Shokouhi Mostafavi SK, Eghbali Shamsabad P, Meybodi SM. Measurement of antimicrobial activity of isolated bacteria from the Caspian sea and molecular identification of strains with antimicrobial effect. Biological Journal of Microorganism 2015; 15:167-78.[Persian].

36. Kumar V, Bharti A, Gusain O, Bisht GS. An improved method for isolation of genomic dna from filamentous actinomycetes. Journal of Sci Engg & Tech Mgt 2010;2:10-3.

37. Khattab AI, Babiker EH, Saeed HA. *Streptomyces*: isolation, optimization of culture conditions and extraction of secondary metabolites. International Current Pharmaceutical Journal 2016;5:27-32.

38. Bhavana M, Talluri VP, Kumar KS, Rajagopal SV. Optimization of culture conditions of *Streptomyces carpaticus* (MTCC-11062) for the production of antimicrobial compound. Int J Pharm Sci 2014;6:281-5.

39. Harounabadi S, Meybodi S M, Shokouhi S K. The survey of molecular and antimicrobial activity of isolated bacteria from the Caspian sea. Iran J Med Microbiol 2016;10:16-23.

40. Singh LS, Mazumder S, Bora TC. Optimisation of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by a salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete, Streptomyces tanashiensis strain A2D. J Med Mycol 2009;19:225-33. doi: 10.1016/j.mycmed.2009.07.006

Journal of Knowledge & Health
in Basic Medical Sciences 2019; Vol 14, No 2

DOI: 10.22100/jkh.v14i2.2258

Original Article

Antimicrobial Activity of Streptomyces Tendae Strain 944 Isolated from the Eastern Regions of Gilan Province and Optimization of its Bioactive Compounds

Seyedeh Zahra Mirsonbol (Ph.D. Student)[1], Khosro Issazadeh (Ph.D.)[2*], Saeid Zarrabi (Ph.D.)[3], Mirsasan Mirpour (Ph.D.)[4]

1- Dept. of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.
2- Dept. of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.
3- Dept. of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

Received: 29 September 2019**, Accepted:** 18 June 2019

Abstract:

Introduction: *Streptomyces are microorganisms that are present in a variety of natural resources, especially in the soil, and can produce a wide variety of antimicrobial compounds. The prevalence of microbial resistance among pathogen microorganisms is increasing. The purpose of this study was to isolate and identify Streptomyces producing antimicrobial compounds with molecular methods and optimize its production conditions.*

Methods: *Streptomyces isolated from the soils of different regions of eastern Gilan province. Then, morphology, physiology and biochemical identification of the isolated samples were investigated. Finally, the identification of the isolates was carried out using sequencing of 16 SrRNA and phylogenetic analysis. Antimicrobial activity against tested pathogenic microorganisms and optimization of antimicrobial compounds produced in nutrient media and different conditions such as carbon and nitrogen sources, pH, incubation time and temperature were performed.*

Results: *Based on the results of phylogenetic studies and sequencing of 16SrRNA, 97.34% confidence was detected in Streptomyces tendae strain 944. The bacterium had antimicrobial activity against pathogenic microorganisms including 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. After optimization, the best culture medium, pH, optimum temperature, carbon and nitrogen sources and incubation time were ISP2, 7, 28 0 C, glucose, yeast extract and 7 days respectively.*

Conclusion: *The first report of screening of Streptomyces producing bioactive compounds in the eastern regions of Guilan province, show that the soils of the eastern regions of Guilan province are a very rich source of streptomyces producing antimicrobial compounds that can it is very important to produce natural-antimicrobial compounds.*

Keywords: Streptomyces tendae strain 944, Antimicrobial compounds, 16 SrRNA, Optimization.

Conflict of Interest: No

***Corresponding author:** Kh. Issazadeh, **Email**: issa_kaam@yahoo.com*

Citation: Mirsonbol SZ, Issazadeh Kh, Zarrabi S, Mirpour M. Antimicrobial activity of streptomyces tendae strain 944 isolated from the eastern regions of gilan province and optimization of its bioactive compounds. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2019;14(2):38-46.